

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-505673

(P2009-505673A)

(43) 公表日 平成21年2月12日(2009.2.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 2 4
C O 7 K 16/36 (2006.01)	C O 7 K 16/36	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-528522 (P2008-528522)
 (86) (22) 出願日 平成18年8月31日 (2006. 8. 31)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年4月30日 (2008. 4. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2006/065864
 (87) 国際公開番号 W02007/026000
 (87) 国際公開日 平成19年3月8日 (2007. 3. 8)
 (31) 優先権主張番号 05107963.0
 (32) 優先日 平成17年8月31日 (2005. 8. 31)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 507383862
 ノボ ノルディスク ヘルス ケア アー
 ゲー
 スイス国 シーエイチー8050 チュー
 リッヒ, アンドレアストラッセ 15
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 ピンゲル, ハンス, クルト
 デンマーク国 デイーケー-3520 フ
 アラム, ムンケホイヴェンゲ 35

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 第VII因子特異抗体及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、第VII因子に対する新規の抗体、試料中の正しく折り畳まれたインタクトな第VII因子の量を決定するための使用、並びに精製のための使用及び方法の最適化のための使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 0.05 mM の二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第 VII 因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体。

【請求項 2】

前記エピトープが、配列番号：1 のアミノ酸残基 P h e 4、L e u 5、G l a 6、G l a 7、L e u 8、P r o 1 0、G l y 1 1、G l a 1 4、A r g 1 5、G l a 1 6、C y s 1 7、G l a 1 9、G l a 2 0、C y s 2 2、G l a 2 5、G l a 2 6、A l a 2 7、G l a 2 9、P h e 3 1、L y s 3 2、G l a 3 5 の一又は複数を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項 3】

モノクローナル抗体が、

(a) 配列番号：3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号：5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(b) 配列番号：7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号：9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；又は

(c) 配列番号：11 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号：13 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域

を含んでなる抗体と競合する、請求項 1 又は 2 に記載のモノクローナル抗体。

20

【請求項 4】

モノクローナル抗体が、

(a) 配列番号：3 のアミノ酸配列の残基 24 - 34 に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1 可変領域、配列番号：3 のアミノ酸配列の残基 50 - 56 に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2 可変領域、配列番号：3 のアミノ酸配列の残基 89 - 95 に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 可変領域、及び配列番号：5 のアミノ酸配列の残基 33 - 35 に対応するアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1 可変領域、配列番号：5 のアミノ酸配列の残基 50 - 64 に対応するアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2 可変領域、配列番号：5 のアミノ酸配列の残基 99 - 112 に対応するアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 可変領域；

30

(b) 配列番号：7 のアミノ酸配列の残基 24 - 34 に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1 可変領域、配列番号：7 のアミノ酸配列の残基 50 - 56 に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2 可変領域、配列番号：7 のアミノ酸配列の残基 89 - 95 に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 可変領域、及び配列番号：9 のアミノ酸配列の残基 33 - 35 に対応するアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1 可変領域、配列番号：9 のアミノ酸配列の残基 50 - 64 に対応するアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2 可変領域、配列番号：9 のアミノ酸配列の残基 99 - 112 に対応するアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 可変領域；又は

(c) 配列番号：11 のアミノ酸配列の残基 24 - 34 に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1 可変領域、配列番号：11 のアミノ酸配列の残基 50 - 56 に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2 可変領域、配列番号：11 のアミノ酸配列の残基 89 - 95 に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 可変領域、及び配列番号：13 のアミノ酸配列の残基 33 - 35 に対応するアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1 可変領域、配列番号：13 のアミノ酸配列の残基 50 - 64 に対応するアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2 可変領域、配列番号：13 のアミノ酸配列の残基 99 - 112 に対応するアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 可変領域

40

を含んでなる、請求項 1 から 3 のいずれかーに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

モノクローナル抗体が、

(a) 配列番号：3 に少なくとも 50 % 同一なアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列

50

番号：5に少なくとも50%同一なアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
 (b) 配列番号：7に少なくとも50%同一なアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号：9に少なくとも50%同一なアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；又は
 (c) 配列番号：11に少なくとも50%同一なアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号：13に少なくとも50%同一なアミノ酸配列を含む重鎖可変領域
 を含んでなる、請求項1から4のいずれかーに記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】

モノクローナル抗体が、

(a) 配列番号：3のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号：5のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
 (b) 配列番号：7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号：9のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；又は
 (c) 配列番号：11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号：13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域
 を含んでなる、請求項1から5のいずれかーに記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項7】

モノクローナル抗体が、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4抗体である、請求項1から5のいずれかーに記載のモノクローナル抗体。

【請求項8】

モノクローナル抗体がIgG4抗体である、請求項1から5のいずれかーに記載のモノクローナル抗体。

20

【請求項9】

請求項1から8のいずれかーに記載のモノクローナル抗体をコードする核酸分子。

【請求項10】

請求項9に記載の核酸分子を含んでなるベクター。

【請求項11】

請求項10に記載のベクターを含んでなる細胞。

【請求項12】

試料中のインタクトなカルボキシグルタミン酸ドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの量を決定する方法であって、

30

(a) 少なくとも0.05mMの二価の陽イオンの存在下において請求項1から8のいずれかーに記載の一次モノクローナル抗体と試料を接触させ；
 (b) 試料中に存在するいずれかの第VII因子ポリペプチドを該一次モノクローナル抗体に結合させて、一次抗体複合体を形成させ；
 (c) 該一次モノクローナル抗体のエピトープと異なり、該第VII因子ポリペプチドに存在する第二のエピトープに特異的な検出可能な二次モノクローナル抗体と該一次抗体複合体を接触させ；
 (d) 該一次抗体複合体を該検出可能な二次モノクローナル抗体に結合させ、二次抗体複合体を形成させ；そして、
 (e) 二次抗体複合体に存在する二次モノクローナル抗体の量を検出することによって、該二次抗体複合体の量を検出する
 工程を含んでなる方法。

40

【請求項13】

試料中のインタクトなカルボキシグルタミン酸ドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの量を決定する方法であって、

(a) 請求項1から8のいずれかーに記載のモノクローナル抗体によって同定されるエピトープと異なる、第VII因子ポリペプチドに存在するエピトープに特異的な二次モノクローナル抗体と試料を接触させ；
 (b) 試料中に存在するいずれかの第VII因子ポリペプチドを該二次モノクローナル抗体に結合させて、一次抗体複合体を形成させ；

50

- (c) 少なくとも 0.05 mM の二価の陽イオンの存在下において請求項 1 から 8 のいずれか一に係る検出可能な一次モノクローナル抗体と該一次抗体複合体を接触させ；
- (d) 該一次抗体複合体を該検出可能な一次モノクローナル抗体に結合させ、二次抗体複合体を形成させ；そして、
- (e) 二次抗体複合体に存在する該一次モノクローナル抗体の量を検出することによって、該二次抗体複合体の量を検出する工程を含んでなる方法。

【請求項 14】

第二エピトープが前記第VII因子ポリペプチドのEGF-様ドメイン1又はEGF-様ドメイン2に存在する、請求項12又は13に記載の方法。

10

【請求項 15】

前記二価の陽イオンが、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Sm^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Sm^{2+} 及び UO^{2+} からなる群から選択される、請求項12から14のいずれか一に記載の方法。

【請求項 16】

前記二価の陽イオンが Ca^{2+} である、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

前記二価の陽イオンが、 0.05 mM より多く、例として 0.1 mM より多く、例として 0.6 mM より多く、例として 1 mM より多く、例として 5 mM より多く存在する、請求項15又は16に記載の方法。

20

【請求項 18】

前記二価の陽イオンが、およそ 0.05 mM からおよそ 50 mM 、例としておよそ 0.1 mM からおよそ 30 mM 、例としておよそ 0.6 mM からおよそ 30 mM 、例としておよそ 1 mM からおよそ 20 mM 、例としておよそ 5 mM からおよそ 10 mM の範囲の量で存在する、請求項15から17のいずれか一に記載の方法。

【請求項 19】

前記の検出可能な抗体の検出が、ELISA、表面プラズモン共鳴及び圧電気バイオセンサーから選択される方法によって実行される、請求項12から18のいずれか一に記載の方法。

【請求項 20】

試料中の第VII因子ポリペプチドの総量に対するインタクトなカルボキシグルタミン酸ドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの比率を決定する方法であって、

(a) 請求項12から19のいずれか一に記載の方法を用いてインタクトなカルボキシグルタミン酸ドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの量を決定し；そして、

(b) 試料中に存在する第VII因子ポリペプチドの総量を決定する工程を含んでなる方法。

30

【請求項 21】

産生の際に機能的な第VII因子ポリペプチドの収率を最適化するための、請求項12から20のいずれか一に記載の方法の使用。

【請求項 22】

試料からのインタクトなカルボキシグルタミン酸ドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの精製方法であって、

(a) 請求項1から8のいずれか一に記載の抗体を免疫親和性精製カラムにカップリングさせ；

(b) 少なくとも 0.05 mM の二価の陽イオン存在下において、該カラムに該試料をアプライし；そして、

(c) カラムからの二価の陽イオンの除去によって、インタクトなカルボキシグルタミン酸ドメインを含んでなる該第VII因子ポリペプチドをカラムから溶出する工程を含んでなる方法。

40

【請求項 23】

50

前記二価の陽イオンが、およそ0.05 mMからおよそ50 mM、例としておよそ0.1 mMからおよそ30 mM、例としておよそ0.6 mMからおよそ30 mM、例としておよそ1 mMからおよそ20 mM、例としておよそ5 mMからおよそ10 mMの範囲の量で存在するCa²⁺である、請求項22に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、第VII因子に対する新規の抗体、試料中の正しく折り畳まれたインタクトな第VII因子の量を決定するための使用、並びに精製のための使用及び方法の最適化のための使用に関する。

10

【0002】

(発明の背景)

タンパク質の工業生産のために、便利で簡単なアッセイにおける試料中の第VII因子ポリペプチドの濃度を決定することができることが望ましい。このための1つの方法は、第VII因子ポリペプチドと結合し、その後コンジュゲートされた酵素の酵素反応によって定量化される特異的な抗体によるものである。この酵素結合免疫測定法(ELISA)は、試料中の特定のタンパク質の検出のために当分野で公知である。試料中の抗原の絶対的な量が決定されなければならない、抗原標準物質が有用である場合、より正確な抗原濃度の決定のために、「サンドイッチ」ELISAが非常に有用である。

20

このアッセイを利用するために、ある抗体(「捕獲」抗体)が精製され、固相に結合される。次いで、抗原を加え、結合した抗体と複合体化させる。次いで、結合していない生成物を洗浄により除去し、標識した二次抗体(「検出」抗体)を抗原と結合させ、このようにして「サンドイッチ」を完了する。次いで、このアッセイは、比色基質の使用によって、基質に結合した標識二次抗体の量を計量することにより定量化される。この技術の主な利点は、抗原を使用前に精製する必要がないということ、またこれらのアッセイが非常に特異的であるということである。しかしながら、すべての抗体が用いられうるわけではない。モノクローナル抗体の組み合わせは、抗原上の異なるエピトープを認識することができることを意味する「マッチドペア(matched pairs)」で適格性を確認しなければならない。

30

【0003】

サンドイッチELISAの感度は、固相に結合する一次抗体の分子数；抗原の一次抗体の親和性；抗原の二次抗体の親和性；二次抗体の特異的な活性の4つの因子に依存している。

特に、抗原に対する抗体の親和性は、他の抗体との置換によって変更のみされうる。したがって、特定の第VII因子ポリペプチドに対して強力な親和性を有する抗体が望ましい。

多くのタンパク質は活性化されるために、翻訳後修飾を必要とする。これらの修飾には、プロペプチドの切断と、成熟ポリペプチドの適切な折畳みとが含まれる。

特定のファミリーのタンパク質は、特徴的なモジュラー編成によって認識され、それらの生合成のためにビタミンKを必要とする。アミノ末端膜結合ドメインは、 γ -カルボキシル化されたグルタミン酸(GLA)残基を含有し、ビタミンK依存的な反応においてカルボキシラーゼによって翻訳後に修飾される。これらのタンパク質の γ -カルボキシル化は、それらの適当な折畳み、及びこれによる活性にも影響する。

40

【0004】

このファミリーに属するタンパク質の産生の間、免疫親和性カラムを応用することによって非常に効率的な方法で培養物液体を精製することが望ましい場合がある。また、培養物中の活性な第VII因子ポリペプチドの収率を最適化するために、培養方法を良好にコントロールすることが望ましいであろう。この目的は、効率の良いモノクローナル抗体の同定と、及び培養物中の第VII因子ポリペプチドの総量に対する対象の活性なタンパク質(正

50

しくプロセッシングされた：構造的エピトープの形成を引き起こす（-カルボキシル化）の割合を決定するための簡便で迅速なアッセイによって達成されうるであろう。このことにより、本方法をモニタリングし、培養中の最適なときに培養物を回収するなどの、最適な条件に調整してもよい。

【0005】

（発明の概要）

現在、第VII因子のGLAドメインに対するカルシウムのような二価の陽イオンの存在下において、高親和性を有する特定のモノクローナル抗体が同定されている。

これらの抗体は、第VII因子ポリペプチドの良好で絶対的な濃度測定のための方法に利用されてもよく、さらにこれらの高親和性抗体が第VII因子ポリペプチド上に露出する異なるエピトープを認識する抗体と組み合わせられる場合に、試料中の第VII因子ポリペプチドの総量に対する正しくプロセッシングされた第VII因子ポリペプチドの比率を決定することができる方法が開発されている。この方法は、産生の間の活性な第VII因子ポリペプチドの収率を最適化するために用いられてもよい。

さらに、GLAドメインに対するカルシウムの存在下において、高親和性を有するこれらの新規な特異的抗体は、精製のための非常に効率的で簡便な方法に用いられてもよい。

したがって、広義の態様では、本発明は、野生型ヒト第VII因子に対する効率の良いモノクローナル抗体の同定に関する。

【0006】

本発明の第一の態様は、少なくとも0.05 mMの二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸(GLA)ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体に関する。

本発明の第二の態様は、少なくとも0.05 mMの二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸(GLA)ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体をコードする核酸分子に関する。

更なる態様では、本発明は、少なくとも0.05 mMの二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸(GLA)ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体をコードする核酸分子を含んでなるベクターに関する。

更なる態様では、本発明は、少なくとも0.05 mMの二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸(GLA)ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体をコードする核酸分子を含むベクターを含んでなる細胞に関する。

【0007】

更なる態様では、本発明は、試料中のインタクトなGLAドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの量を決定するための方法であって、

a) 少なくとも0.05 mMの二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトな-カルボキシグルタミン酸(GLA)ドメインに存在するエピトープに結合する一次モノクローナル抗体と試料を接触させ、

b) 試料中に存在するいずれかの第VII因子ポリペプチドを該一次モノクローナル抗体に結合させて、一次抗体複合体を形成させ、

c) 該一次モノクローナル抗体のエピトープと異なり、該第VII因子ポリペプチドに存在する第二のエピトープに特異的な検出可能な二次モノクローナル抗体と該一次抗体複合体を接触させ、

d) 該一次抗体複合体を該検出可能な二次モノクローナル抗体に結合させ、二次抗体複合体を形成させ、そして、

e) 二次抗体複合体に存在する二次モノクローナル抗体の量を検出することによって、該二次抗体複合体の量を検出する

工程を含んでなる方法に関する。

【0008】

10

20

30

40

50

更なる態様では、本発明は、試料中のインタクトなG L Aドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの量を決定するための方法であって、

- a) 少なくとも0.05 mMの二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなγ-カルボキシグルタミン酸(G L A)ドメインに存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体に同定されるエピトープと異なり、該第VII因子ポリペプチドに存在するエピトープに特異的な二次モノクローナル抗体と試料を接触させ、
- b) 試料中に存在するいずれかの第VII因子ポリペプチドを該二次モノクローナル抗体に結合させて、一次抗体複合体を形成させ、
- c) 少なくとも0.05 mMの二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなγ-カルボキシグルタミン酸(G L A)ドメインに存在するエピトープに結合する検出可能な一次モノクローナル抗体と少なくとも0.05 mMの二価の陽イオンの存在下の一次抗体複合体を接触させ、
- d) 該一次抗体複合体を該検出可能な一次モノクローナル抗体に結合させ、二次抗体複合体を形成させ、そして、
- e) 二次抗体複合体に存在する該一次モノクローナル抗体の量を検出することによって、該二次抗体複合体の量を検出する工程を含んでなる方法に関する。

10

【0009】

更なる態様では、本発明は、試料中の第VII因子ポリペプチドの総量に対するインタクトなG L Aドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの比率を決定するための方法であって、

- a) 本発明に係る方法を用いてインタクトなG L Aドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの量を決定し；そして、
- b) 試料中に存在する第VII因子ポリペプチドの総量を決定する工程を含んでなる方法に関する。

20

更なる態様では、本発明は、産生の際に機能的な第VII因子ポリペプチドの収率を最適化するための本発明に係る方法の使用に関する。

【0010】

更なる態様では、本発明は、試料からのインタクトなG L Aドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの精製方法であって、

- (a) 少なくとも0.05 mMの二価の陽イオン存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなγ-カルボキシグルタミン酸(G L A)ドメインに存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体を免疫親和性精製カラムにカップリングさせ、
- (b) 少なくとも0.05 mMの二価の陽イオン存在下において、該カラムに該試料をアプラインし、
- (c) カラムからの二価の陽イオンの除去によって、インタクトなG L Aドメインを含んでなる該第VII因子ポリペプチドをカラムから溶出する工程を含んでなる方法に関する。

30

【0011】

(図面の説明)

本発明は、図面(一又は複数)により以下に詳細に説明される。

図1は、天然のヒトの第VII凝固因子の完全なアミノ酸配列(配列番号: 1)を示す。

図2は、本発明に係る例示的な抗体の成熟した可変軽鎖(V L)領域及び可変重鎖(V H)領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図3は、記載したE L I S Aアッセイの代表的な標準曲線を示す。

図4は、記載したE L I S Aアッセイの代表的な $1/n / 1/n$ 標準曲線を示す。

図5は、異なる培養についての時間(日数)に応じたC D Iを示す。

40

【0012】

(発明の詳細な説明)

本発明は、広義の態様では、第VII因子のG L Aドメインに対する、新規な特異的抗体

50

の同定に関する。

これらの特異的なモノクローナル抗体は、カルシウムなどの二価の陽イオンの存在下において、第VII因子のGLAドメインに対して高い親和性を有する。

この抗体は、インタクトなGLAドメインを有する第VII因子ポリペプチドの良好で絶対的な濃度測定のための方法に利用されてもよく、さらにこれらの高親和性抗体が第VII因子ポリペプチド上に露出する異なるエピトープを認識する抗体と組み合わせられる場合に、試料中の第VII因子ポリペプチドの総量に対する正しくプロセッシングされた第VII因子ポリペプチドの比率を決定することができる方法が開発されている。この方法は、産生の間の活性な第VII因子ポリペプチドの収率を最適化するために用いられてもよい。

さらに、GLAドメインに対するカルシウムなどの二価の陽イオンの存在下において、高親和性を有するこれらの新規な特異的抗体は、精製のための非常に効率的で簡便な方法に用いられてもよい。

【0013】

本発明の一態様では、本発明に係る抗体は、インタクトなGLAドメインを有する第VII因子ポリペプチドの量の測定に用いられる。これは一般的に、一次抗体である捕獲抗体が固体支持体に付着された後に、所定の適切な条件下で第VII因子ポリペプチドに抗体を結合させるアッセイ、例えばELISAアッセイにより達成される。洗浄工程の後に第VII因子ポリペプチドを固体支持体上に維持させるであろう。結合していない生成物は洗浄によって除去し、標識した二次抗体(「検出」抗体)を第VII因子ポリペプチドに結合させ、こうして「サンドイッチ」を完了する。次いで、抗原の量は、基質に結合した標識二次抗体の量を測定することによって定量化される。酵素に結合される検出用抗体の場合には、比色アッセイが行われ、色の変化が測定される。既知濃度の第VII因子ポリペプチドの適切な標準物質から、試料中に存在する第VII因子ポリペプチドの絶対的な量が決定される。

本発明の一実施態様では、検出用抗体が酵素結合性である場合、本発明の方法はサンドイッチELISA法に関する。

【0014】

本発明において「捕捉抗体」なる用語は、バッファで希釈されたサンドイッチELISAの一次抗体を意味し、インキュベーションの際に固相に受動的に付着されるものである。また、例えばストレプトアビジンコートした固相に加えられるビオチン化された抗体を用いることによって、有効な付着が用いられる。

本発明において「検出用抗体」なる用語は、バッファで希釈され、抗原の後に加えられるサンドイッチELISAの二次抗体を意味する。二次抗体は、直接ELISA又は標準的なサンドイッチELISAに記載の抗種コンジュゲートにおいて、活用してもよい。抗種コンジュゲートは、二次抗体が調製された血清の種と結合する。

【0015】

ヒト血漿第VII因子には、アミノ末端(N末端)カルボキシグルタミン酸(GLA)ドメイン(アミノ酸1-38)、2つの上皮細胞増殖因子(EGF)-様ドメイン、及びセリンプロテアーゼドメインの4つの別々のドメインが含まれる。活性な2鎖の酵素は、Arg152の後で特異的に切断されて生成される(Hagen等, Proc Natl Acad Sci USA, 1986; 83:2412-2416)。

N末端GLAドメインはリン脂質表面と結合する；C末端セリンプロテアーゼドメインは酵素活性を与える；2つのEGF-様ドメインはそれらの間のスペーサーである；4つすべてのドメインは組織因子(TF)との相互作用に参与する。

カルシウムイオンは第VII因子の3つのドメインと結合する(Banner等, Nature 1996; 380:41-46)。カルシウムイオンがなければ第VII因子は実質的に生物活性を持たない。7つのカルシウム部位はGLAドメインに位置し、それらは第VII因子が細胞膜に結合するため(Person and Petersen, Eur J Biochem 1995; 234:293-300)、更にTFとの適切な相互作用のために必要である。

【0016】

10

20

30

40

50

感度、及び、それによる培養試料中のインタクトなGLAドメインの有無にかかわらず第VII因子分子の絶対的な内容物及び濃度の良好な測定は、とりわけ、それらの標的抗原に対して高い親和性を有する良好な抗体に依存する。具体的な実施態様では、インタクトなGLAドメインを有する第VII因子分子の量を決定するのに用いられる本発明の抗体は、 Ca^{2+} などの二価の陽イオンの存在下において、ポリペプチドに対して非常に高い親和性を有する抗体として選択される。

また、GLAドメインより第VII因子ポリペプチド上の異なるエピトープに対する高親和性抗体が、これらの方法で用いられてもよい。

好ましくは、インタクトなGLAドメインの有無にかかわらずすべての第VII因子分子の絶対的な内容物及び濃度の良好な測定に用いられる抗体は、抗原が適切に折り畳まれるか活性化されるかにかかわらず、抗原に常に存在するエピトープを認識するであろう。第VIIa因子では、EGF-様ドメイン内に見られるエピトープが特にこの目的に適している。

10

【0017】

本明細書中で用いられる「第VII因子ポリペプチド」又は「FVIIポリペプチド」なる用語は、野生型ヒト第VIIa因子(すなわち米国特許第4784950号に開示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド)のアミノ酸配列1-406を含んでなる任意のタンパク質、その変異体、並びに第VII因子誘導体及び第VII因子コンジュゲートを意味する。これには、野生型ヒト第VIIa因子と相対的に同じか改善された生物学的活性を実質的に示す第VII因子コンジュゲート、第VII因子誘導体及び第VII因子変異体が含まれる。第VII因子のこのような変異体は、安定性、リン脂質結合、変更された特定の活性などを含め、ヒトの第VII因子と比べて異なる性質を表してもよい。

20

「第VII因子」又は「FVII」なる用語は、それらの非切断(チモーゲン)型の第VII因子ポリペプチドを意味する。一般的に、第VII因子は、残基152と153の間で切断されて第VIIa因子となる。「野生型ヒト第VII因子」は、その機能的生理活性型の野生型ヒト第VIIa因子の非切断の酵素前駆体型である。

【0018】

「第VIIa因子」又は「FVIIa」なる用語は、それぞれ機能的な生理活性型となるようにタンパク質加水分解されている第VII因子ポリペプチドを意味する。

本明細書中で用いられる「野生型ヒト第VIIa因子」は、その機能的な生理活性型で米国特許第4784950号に開示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである

30

本明細書中で用いられる「第VII因子誘導体」なる用語は、野生型第VII因子に対して相対的に同じか又は改善された生物学的活性を実質的に示すFVIIポリペプチドを表すことを意図し、このFVIIポリペプチドにおいて、親ペプチドの一又は複数のアミノ酸が、例えばアルキル化、グリコシル化、PEG化、アシル化、エステル形成又はアミド形成などによって遺伝的に及び/又は化学的に及び/又は酵素的に修飾されている。これには、PEG化されたヒト第VIIa因子、システイン-PEG化ヒト第VIIa因子及びその変異体を含むが、これらに限定されるものではない。第VII因子誘導体の非限定的な例には、国際公開第03/31464号及び米国公開特許第20040043446号、同第20040063911号、同第20040142856号、同第20040137557号及び同第20040132640号(Neose Technologies, Inc.)に開示されるグリコPEG化FVII誘導体；国際公開第01/04287号、米国公開特許第20030165996号、国際公開第01/58935号、国際公開第03/93465号(Maxygen ApS)及び国際公開第02/02764号、米国公開特許第20030211094号(University of Minnesota)に開示されるFVIIコンジュゲートが含まれる。

40

【0019】

「改善された生物学的活性」なる用語は、i) 組み換え野生型ヒト第VIIa因子と比較して実質的に同じ又は増加したタンパク質分解活性を有するFVIIポリペプチド、又はii) 組み換え野生型ヒト第VIIa因子と比較して実質的に同じ又は増加したTF結合活性を有するFVIIポリペプチド、又はiii) 組み換え野生型ヒト第VIIa因子と比較して実質的に同じ

50

又は増加した血漿中の半減期を有するFVIIポリペプチドを指す。「PEG化されたヒト第VIIa因子」なる用語は、ヒト第VIIa因子ポリペプチドにコンジュゲートされたPEG分子を有するヒト第VIIa因子を意味する。PEG分子が第VIIa因子ポリペプチドのいずれかのアミノ酸残基又は糖鎖を含む第VIIa因子ポリペプチドのいずれかの部分に付着しうことは理解される。「システイン-PEG化ヒト第VIIa因子」なる用語は、ヒト第VIIa因子に導入されるシステインのスルフヒドリル基にコンジュゲートされるPEG分子を有する第VIIa因子を意味する。

【0020】

組み換え野生型ヒト第VIIa因子と比較して実質的に同じ又は増加したタンパク質分解活性を有する第VII因子変異体の非限定的な例には、S52A-FVIIa、S60A-FVIIa(Lino等, Arch. Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998) ; 米国特許第5580560号に開示される、増加したタンパク質分解性安定性を表すFVIIa変異体 ; 残基290と291又は残基315と316の間でタンパク質分解的に切断されている第VIIa因子(Mollerup等, Biotechnol. Bioeng. 48:501-505, 1995) ; 第VIIa因子の酸化型(Kornfelt等, Arch. Biochem. Biophys. 363:43-54, 1999) ; PCT/DK02/00189(国際公開第02/077218号に対応する)に開示されるFVII変異体 ; 及び、国際公開第02/38162号(Scripps Research Institute)に開示される、増加したタンパク質分解性安定性を表すFVII変異体 ; 国際公開第99/20767号、米国特許第6017882号及び同第6747003号、米国公開特許第20030100506号(University of Minnesota)及び国際公開第00/66753号、米国公開特許第20010018414号、同第2004220106号、及び同第200131005号、米国特許第6762286号及び同第6693075号(University of Minnesota)に開示される、変性G1a-ドメインを有し、亢進した膜結合を示すFVII変異体 ; 及び、国際公開第01/58935号、米国特許第6806063号、米国公開特許第20030096338号(Maxygen ApS)、国際公開第03/93465号(Maxygen ApS)、国際公開第04/029091号(Maxygen ApS)、国際公開第04/083361号(Maxygen ApS)及び国際公開第04/111242号(Maxygen ApS)、並びに国際公開第04/108763号(Canadian Blood Services)に開示される、FVII変異体が含まれる。

【0021】

野生型FVIIaと比較して増加した生物学的活性を有するFVII変異体の非限定的な例には、国際公開第01/83725号、国際公開第02/22776号、国際公開第02/077218号、PCT/DK02/00635(国際公開第03/027147号に対応)、デンマーク特許出願第PA200201423号(国際公開第04/029090号、デンマーク特許第PA200101627号(国際公開第03/027147号 ; 国際公開第02/38162号(Scripps Research Institute)に開示されるFVII変異体 ; 及び、特願2001061479(Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.)に開示される、亢進された活性を有するFVIIa変異体が含まれる。第VII因子の変異体の例には、L305V-FVII、L305V/M306D/D309S-FVII、L305I-FVII、L305T-FVII、F374P-FVII、V158T/M298Q-FVII、V158D/E296V/M298Q-FVII、K337A-FVII、M298Q-FVII、V158D/M298Q-FVII、L305V/K337A-FVII、V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII、V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII、V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII、K157A-FVII、E296V-FVII、E296V/M298Q-FVII、V158D/E296V-FVII、V158D/M298K-FVII、及びS336G-FVII、L305V/K337A-FVII、L305V/V158D-FVII、L305V/E296V-FVII、L305V/M298Q-FVII、L305V/V158T-FVII、L305V/K337A/V158T-FVII、L305V/K337A/M298Q-FVII、L305V/K337A/E296V-FVII、L305V/K337A/V158D-FVII、L305V/V158D/M298Q-FVII、L305V/V158D/E296V-FVII、L305V/V158T/M298Q-FVII、L305V/V158T/E296V-FVII、L305V/E296V/M298Q-FVII、L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII、L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII、L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII、L305V/V158T/E296V/K337A-FVII、L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII、L305V/V158D/E296V/K337A-FVII、L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII、L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII、S314E/K316H-FVII、S314E/K316Q-FVII、S314E/L305V-FVII、S314E/K337A-FVII、S314E/V158D-FVII、S314E/E296V-FVII、S314E/M298Q-FVII、S3

14E/V158T-FVII、K316H/L305V-FVII、K316H/K337A-FVII、K316H/V158D-FVII、K316H/E296V-FVII、K316H/M298Q-FVII、K316H/V158T-FVII、K316Q/L305V-FVII、K316Q/K337A-FVII、K316Q/V158D-FVII、K316Q/E296V-FVII、K316Q/M298Q-FVII、K316Q/V158T-FVII、S314E/L305V/K337A-FVII、S314E/L305V/V158D-FVII、S314E/L305V/E296V-FVII、S314E/L305V/M298Q-FVII、S314E/L305V/V158T-FVII、S314E/L305V/K337A/V158T-FVII、S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII、S314E/L305V/K337A/E296V-FVII、S314E/L305V/K337A/V158D-FVII、S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII、S314E/L305V/V158D/E296V-FVII、S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII、S314E/L305V/V158T/E296V-FVII、S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII、S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII、S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII、S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII、S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII、S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII、S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII、S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII、S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII、K316H/L305V/K337A-FVII、K316H/L305V/V158D-FVII、K316H/L305V/E296V-FVII、K316H/L305V/M298Q-FVII、K316H/L305V/V158T-FVII、K316H/L305V/K337A/V158T-FVII、K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII、K316H/L305V/K337A/E296V-FVII、K316H/L305V/K337A/V158D-FVII、K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII、K316H/L305V/V158D/E296V-FVII、K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII、K316H/L305V/V158T/E296V-FVII、K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII、K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII、K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII、K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII、K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII、K316H/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII、K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII、K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII、K316Q/L305V/K337A-FVII、K316Q/L305V/V158D-FVII、K316Q/L305V/E296V-FVII、K316Q/L305V/M298Q-FVII、K316Q/L305V/V158T-FVII、K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII、K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII、K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII、K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII、K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII、K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII、K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII、K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII、K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII、K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII、K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII、K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII、F374Y/K337A-FVII、F374Y/V158D-FVII、F374Y/E296V-FVII、F374Y/M298Q-FVII、F374Y/V158T-FVII、F374Y/S314E-FVII、F374Y/L305V-FVII、F374Y/L305V/K337A-FVII、F374Y/L305V/V158D-FVII、F374Y/L305V/E296V-FVII、F374Y/L305V/M298Q-FVII、F374Y/L305V/V158T-FVII、F374Y/L305V/V/S314E-FVII、F374Y/K337A/S314E-FVII、F374Y/K337A/V158T-FVII、F374Y/K337A/M298Q-FVII、F374Y/K337A/E296V-FVII、F374Y/K337A/V158D-FVII、F374Y/V158D/S314E-FVII、F374Y/V158D/M298Q-FVII、F374Y/V158D/E296V-FVII、F374Y/V158T/S314E-FVII、F374Y/V158T/M298Q-FVII、F374Y/V158T/E296V-FVII、F374Y/E296V/S314E-FVII、F374Y/S314E/M298Q-FVII、F374Y/E296V/M298Q-FVII、F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII、F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII、F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII、F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII、F374Y/L305V/V/K337A/S314E-FVII、F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII、F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII、F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII、F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII、F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII、F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII、F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII、F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII、F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII、F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII、F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII、F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII、F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII、F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII、F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII、F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII、F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII、F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII、F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII、F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII、F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII、F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII、F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII、F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII、F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII、F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII、F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII、F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII、F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII、F374Y/V158

10

20

30

40

50

D/E296V/M298Q/K337A-FVII、F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII、F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII、F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII、F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII、F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII、F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII、F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII、F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII、F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII、F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII、F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII、F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII、F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII、F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII、F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII、F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII、F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII、F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII、F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII、F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII、F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII、F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII、F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII、F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII、F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII、F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII、F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII、F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII、F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII、S52A-第VII因子、S60A-第VII因子；R152E-第VII因子、S344A-第VII因子、T106N-FVII、K143N/N145T-FVII、V253N-FVII、R290N/A292T-FVII、G291N-FVII、R315N/V317T-FVII、K143N/N145T/R315N/V317T-FVII；及び、233Thrから240Asnまでのアミノ酸配列に置換、付加又は欠失を有するFVII；304Argから329Cysまでのアミノ酸配列に置換、付加又は欠失を有するFVII；及び、153Ileから223Argまでのアミノ酸配列に置換、付加又は欠失を有するFVIIが含まれるがこれらに限定されるものではない。

10

20

【0022】

インタクトなGLAドメインを有する第VII因子分子の濃度の測定のために使用する抗体は、GLAドメインのエピトープを認識する。GLAドメインのある好適なエピトープは、配列番号：1のアミノ酸残基Phe4、Leu5、Gla6、Gla7、Leu8、Pro10、Gly11、Gla14、Arg15、Gla16、Cys17、Gla19、Gla20、Cys22、Gla25、Gla26、Ala27、Gla29、Phe31、Lys32、Gla35の一又は複数を含むエピトープである。

本明細書中で用いる「インタクトなGLAドメイン」なる句は、GLAドメインがヒト第VII因子のcys17とcys22との間のジスルフィド結合に対応するジスルフィド結合を有することを意味することを意図する。

30

本明細書中で用いる「インタクトなGLAドメインを含む第VII因子ポリペプチド」なる句は、インタクトなGLAドメインが第VII因子分子の残りの部分に共有結合により付着している第VII因子ポリペプチドを意味することを意図する。

【0023】

本発明の関係において、抗体が決定基を「結合する」なる用語は、抗体が特異性及び/又は親和性を有して決定基を結合することを表す。

「特異的な結合」又は「特異性」とは、他のタンパク質ないしは構造と相対的に僅かな検出可能な反応性を有しながらも、FVIIポリペプチドなどの抗原に提示されるエピトープを検出可能に結合する抗体ないし他の薬剤の能力を指す。本明細書中の他で記述されるように、特異性は例えばBiacore機具を用いた結合アッセイ又は競合的結合アッセイにより相対的に測定されうる。特異性は、特定の抗原への結合と他の無関係な分子への非特異的な結合における親和性/結合活性が例えばおよそ10:1、およそ20:1、およそ50:1、およそ100:1、およそ1000:1又はそれ以上の比であるとして表されうる(この場合特異的な抗原はFVIIポリペプチドである)。

40

【0024】

「エピトープ」は、抗原結合性ペプチド(例えば抗体)が特異的に結合する抗原上の部位又は領域である。タンパク質のエピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基(エピトープの免疫優勢成分とも称する)、及び該結合に直接関与しない他のアミノ酸残基、例え

50

ば特異的な抗原結合性ペプチドによって効果的にブロックされるアミノ酸残基(すなわち、該アミノ酸残基は特異的な抗原結合性ペプチドの「フットプリント」内にある)を含みうる。本明細書中のエピトープなる用語は、抗FVII抗体に特異的に結合するFVIIポリペプチドのいずれかの特定の領域にある複数の種類のアミノ酸を含有する。FVIIポリペプチドは、限定するものではないが(1)直線状の抗原決定基、(2)成熟したFVIIポリペプチド高次構造内で互いに近くに配位する一又は複数の近接していないアミノ酸からなる高次構造的な抗原決定基；及び(3)炭水化物基などの、FVIIポリペプチドに共有結合により付着される分子構造の全体ないしは一部からなる翻訳後抗原決定基を含みうる多くの異なるエピトープを含みうる。

【0025】

一次抗体が二次抗体と「実質的に」又は「少なくとも部分的に」同じエピトープを結合するなる句は、一次抗体に対するエピトープ結合部位が、二次抗体のエピトープ結合部位を構成する抗原上のアミノ酸残基の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれ以上を含むことを意味する。また、一次抗体が二次抗体と実質的に又は部分的に同じエピトープを結合することは、上記のように、一次抗体と二次抗体が抗原への結合において競合することを意味する。ゆえに、モノクローナル抗体FVII-3F3A4と「実質的に同じエピトープ又は決定基に結合する」なる用語は、抗体がFVII-3F3A4と「競合する」ことを意味する。通常、対象のモノクローナル抗体(例えばFVII-3F3A4、FVII-3F20A1、FVII-3F11A3)「と実質的に同じエピトープ又は決定基に結合する」抗体は、抗体が一又は複数のFVIIポリペプチドへの結合について対象の抗体と「競合する」ことを意味する。

【0026】

「直線状ペプチド抗原決定基」なる用語は、アミノ酸の直鎖配列上で近接しているアミノ酸残基からなるエピトープとして定義される(一次構造)。

「高次構造的な抗原決定基」なる用語は、全く近接しておらず、それゆえに分子の折り畳み(フォールディング)により互いに近接したアミノ酸の直鎖配列の離れた部分を表すアミノ酸残基からなるエピトープとして定義される(二次、三次及び/又は四次構造)。高次構造的エピトープは三次元構造に依存する。したがって、「高次構造」なる用語は「構造的な」なる用語と互換性を持って用いられることが多い。

【0027】

一実施態様では、本発明は、少なくとも0.05mMの二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸(GLA)ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体であって、該エピトープが、配列番号：1のアミノ酸残基Phe4、Leu5、Gla6、Gla7、Leu8、Pro10、Gly11、Gla14、Arg15、Gla16、Cys17、Gla19、Gla20、Cys22、Gla25、Gla26、Ala27、Gla29、Phe31、Lys32、Gla35の一又は複数を含むモノクローナル抗体に関する。

【0028】

一実施態様では、本発明は、少なくとも0.05mMの二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸(GLA)ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体が、

- (a) 配列番号：3のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号：5のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
 - (b) 配列番号：7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号：9のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；又は
 - (c) 配列番号：11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号：13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域
- を含んでなる抗体と競合する、モノクローナル抗体に関する。

【0029】

10

20

30

40

50

一実施態様では、本発明は、少なくとも0.05 mMの二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸(GLA)ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体であって、

(a) 配列番号：3のアミノ酸配列の残基24-34に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1可変領域、配列番号：3のアミノ酸配列の残基50-56に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2可変領域、配列番号：3のアミノ酸配列の残基89-95に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3可変領域、及び配列番号：5のアミノ酸配列の残基33-35に対応するアミノ酸配列を含む重鎖CDR1可変領域、配列番号：5のアミノ酸配列の残基50-64に対応するアミノ酸配列を含む重鎖CDR2可変領域、配列番号：5のアミノ酸配列の残基99-112に対応するアミノ酸配列を含む重鎖CDR3可変領域；

(b) 配列番号：7のアミノ酸配列の残基24-34に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1可変領域、配列番号：7のアミノ酸配列の残基50-56に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2可変領域、配列番号：7のアミノ酸配列の残基89-95に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3可変領域、及び配列番号：9のアミノ酸配列の残基33-35に対応するアミノ酸配列を含む重鎖CDR1可変領域、配列番号：9のアミノ酸配列の残基50-64に対応するアミノ酸配列を含む重鎖CDR2可変領域、配列番号：9のアミノ酸配列の残基99-112に対応するアミノ酸配列を含む重鎖CDR3可変領域；又は

(c) 配列番号：11のアミノ酸配列の残基24-34に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1可変領域、配列番号：11のアミノ酸配列の残基50-56に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2可変領域、配列番号：11のアミノ酸配列の残基89-95に対応するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3可変領域、及び配列番号：13のアミノ酸配列の残基33-35に対応するアミノ酸配列を含む重鎖CDR1可変領域、配列番号：13のアミノ酸配列の残基50-64に対応するアミノ酸配列を含む重鎖CDR2可変領域、配列番号：13のアミノ酸配列の残基99-112に対応するアミノ酸配列を含む重鎖CDR3可変領域

を含んでなるモノクローナル抗体に関する。

【0030】

一実施態様では、本発明は、少なくとも0.05 mMの二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸(GLA)ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体であって、

(a) 配列番号：3に少なくとも50%同一なアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号：5に少なくとも50%同一なアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(b) 配列番号：7に少なくとも50%同一なアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号：9に少なくとも50%同一なアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；又は

(c) 配列番号：11に少なくとも50%同一なアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び配列番号：13に少なくとも50%同一なアミノ酸配列を含む重鎖可変領域

を含んでなるモノクローナル抗体に関する。

【0031】

一実施態様では、本発明は、少なくとも0.05 mMの二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸(GLA)ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体であって、

(a) 配列番号：3のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号：5のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(b) 配列番号：7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号：9のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；又は

(c) 配列番号：11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び配列番号：13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域

を含んでなるモノクローナル抗体に関する。

【 0 0 3 2 】

一実施態様では、本発明は、少なくとも 0 . 0 5 m M の二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトな カルボキシグルタミン酸 (G L A) ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体であって、 I g G 1、 I g G 2、 I g G 3 又は I g G 4 抗体であるモノクローナル抗体に関する。

一実施態様では、本発明は、少なくとも 0 . 0 5 m M の二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトな カルボキシグルタミン酸 (G L A) ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体であって、 I g G 4 抗体であるモノクローナル抗体に関する。

【 0 0 3 3 】

一実施態様では、本発明は、試料中のインタクトな G L A ドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの量を決定するための方法であって、

a) 少なくとも 0 . 0 5 m M の二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトな カルボキシグルタミン酸 (G L A) ドメインに存在するエピトープと結合する一次モノクローナル抗体に、少なくとも 0 . 0 5 m M の二価の陽イオンの存在下で試料を接触させ、

b) 試料中に存在するいずれかの第VII因子ポリペプチドを該一次モノクローナル抗体に結合させて、一次抗体複合体を形成させ、

c) 第二のエピトープが該一次モノクローナル抗体のエピトープと異なり、該第VII因子ポリペプチドに存在する第二のエピトープに対して特異的な検出可能な二次モノクローナル抗体と該一次抗体複合体を接触させ、

d) 該一次抗体複合体を該検出可能な二次モノクローナル抗体に結合させ、二次抗体複合体を形成させ、そして、

e) 二次抗体複合体に存在する二次モノクローナル抗体の量を検出することによって、該二次抗体複合体の量を検出する

工程を含んでなり、このとき第二のエピトープが第VII因子ポリペプチドの E G F - 様ドメイン 1 又は E G F - 様ドメイン 2 上に存在するものである方法に関する。

【 0 0 3 4 】

一実施態様では、本発明は、試料中のインタクトな G L A ドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの量を決定する方法であって、

a) 少なくとも 0 . 0 5 m M の二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトな カルボキシグルタミン酸 (G L A) ドメインに存在するエピトープと結合する一次モノクローナル抗体に、少なくとも 0 . 0 5 m M の二価の陽イオンの存在下で試料を接触させ、

b) 試料中に存在するいずれかの第VII因子ポリペプチドを該一次モノクローナル抗体に結合させて、一次抗体複合体を形成させ、

c) 第二のエピトープが該一次モノクローナル抗体のエピトープと異なり、該第VII因子ポリペプチドに存在する第二のエピトープに対して特異的な検出可能な二次モノクローナル抗体と該一次抗体複合体を接触させ、

d) 該一次抗体複合体を該検出可能な二次モノクローナル抗体に結合させ、二次抗体複合体を形成させ、そして、

e) 二次抗体複合体に存在する二次モノクローナル抗体の量を検出することによって、該二次抗体複合体の量を検出する

工程を含んでなり、このとき該二価の陽イオンが、およそ 0 . 0 5 m M からおよそ 5 0 m M、例としておよそ 0 . 1 m M からおよそ 3 0 m M、例としておよそ 1 m M からおよそ 2 0 m M、例としておよそ 5 m M からおよそ 1 0 m M の範囲の量で存在する $C a^{2+}$ である方法に関する。

【 0 0 3 5 】

一実施態様では、本発明は、試料中のインタクトな G L A ドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの量を決定する方法であって、

10

20

30

40

50

- a) 少なくとも 0.05 mM の二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸 (G L A) ドメインに存在するエピトープと結合する一次モノクローナル抗体に、少なくとも 0.05 mM の二価の陽イオンの存在下で試料を接触させ、
- b) 試料中に存在するいずれかの第VII因子ポリペプチドを該一次モノクローナル抗体に結合させて、一次抗体複合体を形成させ、
- c) 第二のエピトープが該一次モノクローナル抗体のエピトープと異なり、該第VII因子ポリペプチドに存在する第二のエピトープに対して特異的な検出可能な二次モノクローナル抗体と該一次抗体複合体を接触させ、
- d) 該一次抗体複合体を該検出可能な二次モノクローナル抗体に結合させ、二次抗体複合体を形成させ、そして、
- e) 二次抗体複合体に存在する二次モノクローナル抗体の量を検出することによって、該二次抗体複合体の量を検出する
- 工程を含んでなり、このとき、検出可能な抗体の検出が、E L I S A、表面プラスモン共鳴及び圧電気バイオセンサーから選択される方法によって実行されるものである方法に関する。

10

【0036】

一実施態様では、本発明は、試料中のインタクトな G L A ドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの量を決定する方法であって、

- a) エピトープが少なくとも 0.05 mM の二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸 (G L A) ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体によって同定されるエピトープと異なり、第VII因子ポリペプチドに存在するエピトープに対して特異的な二次モノクローナル抗体と試料を接触させ、
- b) 試料中に存在するいずれかの第VII因子ポリペプチドを該二次モノクローナル抗体に結合させて、一次抗体複合体を形成させ、
- c) 少なくとも 0.05 mM の二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸 (G L A) ドメインに存在するエピトープと結合する検出可能な一次モノクローナル抗体と、少なくとも 0.05 mM の二価の陽イオンの存在下で一次抗体複合体を接触させ、
- d) 該一次抗体複合体を該検出可能な一次モノクローナル抗体に結合させ、二次抗体複合体を形成させ、そして、
- e) 二次抗体複合体に存在する一次モノクローナル抗体の量を検出することによって、該二次抗体複合体の量を検出する
- 工程を含んでなり、このとき第二のエピトープが第VII因子ポリペプチドの E G F - 様ドメイン 1 又は E G F - 様ドメイン 2 上に存在するものである方法に関する。

20

30

【0037】

一実施態様では、本発明は、試料中のインタクトな G L A ドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの量を決定する方法であって、

- a) エピトープが少なくとも 0.05 mM の二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸 (G L A) ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体によって同定されるエピトープと異なり、第VII因子ポリペプチドに存在するエピトープに対して特異的な二次モノクローナル抗体と試料を接触させ、
- b) 試料中に存在するいずれかの第VII因子ポリペプチドを該二次モノクローナル抗体に結合させて、一次抗体複合体を形成させ、
- c) 少なくとも 0.05 mM の二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸 (G L A) ドメインに存在するエピトープと結合する検出可能な一次モノクローナル抗体と、少なくとも 0.05 mM の二価の陽イオンの存在下で一次抗体複合体を接触させ、

40

50

- d) 該一次抗体複合体を該検出可能な一次モノクローナル抗体に結合させ、二次抗体複合体を形成させ、そして、
- e) 二次抗体複合体に存在する一次モノクローナル抗体の量を検出することによって、該二次抗体複合体の量を検出する
- 工程を含んでなり、このとき該二価の陽イオンが、およそ0.05 mMからおよそ50 mM、例としておよそ0.1 mMからおよそ30 mM、例としておよそ1 mMからおよそ20 mM、例としておよそ5 mMからおよそ10 mMの範囲の量で存在するCa²⁺である方法に関する。

【0038】

一実施態様では、本発明は、試料中のインタクトなGLAドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの量を決定する方法であって、

- a) エピトープが少なくとも0.05 mMの二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸(GLA)ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体によって同定されるエピトープと異なり、第VII因子ポリペプチドに存在するエピトープに対して特異的な二次モノクローナル抗体と試料を接触させ、
- b) 試料中に存在するいずれかの第VII因子ポリペプチドを該二次モノクローナル抗体に結合させて、一次抗体複合体を形成させ、
- c) 少なくとも0.05 mMの二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸(GLA)ドメインに存在するエピトープと結合する検出可能な一次モノクローナル抗体と、少なくとも0.05 mMの二価の陽イオンの存在下で一次抗体複合体を接触させ、
- d) 該一次抗体複合体を該検出可能な一次モノクローナル抗体に結合させ、二次抗体複合体を形成させ、そして、
- e) 二次抗体複合体に存在する一次モノクローナル抗体の量を検出することによって、該二次抗体複合体の量を検出する
- 工程を含んでなり、このとき検出可能な抗体の検出が、ELISA、表面プラスモン共鳴及び圧電気バイオセンサーから選択される方法によって実行されるものである方法に関する。

【0039】

一実施態様では、本発明は、試料からのインタクトなGLAドメインを含んでなる第VII因子ポリペプチドの精製方法であって、

- (a) 少なくとも0.05 mMの二価の陽イオンの存在下においてのみ、野生型ヒト第VII因子のインタクトなカルボキシグルタミン酸(GLA)ドメインに存在するエピトープと結合するモノクローナル抗体を免疫親和性精製カラムにカップリングさせ、
- (b) 少なくとも0.05 mMの二価の陽イオン存在下において、該カラムに該試料をアプライし、
- (c) カラムからの二価の陽イオンの除去によって、インタクトなGLAドメインを含んでなる該第VII因子ポリペプチドをカラムから溶出する、
- 工程を含んでなり、このとき該二価の陽イオンが、およそ0.05 mMからおよそ50 mM、例としておよそ0.1 mMからおよそ30 mM、例としておよそ1 mMからおよそ20 mM、例としておよそ5 mMからおよそ10 mMの範囲で存在するCa²⁺である方法に関する。

【0040】

本明細書中で用いる「EGF-様ドメイン1」なる用語は、配列番号：1のアミノ酸配列46-82を意味する。本明細書中で用いる「EGF-様ドメイン2」なる用語は、配列番号：1のアミノ酸配列87-128を意味する。

第VII因子の適切な折畳み(フォールディング)及び活性はカルシウムの存在に依存しており、現在、第VII因子上の特定のエピトープがカルシウムイオンなどの二価の陽イオンの存在下で露出されているだけであることが明らかとなっている。金属イオンの存在は、

本発明に係る抗体によって認識されるGLAドメインのエピトープの形成及び露出に必須である。一実施態様では、二価の陽イオンは金属イオンである。一実施態様では、二価の陽イオンは、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Sm^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Sm^{2+} 及び Uo^{2+} からなる群から選択される。一実施態様では、二価の陽イオンはカルシウムである。一実施態様では、二価の陽イオンは Zn^{2+} である。一実施態様では、二価の陽イオンは Mg^{2+} である。

【0041】

二価の陽イオンの正確な量は当業者により容易に測定されうるが、通常、陽イオン濃度は少なくとも0.05mM、例として少なくとも0.1mM、例として少なくとも1mMでなければならない。

具体的な実施態様では、二価の陽イオンは、0.05mMより多い、例として0.1mMより多い、例として0.6mMより多い、例として1mMより多い、例として5mMより多い量で存在する。

具体的な実施態様では、二価の陽イオンは、およそ0.05mMからおよそ50mM、例としておよそ0.1mMからおよそ30mM、例としておよそ0.6mMからおよそ30mM、例としておよそ1mMからおよそ20mM、例としておよそ5mMからおよそ10mMの範囲の量で存在する。

具体的な実施態様では、 Ca^{2+} は、およそ0.05mMからおよそ50mM、例としておよそ0.1mMからおよそ30mM、例としておよそ0.6mMからおよそ30mM、例としておよそ1mMからおよそ20mM、例としておよそ5mMからおよそ10mMの範囲の量で存在する。

【0042】

抗体

本発明は、適切な折畳みに関係のないドメイン内に存在するエピトープに対して高い親和性を有して抗原を結合する新規の抗体及びその断片ないしはその誘導体、及び正しくプロセシングされた抗原/ポリペプチド内の抗原に露出されたエピトープに結合する抗体を提供する。この後者の抗体は、カルシウムの存在下において露出されたエピトープを認識する。

本明細書中で用いられる「抗体」なる用語は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を指す。重鎖中の定常ドメインの種類に応じて、抗体は、5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMの1つに割り当てられる。これらのうちのいくつかは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4などのように、サブクラス又はアイソタイプにさらに分けられる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ「 γ 」、「 δ 」、「 ϵ 」、「 μ 」及び「 ν 」と称される。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配置は周知である。IgG及び/又はIgMは、生理的な状況において最も一般的な抗体であり、且つ実験室条件下で最も簡単に作製されるので、本発明で使用される抗体の好ましいクラスである。好ましくは、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。

【0043】

本発明の抗体は当分野で公知の様々な技術によって生産されうる。典型的に、FVIIポリペプチドを含んでなる免疫原による非ヒト動物、好ましくはマウスの免疫化により産生される。

あるいは、特異的な抗体は組み換えタンパク質として発現されてもよい。本発明の特異的な抗体は適切な抗体の例を意味し、可変領域の特定の配列、特に相補性決定領域(CDR)として知られている高頻度可変領域から生成されうる。実施例においても例示されるように、当業者は、CDR-領域の配列から完全なモノクローナル抗体を組み換えて発現させることができるであろう。

第VII因子ポリペプチドは、完全長配列、又はその断片ないしはその誘導体、典型的には免疫原性断片、すなわち露出したエピトープを含む第VII因子ポリペプチドの一部を含んでなりうる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 4 】

ヒト以外の哺乳動物を抗原で免疫化する工程は、マウスでの抗体の産生を刺激するために、当分野で周知の任意の様式で実施することができる(例としてE. Harlow and D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)を参照)。次いで、必要に応じて、完全フロイントアジュバントなどのアジュバントとともに、バッファ中に免疫原を懸濁、又は溶解する。免疫原の量、バッファの種類及びアジュバントの量を決定する方法は当業者に周知であり、いかなる意味においても本発明を限定するものではない。これらのパラメーターは、免疫原ごとに異なる場合がありうるが、容易に解明される。

同様に、抗体の産生を刺激するのに十分な免疫化の位置及び頻度も、当分野において周知である。典型的な免疫化プロトコールでは、1日目に、ヒト以外の動物に抗原を腹腔内注射し、約1週後に再度抗原を腹腔内注射する。この後、必要に応じて、不完全フロイントアジュバントなどのアジュバントとともに、20日目前後に、抗原のリコール注射(recall injections)を行う。リコール注射は、静脈内に行われ、連続する数日間繰り返してもよい。その後、典型的にはアジュバントなしに、静脈内又は腹腔内の何れかで、40日目に追加免疫注射を行う。このプロトコールによって、約40日後に、抗原特異的抗体産生B細胞が産生される。免疫化に使用される抗原に対して誘導される抗体を発現するB細胞の産生をもたらず限り、他のプロトコールも使用することができる。

【 0 0 4 5 】

ポリクローナル抗体の調製の場合、免疫されたヒト以外の動物から血清を得て、その中に存在する抗体を周知の技術によって単離する。FVIIポリペプチド、特に第VIIa因子と反応する抗体を得るために、固形支持体に連結された上記免疫原の何れかをを用いて、血清を親和性精製してもよい。

別の実施形態では、免疫化されていないヒト以外の哺乳動物からリンパ球を単離し、インビトロで増殖し、次いで、細胞培養において免疫原に曝露する。次いで、リンパ球を採集し、以下に記載する融合工程を実施する。

【 0 0 4 6 】

モノクローナル抗体の場合、次の工程は、免疫されたヒト以外の哺乳動物から脾細胞を単離した後、これらの脾細胞を不死化された細胞と融合して、抗体を産生するハイブリドーマを形成させる。ヒト以外の哺乳動物からの脾細胞の単離は当分野において周知であり、典型的には、麻酔されたヒト以外の哺乳動物から脾臓を取り出し、脾臓を小片に切断し、脾臓カプセル(splenic capsule)から細胞濾過器のナイロンメッシュを通して、脾細胞を適切なバッファ中に絞り取り、単一細胞の懸濁液を得る。細胞を洗浄し、遠心し、全ての赤血球を溶解するバッファ中に再懸濁する。この溶液を再び遠心し、最後に、ペレット中に残存するリンパ球を新鮮なバッファ中に再懸濁する。

【 0 0 4 7 】

一旦単離され、単一の細胞懸濁液中に存在した時点で、リンパ球は不死化細胞株に融合される。これは、典型的には、マウスのミエローマ細胞株であるが、ハイブリドーマの作製に有用な他の多くの不死化細胞株も、当分野において公知である。好適なマウスのミエローマ株には、MOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. U.S.Aから入手可能)、又はX63 Ag 8653及びSP-2細胞株(American Type Culture Collection, Rockville, Maryland U.S.Aから入手可能)から由来するものが含まれるが、これらに限定されるものではない。融合はポリエチレングリコールなどを用いて行われる。次いで、得られたハイブリドーマを、融合されていない親ミエローマ細胞の増殖又は生存を阻害する一又は複数の物質を含有する選択培地中で増殖させる。例えば、親ミエローマ細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシル転移酵素(HGPRT又はHPRRT)を欠如していれば、ハイブリドーマの培地は、典型的には、HGPRT欠損細胞の増殖を抑制する物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。ハイブリドーマは、典型的には、マクロファージの支持細胞(フィーダー層)上で増殖される。マクロファージは、脾細胞を単離

10

20

30

40

50

するために使用されるヒト以外の哺乳動物の同腹仔から得ることが好ましく、典型的には、ハイブリドーマを播種する数日前に、不完全フロイントアジュバントなどで刺激される。融合法は、Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice," pp. 59-103 (Academic Press, 1986)に記述される。

【 0 0 4 8 】

細胞は、コロニー形成と抗体産生に十分な時間、選択培地中で増殖させる。これは通常7日から14日の間である。次いで、FVIIポリペプチドに特異的に結合する抗体の産生について、このハイブリドーマコロニーをアッセイする。このアッセイは典型的な比色定量的なELISAタイプのアッセイであるが、ハイブリドーマが増殖しているウェルに適する任意のアッセイが実行されてもよい。他のアッセイには、免疫沈降法及びラジオイムノアッセイが含まれる。—又は複数の異なるコロニーが存在するかどうかを決定するために、所望の抗体産生について陽性であるウェルを調べる。1より多いコロニーが存在すれば、細胞を再度クローニングし、増殖させて、単一の細胞のみが、所望の抗体を産生するコロニーを生じるようにする。確実にモノクローナル抗体が唯一つ検出され、産生されるように、典型的には、単一の明白なコロニーを有する陽性細胞を再クローニングし、再アッセイする。

例えばWard等(Nature 341 (1989) 544)に開示されるように、抗体は、免疫グロブリンのコンビナトリアルライブラリーの選別によって生産されてもよい。

【 0 0 4 9 】

組み換え産生

また、抗体は、標準的な技術を用いて、酵母などの単一の細胞生物内での；又は、細菌細胞培養物(例として大腸菌)内での；又は、真核細胞培養物内での(例として哺乳動物細胞の培養物内での)組み換え発現によって調製されうる。

ゆえに、別の実施態様では、抗第VII因子抗体の重鎖及び軽鎖をコードするDNAを本発明のハイブリドーマから単離して、適当な宿主への形質移入のために適切な発現ベクター内に配置する。次いで、抗体ないしはその変異体、例えばヒト化された様式のモノクローナル抗体、抗体の活性断片、又は抗体の抗原認識部分を含むキメラ抗体などを組み換え産生するために、宿主を使用する。

【 0 0 5 0 】

本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、容易に単離され、従来の手順を用いて(例えば、マウス又はヒトの抗体の重鎖及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て)配列決定される。一旦単離されると、DNAは、免疫グロブリンタンパク質を他の方法で産生しない大腸菌細胞、サルのCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞又は骨髓腫細胞などの宿主細胞に形質移入される発現ベクター内に配置され、組み換え宿主細胞内でモノクローナル抗体を合成する。抗体のDNAコード化断片の細菌内での組み換え発現は、当分野で公知である(例としてSkerra等, Curr. Opinion in Immunol., 5, pp. 256 (1993); 及びPluckthun, Immunol. Revs. 130, pp. 151 (1992)を参照)。

【 0 0 5 1 】

加えて、公知の可変重鎖(VH)及び可変軽鎖(VL)鎖及びヒトの定常領域からの抗体の組み換え産生は、例として、CHO細胞内でのヒトモノクローナル抗-HIV-1抗体の発現を報告するRuker等(Annals of the New York Academy of Sciences. 1991;646:212-219); トランス補完(trans-complementing)発現ベクターを用いた完全長抗体の高レベル発現を記載するBianchi等(Biotechnology and Bioengineering. 2003;84:439-444)、ジヒドロ葉酸還元酵素媒介遺伝子の増幅の間のCHO細胞のヒト化抗体発現に生じるクローン変異の重要な決定因子を記載するNo Soo Kim等(Biotechnol. Prog. 2001;17:69-75); マウス-ヒトキメラ抗体及びキメラFab'断片の発現、精製及び特徴を記載するKing等(Biochemical Journal. 1992;281:317-323); ヒト重鎖及びヒト軽鎖の可変領域(ともにFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4配列を含む)を含む単離されたヒトモノクローナル抗体を記述する国際公開第2003064606号; 及び、ヒト

10

20

30

40

50

C D 4 0 に特異的に結合して活性化するキメラ又はヒトのモノクローナル抗体及び抗原結合性部位を記述する国際公開第 2 0 0 3 0 4 0 1 7 0 に記載されている。

【 0 0 5 2 】

ヒト I g G の定常鎖領域をコードする c D N A 配列全体は、以下の G e n B a n k に見つけることができ、その各々はその全体が出典明記によって援用されるものであり、2 0 0 5 年 1 月 6 日に受託されている：

ヒト I g G 1 定常重鎖領域：G e n B a n k 受託 # ：J 0 0 2 2 8

ヒト I g G 2 定常重鎖領域：G e n B a n k 受託 # ：J 0 0 2 3 0

ヒト I g G 3 定常重鎖領域：G e n B a n k 受託 # ：X 0 4 6 4 6

ヒト I g G 4 定常重鎖領域：G e n B a n k 受託 # ：K 0 1 3 1 6

ヒト 軽鎖定常領域：G e n B a n k 受託 # ：J 0 0 2 4 1。

10

【 0 0 5 3 】

上記のように、本発明に係る特定の方法への使用に適切な抗体は「一致した組み合わせ」で用いられなければならない。この「一致した組み合わせ」とは 2 つの抗体が第 VII 因子ポリペプチド上の異なるエピトープを認識して結合することを意味する。特定の抗体が異なるエピトープと結合するかどうかの決定は、抗体の競合が評価されうる様々な免疫学的スクリーニングアッセイのいずれかを用いて、容易に決定されうる。このすべてのアッセイは当分野で慣例となっている(例として 1 9 9 7 年 8 月 2 6 日発行の米国特許第 5 6 6 0 8 2 7 号を参照)。

上記の技術に従って、いくつかの特異的なモノクローナル抗体が単離され、試験されており(これらの抗体の発現に関する詳細は実施例及び配列リストを参照)、第 VII 因子- 3 F 1 1 A 3、第 VII 因子- 3 F 3 A 4 及び第 VII 因子- 3 F 2 0 A 1 の 3 つのモノクローナル抗体が、第 VII 因子ポリペプチドの G L A ドメインである標的ドメインに対して非常に高い親和性を有することが示されている。これらの抗体は、カルシウムイオンに依存するポリペプチドに存在するエピトープを認識し、カルシウム依存的な結合と称される。

20

【 0 0 5 4 】

本発明の一実施態様では、インタクトな G L A ドメインを有する第 VII 因子ポリペプチドの量の測定のための方法は、G L A ドメインに存在するエピトープに特異的なモノクローナル抗体として第 VII 因子- 3 F 3 A 4、第 VII 因子- 3 F 1 1 A 3 及び第 VII 因子- 3 F 2 0 A 1 のいずれかを用いて行われる。

30

抗体第 VII 因子- 3 F 3 A 4 の可変軽鎖 (V L) のアミノ酸配列は配列番号：3 に示される。抗体第 VII 因子- 3 F 3 A 4 の可変重鎖 (H L) のアミノ酸配列は配列番号：5 に示される。

抗体第 VII 因子- 3 F 2 0 A 1 の可変軽鎖 (V L) のアミノ酸配列は配列番号：7 に示される。抗体第 VII 因子- 3 F 2 0 A 1 の可変重鎖 (H L) のアミノ酸配列は配列番号：9 に示される。

抗体第 VII 因子- 3 F 1 1 A 3 の可変軽鎖 (V L) のアミノ酸配列は配列番号：1 1 に示される。抗体第 VII 因子- 3 F 1 1 A 3 の可変重鎖 (H L) のアミノ酸配列は配列番号：1 3 に示される。

【 0 0 5 5 】

40

本発明の方法は、第 VII 因子ポリペプチドを産生する宿主細胞の培養の間に生成物である第 VII 因子ポリペプチドの質を迅速かつ正確に測定するために非常に簡便であることが明らかとなった。

本発明の方法を応用することによって、機能的な第 VII 因子ポリペプチドの量、並びに培養溶液中に存在する第 VII 因子ポリペプチドの総量を決定することが可能である。この機能的な第 VII 因子ポリペプチドは、本明細書において、インタクトなカルボキシル化 G L A ドメインを含む正しくプロセシングされた第 VII 因子ポリペプチドを意味する。

したがって、一実施態様では、本発明は、試料中の第 VII 因子ポリペプチドの総量に対する正しくプロセシングされた第 VII 因子ポリペプチドの比率を決定するための方法であって、

50

- a) c y s 1 7 と c y s 2 2 との間にジスルフィド結合を有する γ -カルボキシル化 G L A ドメインを含む第VII因子ポリペプチドの量を決定し；そして、
 b) 試料中に存在する第VII因子ポリペプチドの総量を決定する工程を含んでなる方法に関する。

【 0 0 5 6 】

したがって、試料中の第VII因子ポリペプチドの総量に対する正しくプロセシングされたポリペプチドの比率が算出され、その比率は本願ではカルシウム依存性指標(C D I)と称される。

γ -カルボキシル化ドメインである G L A ドメインを含むポリペプチドの正しいプロセシングは、カルシウムに依存しており、おそらく適切な折り畳みのためのものであることが示されている。カルシウムの存在下において誘導されたこの構造的な変化により、FVII ポリペプチドのプロ-ペプチド型、無 G L A ドメイン型又は非 γ -カルボキシル化型で存在しない折り畳まれたポリペプチド内のエピトープが露出されるであろう。

一実施態様では、異なる形態の第VII因子ポリペプチドの測定は、ポリペプチドの異なるドメインに特異的な抗体を結合させ、検出用抗体の量を検出することによって行われる。

標的抗原への抗体の結合を検出するための異なる検出システムは当分野で公知であり、例えばコンジュゲート酵素(E L I S A)及び蛍光結合抗体が含まれる。

【 0 0 5 7 】

したがって、更なる実施態様では、本発明は、試料中の第VII因子ポリペプチドの総量に対する正しくプロセシングされた第VII因子ポリペプチドの比率を決定するための方法であって、試料中に存在する第VII因子ポリペプチドの総量と正しくプロセシングされた G L A ドメインを含む第VII因子ポリペプチドの量は、第VII因子ポリペプチドの正しくプロセシングされた G L A ドメイン上の、 $C a^{2+}$ の存在下で露出されたエピトープに対する特異的な検出用抗体の結合を検出し、第VII因子ポリペプチドの異なるドメインのいずれか他のエピトープのそれぞれに対する他の特異的な検出用抗体の結合を検出することによって決定される。

この場合、固形支持体に固定された一又は複数の捕捉抗体(catching antibody)が一又は複数の検出用抗体(detecting antibody)とともに用いられる「サンドイッチ」技術が行われる。抗体の組合せにはいくつか考えられうる。

【 0 0 5 8 】

一実施態様では、捕捉抗体は、抗原/ポリペプチドに対して高い親和性を有する任意の抗体であり、その抗体は第VII因子ポリペプチドのすべて又はほとんどの形態を結合するであろう。このような抗体は、例えば第VII因子ポリペプチドの E G F-様ドメインのエピトープと結合しうる。次いで、検出用抗体は、存在する異なる形態間で識別されべきであり、一つの検出用抗体は $C a^{2+}$ の存在下で G L A ドメイン上に露出されるエピトープに特異的でなければならず、他方の検出用抗体は G L A ドメインでないドメイン上にあり、かつその G L A ドメインでないドメイン上のエピトープが捕捉抗体が認識するエピトープと異なるエピトープに特異的でなければならない。

正しくプロセシングされた抗原又はすべての抗原を測定する検出用抗体の結合の検出は、サンドイッチ E L I S A 技術が用いられる場合であるので2つの別々の試料で都合よく実施されるが、検出用抗体上の蛍光分子が直接測定される場合には同じ試料で両方の検出用抗体を検出することも考えられる。また、2つの異なる励起波長を用いる必要があるであろう。

【 0 0 5 9 】

一方、2つの異なる捕捉抗体が本方法に用いられる場合、常に2つの異なる試料が用いられる。この場合、2つの捕捉抗体のうち、一つの捕捉抗体は $C a^{2+}$ の存在下で G L A ドメイン上に露出されるエピトープに特異的であり、他方の捕捉抗体は G L A ドメインでないドメインの第一エピトープに特異的であり、検出用抗体は G L A ドメインでないドメインの第二エピトープに特異的な抗体であり、このときの第二エピトープは第一エピト-

10

20

30

40

50

ブと異なる。

例えば、一実施多様では、捕捉抗体として F 1 及び F 9、検出用抗体として F 7 としてもよい。

上記の通りに、検出用抗体の結合を検出する方法は、酵素コンジュゲート抗体が用いられ、結合した抗体の量が比色アッセイによって測定される E L I S A によるものである。特に E L I S A はサンドイッチ E L I S A である。しかしながら、検出用抗体結合のための他の手段も同様に用いられてもよい。

【 0 0 6 0 】

生体分子相互作用をモニターするための一つの公知技術は、表面プラズモン共鳴 (S P R) によるものである。表面プラズモン共鳴は、光が薄い金属フィルムから反射されるときに発生する現象である。一定の角度での光エネルギーの発生の一部は、金属フィルム (プラスモン) の局在化していない電子と相互作用しうるため、反射光強度が減少しうる。これが生じるときの発生の正確な角度は多くの因子によって決定されるが、Pharmacia B I A c o r e 装置では、主要な決定因子は金属フィルムの後方の近くの屈折率であり、その金属フィルムには標的分子が固定されており、フローセルに沿って移動する移動相のリガンドによって誘導される。固定された標的に結合が起こると、局所の屈折率が変化し、 S P R 角度の変化が生じ、この変化は、センサーグラムを生じる反射光の強度の変化を検出することによって、リアルタイムにモニターされうる。 S P R シグナルの変化の割合を分析して、反応の結合相と解離相の見かけの速度係数を求めることができる。これらの値の比率は見かけの平衡定数 (親和性) を与える。 S P R シグナルの変化の大きさは固定されている質量に正比例しており、したがって相互作用の化学量論に関しておよそその解釈ができる。シグナルは物質のマイクログラム未満の量から容易に得られる。 S P R シグナルが固定されたテンプレートへの結合にのみ依存するので、抽出物中の分子から結合を調べることもできる。すなわち、高度に精製された成分を有する必要はない。

【 0 0 6 1 】

センサー表面で生じる生体分子の相互作用は、溶質濃度及びそれによる感知しにくい波動浸透率内の屈折率を変化させる。したがって、 S P R 現象 (S P R 角度) を引き起こすために必要とされる発生角度を変更し、測定されるこの変化を応答シグナルとする。したがって、 S P R は、基本的に相互作用物の性質とは独立した質量検出器である。この技術は標識を必要としない。

抗体と抗原との間の相互作用を検出するために好適な他の考えられる手段は、測定されるパラメーターが耐性、電流又は電圧である圧電気バイオセンサーによるものである。標的である第 VII 因子ポリペプチドは内蔵圧抵抗器を有するカンチレバーに固定され、検出用抗体の結合により圧抵抗器を引っ張る屈曲が誘導され、それにより抵抗器の値が変化する。検出の他の考えられる手段は、例えば S A W (表面音波) - バイオセンサーなど、当業者が容易に考えつくものでよい。

【 0 0 6 2 】

したがって、一実施態様では、検出用抗体 / 抗体の結合の検出は、 E L I S A、表面プラズモン共鳴、圧電気バイオセンサー又は S A W - バイオセンサーによって実施される。

本発明の C D I は G L A ドメインを有する任意のタンパク質を測定してもよく、そのタンパク質の正しいプロセッシングはタンパク質の活性と相関し、適切な折り畳みはカルシウムの存在に影響を受けるものである。このようなタンパク質には、第 VII 因子、第 VII a 因子、第 IX 因子、第 IX a 因子、第 X 因子、第 X a 因子、プロテイン C、プロテイン S、プロテイン Z、オステオカルシン、基質 G L A - タンパク質、プロリンリッチ G 1 a タンパク質 1 及び 2 が含まれる。

C D I の算出方法は、ポリペプチドの望ましくない形態、例えば第 VII a 因子、例として G L A ドメインのない F V I I、プロ - F V I I、非 - カルボキシル化 F V I I、及び分解された G L A ドメインを有する F V I I の他の形態 (通常のサンドイッチ E L I S A にて検出されるもの) が識別され、それにより培養物の質的指標が得られるという利点がある。

驚くべきことに、第 VII 因子の産生の間の C D I 指標が培養期間の間で非常に異なり、

10

20

30

40

50

それゆえにC D Iの認識が最も良好な生成物の回収のために非常に重要であることが明らかとなった。

したがって、本発明の第二の態様は、産生の中に機能的な第VII因子ポリペプチドの収率を最適化するための本発明の方法の使用に関する。

【実施例】

【0063】

実施例1 抗体の組み換え産生

例示的な実施態様では、第VII因子抗体のV H配列及びV L配列から組み換えm A bを生産するために、以下のプロトコルを応用することができる。工程1 - 3は、モノクローナル第VII因子抗体を産生するハイブリドーマ又は他の細胞のV H領域及びV L領域の検索を示す。あるいは、工程4で用いられる第VII因子抗体V H配列及びV L配列をコードするc D N Aは、c D N A断片を合成するために十分に確立された技術を用いて、図2に示す配列情報から調製することができる。また、所望の抗体のV H断片及びV L断片、又はその変異体ないし誘導体は、完全長抗体を発現するために、所望のI gサブクラスの定常領域を含む、科学文献に記載される多くの発現ベクター又は市販の発現ベクターのいずれかにクローニングされてもよい。さらに、所望の抗体のV H断片及びV L断片、又はその変異体ないし誘導体は、抗体断片(例えばF a b断片)を発現するために切断された定常領域をコードするベクターにクローニングされてもよい。市販のベクターの一つの例は、A T C C (American Type Culture Collection, catalog number 87094)から入手可能な、p A S K 8 4である。

【0064】

(1) ハイブリドーマ細胞からの総R N Aの単離：

第VII因子に対する抗体を分泌する 4×10^6 個のハイブリドーマ細胞を、製造業者の指示に従って、QiagenのR N e a s y ミニキットを用いた総R N Aの単離のために用いる。簡単にここで概説する：1000回転数/分で5分間遠心して、細胞をペレット状にし、 $10 \mu\text{l}/\text{ml}$ の β -メルカプトエタノールを含有する350 μl のR L Tバッファを加えて破壊する。溶解物を、QiagenのQ I A s h r e d d e r カラムに移し、最大速度で2分間遠心分離する。流出物を等量の70%エタノールと混合する。R N e a s y スピニングカラム(Qiagen)に最高700 μl の試料をアプライし、14000回転数/分で遠心分離して、流出物を破棄する。カラムに700 μl のR W 1バッファをアプライし、14000回転数/分で15秒間遠心分離してカラムを洗浄する。500 μl のR P Eバッファにてカラムを2度洗浄し、14000回転数/分で15秒間遠心分離する。カラムを乾燥させるために、さらに14000回転数/分で2分間遠心分離する。カラムを新規の収集管へ移し、50 μl の無ヌクレアーゼ水にてR N Aを溶出し、14000回転数/分で1分間遠心分離する。O D = 260nmの吸光度にてR N A濃度を測定する。必要になるまでR N Aを -80°C に保存する。

【0065】

(2) c D N A合成：

1 μg のR N Aを、ClontechのSMART RACE c D N A増幅キットを用いて一本鎖(first-strand)のc D N A合成に用いる。5'-RACE-Ready c D N Aの調製のために、上記のように単離したR N A、リバースプライマー5'-C D Sプライマーバック、及びSMART II Aオリゴを含有する反応混合物を調製し、次いで、この混合物をおよそ2分間72 $^\circ\text{C}$ でインキュベートした後、およそ2分間氷上にて冷まし、1 \times First-Strandバッファ、D T T (20mM)、d N T P (10mM)及びPowerScript逆転写酵素を加える。反応混合物を42 $^\circ\text{C}$ で1.5時間インキュベートし、トリシン-EDTAバッファを加えて、72 $^\circ\text{C}$ で7分間インキュベートする。この時点で試料を -20°C で保存することができる。

【0066】

(3) ヒトの可変軽鎖(V L)及びヒトの可変重鎖(V H)のP C R増幅及びクローニング：

1 \times Advantage HF 2 P C Rバッファ、d N T P (10mM)及び1 \times Advantage HF 2ポリメラーゼ混合物を含有するP C R (ポリメラーゼ連鎖反応)反応混合物は、上記のように

作製された c D N A の V L 及び V H 両方の可変領域それぞれの増幅のために作製する。

V L の増幅には以下のプライマーを用いる：

U P M (ユニバーサルプライマー混合物)：

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (配列番号：14)

5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3' (配列番号：15)

V K R A C E 2：

5'-GCAGGCACACAACAGAGGCGAGTTCCAGATTTTC-3' (配列番号：16)

V H の増幅には以下のプライマーを用いる：

U P M (ユニバーサルプライマー混合物)：

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (配列番号：17)

5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3' (配列番号：18)

A B 9 0 R A C E：

5'-GTGCCAGGGGGAAGACCGATGGG-3' (配列番号：19)

【0067】

P C R は 3 回 行 う。ラウンド 1：94 で 5 秒間及び 72 で 3 分間を 5 サイクルにて P C R を 行 う。ラウンド 2：94 で 5 秒間、70 で 10 秒間、及び 72 で 1 分間を 5 サイクルにて P C R を 行 う。ラウンド 3：94 で 5 秒間、68 で 10 秒間、及び 72 で 1 分間を 28 サイクルにて P C R を 行 う。

P C R 生 成 物 は 1 % ア ガ ロースゲルの電気泳動にて分析し、Qiagen の Q I A E X 1 1 アガロースゲル抽出キットを用いて D N A をゲルから精製する。精製された P C R 生 成 物 を、Invitrogen の T O P O T A クローニングキットを用いて P C R 4 - T O P O ベクターに導入して、T O P 1 0 コンピテント細胞の形質転換に用いる。

適切な量のコロニーを、T a q ポリメラーゼ、1 x T a q ポリメラーゼバッファ、d N T P (10 m M) 及び以下のプライマーを用いたコロニー P C R により分析する。P C R プログラムは以下の通りである：

M 1 3 フォワードプライマー：5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' (配列番号：20)

M 1 3 リバースプライマー：5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (配列番号：21)

P C R プログラム：

94 で 30 秒間、55 で 30 秒間、及び 72 で 1 分間で 25 サイクル行 う。

V L 及び V H のインサートをそれぞれ含むクローンからプラスミド D N A を抽出し、上記に挙げたプライマー M 1 3 フォワード及び M 1 3 リバースを用いて配列決定する。第 V I 因子 m A b の場合の、重鎖及び軽鎖の可変領域をコードする配列を図 2 に示す。

【0068】

(4) 哺乳動物発現ベクターへの抗体遺伝子のサブクローニング

m A b の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードする c D N A の配列データに基づいて、可変軽鎖 (V L) 及び可変重鎖 (V H) のそれぞれの遺伝子の増幅のためにプライマーを設定する。可変領域は P C R によりフォーマット化し、コザック配列、リーダー配列及び固有の制限酵素部位を包含させる。これは、V L では、H i n d I I I 部位とコザック配列を導入し、かつ可変軽鎖領域のリーダー配列の 5' 末端に相同になるように 5' P C R プライマーを設定することによって達成される。3' プライマーは、可変領域の 3' 末端に相同であり、可変領域の 3' 境界域に B s i W I 部位を導入する。V H 領域は、5' 末端及び 3' 末端に H i n d I I I 及び B s i W I でなくそれぞれ N o t I 部位及び N h e I 部位が導入される点を除き、同様に生成される。

標準的な技術を用いて、増幅遺伝子生成物は、軽鎖及び重鎖の定常領域を含有する真核生物発現ベクターにそれぞれクローニングする。V L D N A 断片は H i n d I I I 及び B s i W I にて消化して、アンピシリンに対する耐性物質をコードする - ラクタマーゼ遺伝子及び大腸菌複製起点 (p U C) を含有する真核生物発現ベクターにライゲートする；結果として生じるプラスミドは設定した V L C L である。V H D N A 断片を N o t I 及び N h e I にて消化し、上記の V L 断片の導入によって生じる V L C L ベクターに導入する。結果として生じるプラスミドは、同じプラスミドに抗体の重鎖及び軽鎖の両方をコードする機

10

20

30

40

50

能的な発現カセットを含有する。ライゲートしたプラスミドを用いて大腸菌を形質転換する。プラスミドDNAは、これらのアンピシリン耐性の微生物集団から調製し、チャイニーズハムスター卵巣細胞又は他の哺乳類の細胞株に形質移入するために用いる。"Molecular Cloning", Sambrook等の実施例に記述されるように、形質移入及び細胞培養を標準的な方法によって行う。結果は、第VII因子mAb又は第VII因子AbのVH領域及びVL領域を含むmAbなど、対象の抗体分を安定して発現し、分泌する形質移入細胞株である。

抗体の変異体は容易に生成されうる。例えば、第VII因子-3F11A3、第VII因子-3F3A4及び第VII因子-3F20A1などと全く同じ特異性を有するがIgG4と異なるアイソタイプの抗体は、軽鎖定常領域及びIgG1又はIgG2又はIgG3の定常領域をコードするcDNAを含有するプラスミドに、対象のAbのVL及びVHをコードするcDNAをサブクローニングすることによって得ることができる。したがって、生成された抗体は任意のアイソタイプを有し得、次いで抗体は当分野で従来技術を用いて転換されるアイソタイプでもよい。このような技術には、直接組み換え技術(例として米国特許第4816397号参照)、細胞-細胞融合技術(例として米国特許第5916771号参照)、及び当分野で公知の他の好適な技術の使用が含まれる。したがって、本発明によって提供される抗体のエフェクター機能は、治療目的を含め様々な使用のために、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE又はIgM抗体へのアイソタイプの転換によって、親抗体のアイソタイプに関して「変化して」もよい。

【0069】

実施例2 サンドイッチELISAによる試料中の総第VIIa因子濃度の測定。

試料中の総第VII因子濃度の測定は、抗EGFドメイン抗体などの2つの異なるエピトープに対する任意の2つのモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAで測定することができる：

96ウェルマイクロプレート(Nalgene Nunc InternationalのC96 maxisorp Nunc-Immunoプレート)を、1µgのモノクローナルF9抗FVII(一次)を含む100µlのコーティングバッファ(0.1M NaHCO₃、pH9.8)にて4で終夜をかけてコートした。インキュベートの後、プレートを、350µlの洗浄バッファ(20mM Hepes、100mM NaCl、10mM CaCl₂、0.02% Tween 80、pH7.4)にて4回洗浄した。洗浄後、ウェルを、350µlのブロッキングバッファ(20mM Hepes、pH7.4、0.1M NaCl、10mM CaCl₂、1% BSA、0.02% Tween 80)にて2.5時間かけてブロックした。ブロッキングは、室温で振とうしながら行った。

1µg/mlのペルオキシダーゼにコンジュゲートしたモノクローナルF7抗FVII(二次)100µlを各々のウェルに加えた。

試料を希釈バッファ(20mM Hepes、pH7.4、0.1M NaCl、10mM CaCl₂、2mg/ml BSA、0.02% Tween 80)にておよそ20ngのFVII/mlに希釈し、20µlを各々のウェルに流し込んだ。また、0、5、10、20、30及び50ng/mlの二重の連続した標準物質と多くのコントロール物質を加えた。流し込んだ後、プレートを振とうテーブル上で室温で2時間インキュベートした。

【0070】

プレートの配置は以下の通りである：

表1 ELISAプレート配置。Std xx = 標準物質 xx ng/ml、C = コントロール、U = 試料。

表1

10

20

30

40

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blind	Std 30	C2	U3	U7	U11	U15	U19	U23	U27	C3	Std 20
B	Blind	Std 30	C2	U3	U7	U11	U15	U19	U23	U27	C3	Std 20
C	Std 5	Std 50	C3	U4	U8	U12	U16	U20	U24	U28	Blind	Std 30
D	Std 5	Std 50	C3	U4	U8	U12	U16	U20	U24	U28	Blind	Std 30
E	Std 10		U1	U5	U9	U13	U17	U21	U25	C1	Std 5	Std 50
F	Std 10		U1	U5	U9	U13	U17	U21	U25	C1	Std 5	Std 50
G	Std 20	C1	U2	U6	U10	U14	U18	U22	U26	C2	Std 10	

10

【 0 0 7 1 】

20

インキュベートの後、プレートを、 $350\mu\text{l}$ の洗浄バッファ(20mM H e p e s、 100mM N a C l、 10mM C a C l₂、 0.02% T w e e n 8 0、 $\text{pH}7.4$)を用いて5回洗浄した。 $100\mu\text{l}$ の基質(100mM O P D(オルト-フェニレンジアミン)、 50mM N a A cの 1mM H₂O₂、 1mM C a C l₂、 $\text{pH}5.2$)を各ウェルに加え、プレートを振とうテーブル上で室温で反応させ、高コントロールのODがおおよそ 1.2 に達したときに 1.25M H₂S O₄を添加して反応を止めた。プレートは、 492nm のフィルターを用いたE L I S Aプレート読み取り機にて読み取った。

図3に示される標準曲線を用いて各ウェルの第VII因子濃度を決定した。

【 0 0 7 2 】

30

実施例3 活性な第VIIa因子の産生のための産生パラメーターの調節

実施例2に記載の標準的なFVII E L I S Aを用いてFVIIの全体の産生についてバッチ又は連続的な細胞培養をモニタリングできる。インタクトなG L Aドメインを包含する特定の内容物及びそれによるFVIIの産生は、G L Aドメインに対する抗体及びFVIIの他のエピトープに対する抗体をベースとした、以下のサンドイッチE L I S Aアッセイを用いて決定されうる。

96ウェルマイクロプレート(Nalgene Nunc InternationalのC96 maxisorp Nunc-Immunoプレート)を、1ウェル当たり $5\mu\text{g}$ のモノクローナルF1抗FVII(一次)を含む $100\mu\text{l}$ のコティングバッファ($50\mu\text{g}/\text{ml}$ F 1 A 2 i、 20mM H e p e s、 100mM N a C l、 10mM C a C l₂、 $\text{pH}7.4$)にて4で終夜をかけてコートした。インキュベートの後、プレートを、 $350\mu\text{l}$ の洗浄バッファ(20mM H e p e s、 $\text{pH}7.4$ 、 0.1M N a C l、 10mM C a C l₂、 0.02% T w e e n 8 0)にて4回洗浄した。洗浄後、ウェルを、 $350\mu\text{l}$ のブロッキングバッファ(20mM H e p e s、 $\text{pH}7.4$ 、 0.1M N a C l、 10mM C a C l₂、 1% B S A、 0.02% T w e e n 8 0)にて2.5時間かけてブロックした。2.5時間かけて、室温で振とうしながらブロッキングを行った。

40

$1\mu\text{g}/\text{ml}$ のペルオキシダーゼにコンジュゲートしたモノクローナルF7抗FVII(二次) $100\mu\text{l}$ を各々のウェルに加えた。

試料を希釈バッファ(20mM H e p e s、 $\text{pH}7.4$ 、 0.1M N a C l、 10mM C a C l₂、 $2\text{mg}/\text{ml}$ B S A、 0.02% T w e e n 8 0)にておおよそ 75ng のFVII/ ml に希釈し、 $20\mu\text{l}$ を各々のウェルに流し込んだ。また、 0 、 20 、 30

50

、50、80、100及び130 ng/mlの二重の連続した標準物質と多くのコントロール物質を加えた。流し込んだ後、プレートを振とうテーブル上で室温で2時間インキュベートした。

【0073】

プレートの配置は以下の通りである：

表2 ELISAプレート配置。Std xx = 標準物質 xx ng/ml、C = コントロール、U = 試料。

表2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blind	Std 80	C2	U3	U7	U11	U15	U19	U23	U27	C3	Std 50
B	Blind	Std 80	C2	U3	U7	U11	U15	U19	U23	U27	C3	Std 50
C	Std 20	Std 100	C3	U4	U8	U12	U16	U20	U24	U28	Blind	Std 80
D	Std 20	Std 100	C3	U4	U8	U12	U16	U20	U24	U28	Blind	Std 80
E	Std 30	Std 130	U1	U5	U9	U13	U17	U21	U25	C1	Std 20	Std 100
F	Std 30	Std 130	U1	U5	U9	U13	U17	U21	U25	C1	Std 20	Std 100
G	Std 50	C1	U2	U6	U10	U14	U18	U22	U26	C2	Std 30	Std 130
H	Std 50	C1	U2	U6	U10	U14	U18	U22	U26	C2	Std 30	Std 130

10

20

30

【0074】

インキュベートの後、プレートを、350 µlの洗浄バッファ(20 mM HEPES、pH 7.4、0.1 M NaCl、10 mM CaCl₂、0.02% Tween 80)を用いて5回洗浄した。100 µlの基質(100 mM OPD(オルト-フェニレンジアミン)、50 mM NaAcの1 mM H₂O₂、1 mM CaCl₂、pH 5.2)を各ウェルに加え、プレートを振とうテーブル上で室温で反応させ、高コントロールのODがおよそ1.2に達したときに1.25 M H₂SO₄を添加して反応を止めた。プレートは、492 nmのフィルターを用いたELISAプレート読み取り機にて読み取った。

図4に示される標準曲線を用いて各ウェルの第VII因子濃度を決定した。

40

【0075】

実施例4 FVII培養をモニターするためのCDIの使用

カルシウム依存性指標(Calcium Dependent Index, CDI)は、少なくとも一のGLAドメイン特異的抗体(例えばFVII-3F11A3、FVII-3F3A4又はFVII-3F20A1)を用いたELISAにおいて応答するFVIIと抗EGF(例えばF7又はF9)などの任意の他の抗体を用いたELISAにおいて応答する総FVIIとの間の比率として定められる。

【0076】

実施例5 免疫親和性精製のための抗体の使用

20 mM Ca²⁺の存在下における免疫親和性精製の実施

10 mM Ca²⁺の濃度にカルシウムを加え、10 mMの濃度にトリスバッファを加

50

えて、その後 H C l にて p H 8 に調製することによって安定化した、1 0 0 0 m l の B H K - 2 1 培養物上清部分を 0 . 4 5 μ の dead-end フィルターにて濾過する。安定化した培養物上清を、Pharmaciaセファロース 4 B 上に固定した、Ca²⁺-依存性モノクローナル抗体 FVII-3 F 3 A 4 を充填したカラム(1 . 6 c m 内径 × 1 0 c m の長さ = 2 0 m l C V) に流し込む。流し込む前に、カラムを、1 0 m M CaCl₂、1 0 m M トリス、p H 8 の 5 C V にて平衡化する。流し込みの後で、カラムを、1 0 C V のために 2 M NaCl、1 0 m M CaCl₂、1 0 m M トリス、p H 8 にて洗浄する。結合した FVII は 3 0 m M E D T A、5 0 m M トリス、p H 8 の 1 0 C V にて溶出する。精製の間、1 2 C V / h の流速及び Celsius 5 の温度を用いる。溶出物はすぐに、塩化カルシウムを加えて 5 0 m M の終濃度に安定させる。

10

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1A】天然のヒトの第VII凝固因子の完全なアミノ酸配列(配列番号：1)を示す。

【図1B】天然のヒトの第VII凝固因子の完全なアミノ酸配列(配列番号：1)を示す。

【図2A】本発明に係る例示的な抗体の成熟した可変軽鎖(VL)領域及び可変重鎖(VH)領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

【図2B】本発明に係る例示的な抗体の成熟した可変軽鎖(VL)領域及び可変重鎖(VH)領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

【図3】記載したELISAアッセイの代表的な標準曲線を示す。

【図4】記載したELISAアッセイの代表的なln/ln標準曲線を示す。

20

【図5】異なる培養についての時間(日数)に応じたCDIを示す。

【図1A】

図1-天然のヒト第VII凝固因子のアミノ酸配列 (配列番号：1)

Ala-Asn-Ala-Phe-Leu-GLA-GLA-Leu-Arg-Pro-Gly-Ser-Leu-GLA-Arg-GLA-Cys-Lys-
 9 10 15
 GLA-GLA-Gln-Cys-Ser-Phe-GLA-GLA-Ala-Arg-GLA-Ile-Phe-Lys-Asp-Ala-GLA-Arg-
 20 25 30 35
 Thr-Lys-Leu-Phe-Trp-Ile-Ser-Tyr-Ser-Asp-Gly-Asp-Gln-Cys-Ala-Ser-Ser-Pro-
 40 45 50
 Cys-Gln-Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Lys-Asp-Gln-Leu-Gln-Ser-Tyr-Ile-Cys-Phe-Cys-
 55 60 65 70
 Leu-Pro-Ala-Phe-Glu-Gly-Arg-Asn-Cys-Glu-Thr-His-Lys-Asp-Asp-Gln-Ile-Ile-
 75 80 85 90
 Cys-Val-Asn-Glu-Asp-Gly-Gly-Cys-Glu-Gln-Tyr-Cys-Ser-Asp-His-Thr-Gly-Thr-
 95 100 105
 Lys-Arg-Ser-Cys-Arg-Cys-His-Glu-Gly-Tyr-Ser-Leu-Leu-Ala-Asp-Gly-Val-Ser-
 110 115 120 125
 Cys-Thr-Pro-Thr-Val-Glu-Tyr-Pro-Cys-Gly-Lys-Ile-Pro-Ile-Leu-Glu-Lys-Arg-
 130 135 140
 Asn-Ala-Ser-Lys-Pro-Gln-Gly-Arg-Ile-Val-Gly-Lys-Val-Cys-Pro-Lys-Gly-
 145 150 155 160
 Glu-Cys-Pro-Trp-Gln-Val-Leu-Leu-Leu-Val-Asn-Gly-Ala-Gln-Leu-Cys-Gly-Gly-
 165 170 175 180
 Thr-Leu-Ile-Asn-Thr-Ile-Trp-Val-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Phe-Asp-Iys-Ile-
 185 190 195
 Lys-Asn-Trp-Arg-Asn-Leu-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-His-Asp-Leu-Ser-Glu-His-
 200 205 210 215
 Asp-Gly-Asp-Glu-Gln-Ser-Arg-Arg-Val-Ala-Gln-Val-Ile-Ile-Pro-Ser-Thr-Tyr-
 220 225 230
 Val-Pro-Gly-Thr-Thr-Asn-His-Asp-Ile-Ala-Leu-Leu-Arg-Leu-His-Gln-Pro-Val-
 235 240 245 250
 Val-Leu-Thr-Asp-His-Val-Val-Pro-Leu-Cys-Leu-Pro-Glu-Arg-Thr-Phe-Ser-Glu-
 255 260 265 270
 Arg-Thr-Leu-Ala-Phe-Val-Arg-Phe-Ser-Leu-Val-Ser-Gly-Trp-Gly-Gln-Leu-Leu-
 275 280 285
 Asp-Arg-Gly-Ala-Thr-Ala-Leu-Glu-Lcu-Met-Val-Lcu-Asn-Val-Pro-Arg-Lcu-Met-
 290 295 300 305 310
 Thr-Gln-Asp-Cys-Leu-Gln-Gln-Ser-Arg-Lys-Val-Gly-Asp-Ser-Pro-Asn-Ile-Thr-
 310 315 320

【図1B】

Glu-Tyr-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Ser-Asp-Gly-Ser-Lys-Asp-Ser-Cys-Lys-Gly-
 325 330 335 340
 Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-His-Ala-Thr-His-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Iyr-Leu-Thr-Gly-
 345 350 355 360
 Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Gln-Gly-Cys-Ala-Thr-Val-Gly-His-Phe-Gly-Val-Tyr-Thr-
 365 370 375
 Arg-Val-Ser-Gln-Tyr-Ile-Glu-Trp-Leu-Gln-Lys-Leu-Met-Arg-Ser-Glu-Pro-Arg-
 380 385 390 395
 Pro-Gly-Val-Leu-Leu-Arg-Ala-Pro-Phe-Pro
 400 405 406

【 図 2 A 】

モノクローナル抗体 FVII-3F3A4

>FVII-3F3A4の成熟可変軽鎖のヌクレオチド配列 (配列番号 :2)
gacatccagatgaaccagctccatccagctgtctgcatccctggagacacaaattaccatcactgccc
atgccagtcagaaacattaalgtttgtaagctgtgaccagcagaaccaggaaatattcctaagaait
gtctalaaggcttccaacttgcaacaggcgtccatcaagtttagtgccagtggtatcgggaacagct
ttcacattaacalcagcagcctgcagcctgaagacattgccacttactgcaacagggtcaaaagt
ctcctcactgtcggctgggaccaagctgagctgaaacgg

>FVII-3F3A4の成熟可変重鎖の翻訳 (配列番号 :3)

DIQMNQSPSSLSASLGDITITCHASQNNVWLSWYQQKPGNIPKELIYKASNLHTGVPSRFS
SGSGSTRFTLNISLQPEDIATYYCCQGGSSPLTFGAGTKLELKR

>FVII-3F3A4の成熟可変重鎖のヌクレオチド配列 (配列番号 :4)

gaagtcagctggtagctggggaggcttaggaagcctggaggctcctgaaactcctctgtgcag
cctctggattcgttccagtagttaigacatgcttgggttcgacagcctcggagaagaggctggagtg
ggctgcatacattagtagtgggtgtaaacactatccagactctggaagggccgattcaccatc
tccagagacaatccaagaacacctgtaccctgcaaatgagcagctggaagctgaggacacagccatgt
attaactgcaagacatgagtagcttactatctgtatgtagcactctgggtcaaggaacctcagt
caccgtctcctca

>FVII-3F3A4の成熟可変重鎖の翻訳 (配列番号 :5)

QVQLQQPQGAELVKPGASVKMSCKASGYTFIYNMHWIKQTPGGLEWIGAIYPNGDTSY
NQKFKGKATLADRSSSTAYMHLSSLTSEDSAVVYCARADDGFDYWGQGTTLTVSS

モノクローナル抗体 FVII-3F20A1

>FVII-3F20A1の成熟可変軽鎖のヌクレオチド配列 (配列番号 :6)

gacatcctgatgaccaactccatcctcactgtctgtatctctggagacacagcagcactcactgccc
aagcaagtcaggcattagcaglaalataagggtagctgagcagagaaccaggaaatcattaaggcct
ggctatcatgcaaccaactgtgatggagttccatcaagttcagtgccagctgagctggagcagat
tattctcaccatcaccagcctggaatctgaagatttgcagacttactgtagcagatgctcagt
ttccgtcaagcttgggtgtaggaccaactggagctgaaacgg

>FVII-3F20A1の成熟可変重鎖の翻訳 (配列番号 :7)

DILMTQSPSSMSVSLGDVTISITCQASQGSISSNIGWLQQKPGKSFKGLVYHATNLDDGVPSRF
SGSGSGADYSLTITSLSEEDFADYVCVQYAAQPLTFVGVGKLELKR

>FVII-3F20A1の成熟可変重鎖のヌクレオチド配列 (配列番号 :8)

caggtagcagctgaaggagtcaggacctggcctggtagccctcagagacagcctgctccatcactgcaact
ctcagggttctcattaaccacctatggtgtaagttgcttgcagcctccaggaaagggctggaagtg
gctgggactaaltatggggtagcaggagacacaaitcattcagctcatatccagactgaccatcagc
aaggataacfccagagccaagtttctaaactgaaacagctgcaactgtagcagcagcagccagctact
actgtgccaacacagggaatcaccattctttactgtagggccaagggactgtgtcactgtctct

【 図 2 B 】

>FVII-3F20A1の成熟可変重鎖の翻訳 (配列番号 :9)

QVQLKESGFGPLVAPSQSLTCTVSGFSLTTYGVSWLRQPPGKLEWLGLIWGDGSTNYH
SALISRLTISKDNSKSVQVFLKLNLSLHTDDTATYCAKQGITFFSYWQGGTLTVTS

モノクローナル抗体 FVII-3F11A3

>FVII-3F11A3の成熟可変軽鎖のヌクレオチド配列 (配列番号:10)

gacatccagatgactcagctccagctcactgtctgcatctgtgggagaaactgcaaccatcacatgtg
gagcaagtgagaatalltacgggtcttaaalgglatcagcggaaaccagggaatctcctcagctcct
gatctatgggtcaaccaactgacagatggatgctatcaggggtcagtgccagtgatctgtagacag
tattctcagaatcagtagcctgcatcctgacagatgtgcaacgttatactgcaaaatgttgaacta
ctccgctcagcttgggtctgggaccaagctggaagctgaaacgg

>FVII-3F11A3の成熟可変重鎖の翻訳 (配列番号:11)

DIQMTQSPASLSASVGETVTITTCGASENIY GALNWYQRKQGGKSPQLLIYGATNLADGMSSRF
SGSGSGRQYSLKISSLHPDDVATYYCQNVLTPTLTFGAGTKLELKR

>FVII-3F11A3の成熟可変重鎖ヌクレオチド配列 (配列番号:12)

gaagtcagctggtagctggggaggcttaggaagcctggagggtcctgaaactcctctgtgcag
cctctggattcgttccagtagttaigacatgcttgggttcgacagcctcggagaagaggctggagtg
ggctgcatacattagtagtgggtgtaaacactatccagactctggaagggccgattcaccatc
tccagagacaatccaagaacacctgtaccctgcaaatgagcagctggaagctgaggacacagccatgt
attaactgcaagacatgagtagtagccttactatctgtatgtagcactctgggtcaaggaacctcagt
caccgtctcctca

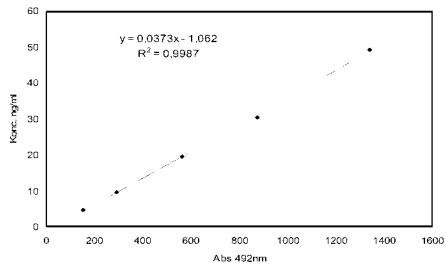
>FVII-3F11A3の成熟可変重鎖の翻訳 (配列番号:13)

EVQLVESGGGLVLPKPGSLKLSCAASGFATSSYDMSWVRQTPKEKRLWVAYISSGGNTYY
PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHEVWVAYYYGMDYWGQGTSTVTVSS

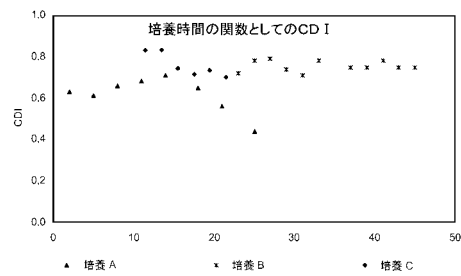
実施例 1に係る組み換え抗体の産生に使用する
ためのヌクレオチドプライマー

- 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (配列番号 :14)
5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3' (配列番号 :15)
5'-GCAGGCACACAACAGAGGCAGTTCAGATTTC-3' (配列番号 :16)
5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (配列番号 :17)
5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3' (配列番号 :18)
5'-GTGCCAGGGGGAAGACCGTATGGG-3' (配列番号 :19)
5'-GTA AACGACGGCCAG-3' (配列番号 :20)
5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (配列番号 :21)

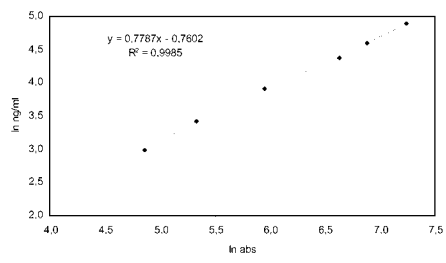
【 図 3 】



【 図 5 】



【 図 4 】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2006/065864

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAZAMA Y ET AL: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEOLYTIC FRAGMENTS OF HUMAN FACTOR VIIA WHICH INHIBIT THE TISSUE FACTOR-ENHANCED AMIDOLYTIC ACTIVITY OF FACTOR VIIA*" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 268, no. 22, 5 August 1993 (1993-08-05), pages 16231-16240, XP000561807 ISSN: 0021-9258 page 16232, right-hand column	1-23
X	PERSSON E ET PETERSON L C: "Structurally and functionally distinct Ca ²⁺ binding sites in the gamma-carboxyglutamic acid-containing domain of factor VIIa" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 234, no. 1, 15 November 1995 (1995-11-15), pages 293-300, XP002101115 ISSN: 0014-2956 cited in the application pages 3,5,6	1-23
X	LUND-HANSEN ET AL.: "A double monoclonal ELISA for human coagulation factor VII" THROMB. HAEMOSTAS, vol. 62, 1989, page 55A, XP009062107 abstract	1-23
A	WO 2004/083421 A (NOVO NORDISK AS [DK]; KRARUP JANUS [DK]; PERSSON EGON [SE]) 30 September 2004 (2004-09-30) page 33; examples 1-24 especially examples 20, 21	1-23
A	NAKAGAKI T ET AL: "INITIATION OF THE EXTRINSIC PATHWAY OF BLOOD COAGULATION EVIDENCE FOR THE TISSUE FACTOR DEPENDENT AUTOACTIVATION OF HUMAN COAGULATION FACTOR VII" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, vol. 30, no. 45, 1991, pages 10819-10824, XP002308006 ISSN: 0006-2960 page 10820, left-hand column	1-23

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2006/065864

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	INOUE KEISUKE ET AL: "High-affinity calcium-binding site in the gamma-carboxyglutamic acid domain of bovine factor VII" BIOCHEMISTRY, vol. 35, no. 43, 1996, pages 13826-13832, XP002368563 ISSN: 0006-2960 the whole document	1-23
A	HAGEN F S ET AL: "CHARACTERIZATION OF A CDNA CODING FOR HUMAN FACTOR VII" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 83, no. 8, April 1986 (1986-04), pages 2412-2416, XP009025261 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document	1-23
A	WO 85/01941 A (NEW ENGLAND MEDICAL CENTER INC [US]) 9 May 1985 (1985-05-09) page 8; claims 1-16	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP2006/065864**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-23 (all partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/EP2006 /065864

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims 1-23 (all partially)

A monoclonal antibody to human FVII as defined in claim 1 and characterised by Seq ID Nos 3 and 5; a nucleic acid encoding said monoclonal Ab; a vector comprising said nucleic acid; a cell comprising said vector; methods using said monoclonal antibody.

Invention 2 and 3: Claims 1-23 (all partially)

Idem as invention 1 but each of inventions 2 and 3 limited to Seq ID Nos 7 and 9 or 11 and 13, respectively

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/065864

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004083421 A	30-09-2004	AU 2004221758 A1	30-09-2004
		CA 2519020 A1	30-09-2004
		EP 1611236 A1	04-01-2006
		JP 2006520200 T	07-09-2006
		KR 20050110016 A	22-11-2005
		MX PA05009770 A	17-11-2005
WO 8501941 A	09-05-1985	AT 111490 T	15-09-1994
		DE 3486350 D1	20-10-1994
		DE 3486350 T2	16-03-1995
		EP 0162078 A1	27-11-1985
		JP 5077679 B	27-10-1993
		JP 61500226 T	06-02-1986

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00		A
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53		D
G 0 1 N	33/577	(2006.01)	G 0 1 N	33/577		B
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	Z N A	

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

(72)発明者 ニコライセン, エルセ, マリエ
デンマーク国 ディーケー - 2 0 0 0 フレデリクスベルグ, マリエンダルスヴェイ 2 3 エ
ー, 4 . 5 0 3

(72)発明者 クララブ, ジャヌス
デンマーク国 ディーケー - 2 8 2 0 ゲントフテ, ロークスヴェイ 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA43 CA04 DA02 GA11
4B064 AG27 CA19 CC24 DA01
4B065 AA91X AA94Y AB01 BA02 CA25 CA44 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA24 FA74 GA26

专利名称(译)	因子VII特异性抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2009505673A	公开(公告)日	2009-02-12
申请号	JP2008528522	申请日	2006-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	诺沃挪第克公司		
申请(专利权)人(译)	诺和诺德医疗保健公司		
[标]发明人	ピンゲルハンスクルト ニコライセンエルセマリエ クララブジャヌス		
发明人	ピンゲル, ハンス, クルト ニコライセン, エルセ, マリエ クララブ, ジャヌス		
IPC分类号	C12N15/02 C07K16/36 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/36 C07K2317/56 C07K2317/565		
FI分类号	C12N15/00.C C07K16/36 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A G01N33/53.D G01N33/577.B C12P21/08.ZNA		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA11 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA91X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA24 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	2005107963 2005-08-31 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及抗因子VII的新抗体，用于测定样品中正确折叠的完整因子VII的量，以及用于优化用途和纯化方法的用途。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blind	Std 30	C2	U3	U7	U11	U15	U19	U23	U27	C3	Std 20
B	Blind	Std 30	C2	U3	U7	U11	U15	U19	U23	U27	C3	Std 20
C	Std 5	Std 50	C3	U4	U8	U12	U16	U20	U24	U28	Blind	Std 30
D	Std 5	Std 50	C3	U4	U8	U12	U16	U20	U24	U28	Blind	Std 30
E	Std 10		U1	U5	U9	U13	U17	U21	U25	C1	Std 5	Std 50
F	Std 10		U1	U5	U9	U13	U17	U21	U25	C1	Std 5	Std 50
G	Std 20	C1	U2	U6	U10	U14	U18	U22	U26	C2	Std 10	