

(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2004-516236

(P2004-516236A)

(43) 公表日 平成16年6月3日(2004.6.3)

(51) Int.Cl.⁷

A 61 K 39/395

A 61 K 38/46

A 61 P 7/02

F 1

A 61 K 39/395

A 61 P 7/02

A 61 K 37/54

テーマコード(参考)

4 C 08 4

4 C 08 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 203 頁)

(21) 出願番号	特願2001-583806 (P2001-583806)	(71) 出願人	591002957 スミスクライン・ビーチャム・コーポレイ ション SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION アメリカ合衆国ペンシルベニア州1940 6-0939、キング・オブ・ブルシア、 スウェードランド・ロード709番
(86) (22) 出願日	平成12年10月5日 (2000.10.5)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 葵
(85) 翻訳文提出日	平成14年11月15日 (2002.11.15)	(74) 代理人	100086405 弁理士 河宮 治
(86) 國際出願番号	PCT/US2000/027438	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(87) 國際公開番号	W02001/087339		
(87) 國際公開日	平成13年11月22日 (2001.11.22)		
(31) 優先権主張番号	09/571,434		
(32) 優先日	平成12年5月15日 (2000.5.15)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗血栓剤

(57) 【要約】

本発明は、抗血栓剤としてのモノクローナル抗体に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

抗 - IX 因子抗体または抗体フラグメントを投与することを含む、動物の血栓塞栓後に誘発される虚血を治療する方法。

【請求項 2】

抗 - IX 因子抗体または抗体フラグメントが塞栓後に投与される請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

抗 - IX 因子抗体または抗体フラグメントが発作後に投与される請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

抗 - IX 因子抗体または抗体フラグメントが SB 2 4 9 4 1 3 、 SB 2 4 9 4 1 5 、 SB 2 4 9 4 1 6 、 SB 2 4 9 4 1 7 、 SB 2 5 7 7 3 1 または SB 2 5 7 7 3 2 の識別特性を有する請求項 1 記載の方法。 10

【請求項 5】

抗 - IX 因子抗体または抗体フラグメントが SB 2 4 9 4 1 7 の識別特性を有する請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

SB 2 4 9 4 1 7 を投与することを含む、動物の血栓塞栓後に誘発される虚血を治療する方法。

【請求項 7】

抗 - IX 因子抗体または抗体フラグメントをプラスミノーゲンアクチベーターとの組み合 20
わせにおいて投与することを含む動物の血栓塞栓後に誘発される虚血を治療する方法。

【請求項 8】

抗 - IX 因子抗体または抗体フラグメントおよびプラスミノーゲンアクチベーターが塞栓後に投与される請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

抗 - IX 因子抗体または抗体フラグメントおよびプラスミノーゲンアクチベーターが発作後に投与される請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

抗 - IX 因子抗体または抗体フラグメントが SB 2 4 9 4 1 3 、 SB 2 4 9 4 1 5 、 SB 2 4 9 4 1 6 、 SB 2 4 9 4 1 7 、 SB 2 5 7 7 3 1 または SB 2 5 7 7 3 2 の識別特性を有する請求項 7 記載の方法。 30

【請求項 11】

抗 - IX 因子抗体または抗体フラグメントが SB 2 4 9 4 1 7 の識別特性を有する請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

血栓溶解剤が t P A 、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼまたはその変種である請求項 7 記載の方法。

【請求項 13】

血栓溶解剤が t P A である請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

SB 2 4 9 4 1 7 を t P A との組み合わせにおいて投与することを含む動物の血栓塞栓後に誘発される虚血を治療する方法。 40

【請求項 15】

抗 - IX 因子抗体または抗体フラグメントを血栓溶解剤との組み合わせにおいて投与することを含む動物の血栓塞栓後に誘発される虚血の治療において血栓溶解剤の必要とされる投与量を減少させる方法。

【請求項 16】

抗 - IX 抗体または抗体フラグメントが、 SB 2 4 9 4 1 3 、 SB 2 4 9 4 1 5 、 SB 2 4 9 4 1 6 、 SB 2 4 9 4 1 7 、 SB 2 5 7 7 3 1 または SB 2 5 7 7 3 2 の識別特性を有する請求項 15 記載の方法。 50

【請求項 17】

抗 - IX 因子抗体または抗体フラグメントが SB249417 の識別特性を有する請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

血栓溶解剤が tPA 、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼまたはその変種である請求項 15 記載の方法。

【請求項 19】

血栓溶解剤が tPA である請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

抗 - IX 因子抗体または抗体フラグメントを血栓塞栓性発作の危険性がある動物に投与することを含む動物における血栓塞栓性発作を予防する方法。 10

【請求項 21】

抗 - XI 因子抗体または抗体フラグメントが SB249413 、 SB249415 、 SB249416 、 SB249417 、 SB257731 または SB257732 の識別特性を有する請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

抗 IX 因子抗体または抗体フラグメントが SB249417 の識別特性を有する請求項 20 記載の方法。

【請求項 23】

SB249417 を血栓塞栓性発作の危険性のある動物に投与することを含む血栓塞栓性発作の予防法。 20

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は、ヒト凝固因子または補因子 (cofactor) と結合するモノクローナル抗体 (mAb) および血栓症の阻害剤としてのその使用に関する。 30

【0002】**(従来技術)**

正常な環境下では、血管の内側を覆う血管内皮細胞が傷つくと、多かれ少なかれ、一般に凝集「カスケード」と称される一連の事象を介して止血応答が引き起こされる。そのカスケードは、可溶性フィブリノーゲンの不溶性フィブリンへの変換にて最高潮に達し、その不溶性フィブリンは血小板と一緒にになって、血液成分の管外溢出を防ぐ局在する血塊または血栓を形成する。そして、創傷治癒が起こり、その後、血塊が分解し、血管の完全性および血流が回復される。

傷害と血塊形成の間に起こる事象は、慎重に制御され、かつ関連している一連の反応である。簡単には、多数の不活性なプロ酵素の形態における血漿凝集蛋白および補因子が血液中を循環する。活性な酵素複合体が傷害部位で集まり、続いてセリンプロテアーゼに活性化され、それぞれの連続するセリンプロテアーゼは次にその後に続くプロ酵素のプロテアーゼへの活性化を触媒して、プロテアーゼを活性化する。この酵素カスケードにより、各工程が次の工程の効果を強めることになる。凝集カスケードの総説については、「Thrombosis and Hemorrhage」, J. Loscalzo and A. Schafer, eds., Blackwell Scientific Publications, Oxford, England (1994) の第一章を参照のこと。 40

【0003】

効果的な凝固は傷害部位における血液の損失を制限する一方で、静脈または動脈中の不適当な血栓の形成は疾病および死亡の一般的な原因である。異常な凝固活性は、心筋梗塞、不安定アンギナ、心房細動、発作、腎臓損傷、経皮冠動脈形成術、播種性血管内凝固症候群、敗血症、肺塞栓症および深静脈血栓症などの病状または治療をもたらし、および/または、その病状または治療より由来しうる。人工心臓弁などの人工臓器、シャントおよび補綴の外来物質の表面上の血塊の形成もまた、問題がある。 50

卒中は死に至ることが多く、一般的には恒久的な障害の原因となる。卒中の神経障害につながる急性局所性脳虚血は、血栓塞栓により引き起こされることが最も多い。血栓は心臓性原因およびアテローマから生じる可能性がある。イン・サイチュ血栓症は大外脳供給血管において起こり得る。研究により、これを越えると著しい不可逆性神経損傷および持続性神経障害が起こる脳動脈閉塞後の一定期間が示唆されている。Stroke Therapy: Basic, Preclinical, and Clinical Directions, pp. 355-381, ed. L.P. Miller, Wiley-Liss, Inc. (1999) 第14章を参照のこと。

【0004】

これらの病状および他の血栓性および塞栓性障害の治療において現在用いられる承認された抗凝固剤には、硫酸ヘテロポリサッカライドヘパリンおよび低分子量(LMW)ヘパリンが含まれる。これらの薬剤は、非経口投与され、トロンビン阻害剤、アンチトロンビンIIIの活性化およびすべての凝固因子の不活性化によって迅速かつ完全な凝固阻害を引き起こすことができる。

しかしながら、その效能のために、ヘパリンおよびLMWヘパリンは欠点がある。単純な動作のストレスとそれに伴う手術部位での物質との接触の結果として、出血を制御できないことが主な合併症であり、連続注入を受けている患者の1~7%において、および、間欠性ボーラス投与を受けている患者の8~14%において観察される。この危険を最小とするため、サンプルを連続的に採取し、エキソビボにて凝固時間を連続的にモニターできるようするが、これにより実質的な治療のコストが上がり、患者に不都合である。

【0005】

さらに、患者を出血の危険にさらすことなく所望の效能レベルに達するための目標とする治療範囲は狭い。その治療範囲は、約1ないし3ugヘパリン/m1未満であり、これにより、活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)アッセイ時間は約35~約100秒となる。ヘパリン濃度を3μg/m1に増加させると目標範囲を上回り、4ug/m1よりも高い濃度では、凝固活性が検出されない。従って、患者の血漿濃度を治療範囲内に維持するために非常に慎重にしなければならない。

よりゆっくりと、より長時間持続効果を有する別の承認された抗凝固剤は、クマリン誘導体であるワルファリンである。ワルファリンは、プロトロンビンのビタミンK依存性翻訳後修飾および他のビタミンK依存性凝固因子と競合することにより作用する。

【0006】

治療範囲よりもわずかに高いだけの濃度において血液が凝固できなくなる抗凝固作用の一般的なパターンは、ワルファリンならびにヘパリンおよびLMWヘパリンについて見られる。

急性心筋梗塞(MI)において、血栓溶解療法の主な目的は、梗塞血管を早期に、かつ持続的に再灌流することを含む。本発明の急性MIの治療法は、プラスミノーゲンアクチベーター、例えば組織型プラスミノーゲンアクチベーター(tPA)またはストレプトキナーゼおよび抗凝固薬、例えば未分画ヘパリン(unfractionated heparin)、低分子量ヘパリンまたは直接トロンビン阻害剤または抗血小板薬、例えばアスピリンまたは血小板糖蛋白IIb/IIIaプロッカーの両方を含む。Topol, Am Heart J, 136, S66-S68 (1998)を参照のこと。この治療法の組み合わせは、血塊形成および溶解は動的プロセスであり、トロンビン活性および生成は閉塞性血栓の形成後および血塊の溶解中および溶解後も継続するという観察に基づく。Grangerら、J Am Coll Cardiol, 31, 497-505 (1998)を参照のこと。

【0007】

急性MIの最適治療法は依然として困難で、利用可能な薬剤および治療法は陰性および陽性の両方の特性を示す。例えば、フィブリン結合トロンビンはヘパリンによる阻害に感受性でなく(Beckerら、"Chemistry and Biology of Serpins", Plenum Press, New York (1997) 第6章を参照

10

20

30

40

50

のこと)、トロンビン活性はヘパリン治療を中止した後に再増加を示し、ヘパリンの中止後24時間以内に再梗塞の増大が観察される。Watkinsら、Catheterization and Cardiovascular Diagnosis, 44, 257-264 (1998)およびGranger, Circulation, 91, 1929-1935 (1995)を参照のこと。さらに、抗血小板薬は出血または血小板減少を伴う可能性がある。

さらに、多くの臨床試験により高投与量の血栓溶解剤は血漿止血マーカーにおける顕著な変更につながる。Ratoら、J Clin Invest, 101, 10-14 (1998); Bovillら、Ann Int Med, 115, 256-265 (1991); Neuhausら、J Am Coll Cardiol, 19, 885-891 (1992)を参照のこと。tPAの濃度の増大は血塊溶解の向上につながり、これらの止血マーカーにおける変更は、血栓療法の欠点、特に重度の出血の発生率の増大に反映する。

血栓塞栓性発作の場合において、血栓溶解療法は、不可逆性損傷を防止するために発作症状の開始後早期(3時間以内)に用いられる。虚血および/または梗塞組織の再灌流に現在認可されている血栓溶解剤としては、プラスミノーゲンアクチベーター-tPA、ウロキナーゼおよびストレプトキナーゼが挙げられる。しかしながら、血栓溶解療法は危険な出血を伴う傾向にあり、血栓塞栓性発作における血栓溶解療法の主な問題は、治療が出血を誘発することにより虚血性傷害を悪化させるであろうことである。

明らかに、止血機能を維持しながら血栓性障害の抑制において効果的な抗凝固剤が必要とされている。

【0008】

(発明の開示)

本発明の一態様は、動物の血栓塞栓後に誘発される虚血を治療する方法であって、抗-IgX因子抗体または抗体フラグメントを投与することを含む方法である。

本発明のもう一つの態様は、動物の血栓塞栓後に誘発される虚血を治療する方法であって、抗-IgX因子抗体または抗体フラグメントをプラスミノーゲンアクチベーターとの組み合わせにおいて投与することを含む方法である。

本発明のもう一つの態様は、動物の血栓塞栓後に誘発される虚血の治療において必要とされる血栓溶解剤の量を減少させる方法であって、抗-IgX因子抗体または抗体フラグメントを血栓溶解剤との組み合わせにおいて投与することを含む方法である。

本発明のさらにもう一つの態様は、動物において血栓塞栓性卒中を防止する方法であって、抗-IgX因子抗体または抗体フラグメントを血栓塞栓性卒中の危険がある動物に投与することを含む方法である。

【0009】

(発明を実施するための最良の形態)

限定するものではないが特許および特許出願を含む、本明細書において引用したすべての出版物は、完全に記載されているかのように出典明示により本明細書に含まれる。

【0010】

本発明は、自己限定期中和活性により特徴づけられる、凝固因子に対するさまざまな抗体、改変された抗体およびそのフラグメントを提供する。好ましくは、凝固因子は内因性経路から共通凝固経路までである。最も好ましくは、抗凝固因子抗体は、抗-IgX因子、抗-IgXa因子、抗-X因子、抗-Xa因子、抗-XI因子、抗-XIa因子、抗-VII因子、抗-VIIa因子、抗-VIII因子、抗-Va因子、抗-VIIa因子、抗-VIIa因子、抗トロンビンまたは抗プロトロンビンである。特に好ましいのは、抗-IgX因子抗体である。抗凝固因子抗体の例は、ヒトIX因子に対するヒト化モノクローナル抗体SB249413、SB249415、SB249416、SB249217、SB257731およびSB257732、ヒトIX因子に対するキメラモノクローナル抗体chF IX、ヒトIX因子および/またはヒトIXa因子に対するネズミモノクローナル抗体BC1、BC2、9E4(2)F4および11G4(1)B9あるいはそれぞれヒトIX因

子およびX I 因子に対するネズミモノクローナル抗体H F X L C およびH F X I である。特に好ましいのは、抗ヒトI X 因子モノクローナル抗体S B 2 4 9 4 1 7 である。

【0 0 1 1】

本発明の抗体は、通常のハイブリドーマ技術、ファージディスプレーコンビナトリアルライブラリー、免疫グロブリンチェーンシャッフリングおよびヒト化技術により調製することができ、新規な自己限定的中和抗体を生成する。また、自己限定的中和活性を有する完全ヒトm A b s も含まれる。これらの生成物は、心筋梗塞、不安定アンギナ、心房細動、発作、腎損傷、肺塞栓症、深静脈血栓症、経皮的冠動脈形成術、播種性血管内凝固、敗血症、人工臓器、シャントまたはプロテーゼに関連する血栓性および塞栓性障害の治療および医薬組成物において有用である。

本明細書において使用される場合、「自己限定的中和活性」なる用語は、好ましくは内因性から共通経路までの、I X / I X a 因子、X / X a 因子、X I / X I a 因子、V I I I / V I I I a 因子およびV / V a 因子、V I I / V I I a 因子およびトロンビン/プロトロンビンを含むヒト凝固因子と結合し、凝固が限定的に調節されるような方法で血栓症を阻害する抗体の活性を意味する。「凝固の限定調節」とは、活性化部分トロンボプラスチン時間(a P T T)の延長により測定される凝固時間の増加として定義され、ここにおいて、血漿は、モノクローナル抗体の濃度が増大するにもかかわらず最大値に到達するa P T Tと依然として血塊を形成できる。この凝固の限定された調節は、濃度が増加するヘパリンの存在下で血漿は血塊を形成できなくなり、無限のa P T Tを示すのと対照的である。好ましくは、本発明の方法の最大a P T T 値は、ヘパリン治療範囲内である。最も好ましくは、最大a P T T は約35秒から約100秒の間であり、これは正常な対照a P T T 値の約1.5倍から約3.5倍に相当する。本発明の一例において、a P T T はプロトロンビン時間(P T)を著しく延長することなく延長される。

【0 0 1 2】

「との組み合わせにおいて」なる句は、1回の治療過程において治療薬をもう一つ別の治療薬の投与前、後または同時に投与することを意味する。

「改変された抗体」とは、改変された免疫グロブリンコーディング領域によりコードされる蛋白を意味し、これは選択された宿主細胞における発現により得ることができる。かかる改変された抗体は、操作された抗体(例えば、キメラまたはヒト化抗体)あるいは例えばF v 、F a b 、F a b ' またはF (a b ')₂などの免疫グロブリン定常領域がすべてまたはその一部が欠失した抗体フラグメントである。

「改変された免疫グロブリンコーディング領域」とは、本発明の改変された抗体をコードする核酸配列を意味する。改変された抗体がC D R - グラフトまたはヒト化抗体である場合、非ヒト免疫グロブリンから相補性決定領域(C D R)をコードする配列を、ヒト可変フレームワーク配列を含む第一免疫グロブリンパートナー中に挿入する。所望により、第一免疫グロブリンパートナーは第二免疫グロブリンパートナーと操作可能に連結される。

【0 0 1 3】

「第一免疫グロブリンパートナー」とは、未変性(または天然に存在する)C D R - コード化領域がドナー抗体のC D R - コード化領域により置換されているヒトフレームワークまたはヒト免疫グロブリン可変領域をコードする核酸配列を意味する。ヒト可変領域は免疫グロブリン重鎖、軽鎖(または両鎖)、類似体またはその機能的フラグメントであってもよい。かかるC D R領域は、抗体(免疫グロブリン)の可変領域内に位置し、当該分野において公知の方法により決定できる。例えば、Kabat et al. "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 4th Ed., U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)はC D Rについての位置決めの規則を開示している。加えて、C D R領域/構造を同定するために有用なコンピュータプログラムは公知である。

【0 0 1 4】

「第二免疫グロブリンパートナー」とは、第一免疫グロブリンパートナーがフレーム内で

10

20

30

40

50

、または任意の通常のリンカー配列により融合した（すなわち、操作可能に連結された）蛋白またはペプチドをコードするもう一つのスクレオチド配列を意味する。好ましくは、これは免疫グロブリン遺伝子である。第二免疫グロブリンパートナーは、目的とする同じ（すなわち、第一および第二の改変された抗体は同じ供給源から得られるホモローガスな）または追加的（すなわち、ヘテロローガスな）抗体の全体的な定常領域をコードする核酸配列を含む。これは免疫グロブリン重鎖または軽鎖（あるいは一つのポリペプチドの一部としての両鎖）であってもよい。第二免疫グロブリンパートナーは特定の免疫グロブリン種またはイソ型に限定されない。加えて、例えば、F_{ab}、またはF(ab)₂（すなわち、適当なヒト定常領域またはフレームワーク領域の独立した部分）においてみられるような第二免疫グロブリンパートナーは免疫グロブリン定常領域の一部を含んでもよい。このような第二免疫グロブリンパートナーは、例えば、ファージディスプレーライブリバーの一部、または分析または診断検出のために蛋白をコードする配列、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼなどとして、さらに宿主細胞の外側表面に露出した内在性膜蛋白をコードする配列も含む。

10

【0015】

F_v、F_c、F_d、F_{ab}、F_{ab'}またはF(ab')₂なる用語は、その標準的の意味について用いられる。例えば、Harlow et al. "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1988)を参照のこと。

20

本明細書において用いられる場合、「操作された抗体」は、改変された抗体の一種、すなわち、選択されたアクセプター抗体の軽および/または重鎖可変領域の一部が、選択されたエピトープに対する特異性を有する1以上のドナー抗体の類似した部分により置換されている完全長合成抗体（例えば、抗体フラグメントに対抗するものとしてのキメラまたはヒト化抗体）を表す。例えば、かかる分子は、未修飾軽鎖（またはキメラ軽鎖）と関連したヒト化重鎖により特徴づけられるか抗体を含むか、またはその逆である。操作された抗体はさらに、ドナー抗体結合特異性を保持するために、アクセプター抗体軽および/または重鎖可変ドメインフレームワーク領域をコードする核酸配列の変更によっても特徴づけられる。これらの抗体は、アクセプター抗体からの1以上のCDR（好ましくはすべて）を本明細書に記載されるドナー抗体からのCDRで置換することを含む。

30

【0016】

「キメラ抗体」とは、アクセプター抗体由来の軽および重鎖定常領域と関連したドナー抗体由来の天然に存在する可変領域（軽鎖および重鎖）を含む操作された抗体の一種を意味する。

「ヒト化抗体」とは、非ヒトドナー免疫グロブリン由来のCDRを有する操作された抗体の一種を意味し、分子の残りの免疫グロブリン由来の部分は1以上のヒト免疫グロブリン由来である。加えて、フレームワーク支持残基は、結合親和性を保存するために変更することができる。例えば、Queenら、Proc Natl Acad Sci USA, 86, 10029-10032 (1989), Hodgsonら、Bio/Technology, 9, 421 (1991)を参照のこと。

40

「ドナー抗体」なる用語は、改変された免疫グロブリンコーディング領域および結果として得られる、ドナー抗体に特徴的な抗原特異性および中和活性を有する、発現され、改変された抗体を提供するために、その可変領域、CDRまたは他の機能的フラグメントまたはその類似体の核酸配列に寄与する第一免疫グロブリンパートナーに対するモノクローナルまたは組換え抗体を意味する。本発明における使用に好適な一つのドナー抗体は、BC2と称するネズミ自己限定的中和モノクローナル抗体である。他の好適なドナー抗体としては、BC1、9E4(2)F4、11G4(1)B9、HFXLCおよびHFXIと称するネズミ自己限定的中和モノクローナル抗体が挙げられる。

【0017】

「アクセプター抗体」なる用語は、ドナー抗体とヘテロローガスなモノクローナルまたは組換え抗体を意味し、これは第一免疫グロブリンパートナーに対する重および/または軽

50

鎖フレームワーク領域および／またはその重および／または軽鎖定常領域をコードする核酸配列の全部、または一部に寄与する。好ましくは、ヒト抗体はアクセプター抗体である。

「 C D R 」は、免疫グロブリン重および軽鎖の超可変領域である、抗体の相補性決定領域アミノ酸配列として定義される。例えば、Kabat ら、" Sequences of Proteins of Immunological Interest " , 4th Ed . , U. S. Department of Health and Human Services , National Institutes of Health (1987) を参照のこと。免疫グロブリンの可変部分において 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖 C D R または C D R 領域が存在する。従って、本明細書において使用される「 C D R 」とは、適当ならば、すべての 3 つの重鎖 C D R 、またはすべての 3 つの軽鎖あるいはすべての重鎖 C D R およびすべての軽鎖 C D R の両方を意味する。

【 0018 】

C D R は、抗原またはエピトープに対する抗体の結合の接触残基の大部分を提供する。本発明の対象となる C D R は、ドナー抗体可変重および軽鎖配列に由来し、天然に存在する C D R の類似体を含み、該類似体はさらにこれらが由来するドナー抗体と同じ抗原結合特異性および／または中和能力を共有または保持する。

「抗原結合特異性または中和能力を共有する」とは、例えば、m A b B C 2 は、あるレベルの自己限定的中和活性により特徴づけることができるが、適当な構造的環境における B C 2 の核酸配列によりコードされる C D R は、さらに低いかまたはさらに高い活性を有し得ることを意味する。かかる環境における B C 2 の C D R はそれでも B C 2 と同じエピトープを認識すると考えられる。

「機能的フラグメント」は、フラグメントが由来する抗体と同じ抗原結合特異性および／または中和能力を保持する部分的重または軽鎖可変配列（例えば、免疫グロブリン可変領域のアミノまたはカルボキシ末端での小さな欠失）である。

【 0019 】

「類似体」は、少なくとも一つのアミノ酸により修飾されたアミノ酸配列であり、前記修飾は、数個（すなわち、 10 以下）のアミノ酸の化学的または置換または転位であり、この修飾により該アミノ酸配列は未修飾配列の生物学的特徴、例えば、抗原特異性および高親和性を保持することが許容される。類似体の例としては、置換により構築することができ、 C D R - エンコーティング領域内またはこれを取り巻くあるエンドヌクレアーゼ制限部位を生成するサイレント突然変異が挙げられる。

類似体はさらに、対立遺伝子変異として起こる場合もある。「対立遺伝子変異または修飾」は、本発明のアミノ酸またはペプチド配列をコードする核酸配列における変更である。かかる変異または修飾は、遺伝子コードにおける縮重によるか、または所望の特徴を提供するために意図的に操作することができる。これらの変異または修飾の結果、コードされたアミノ酸配列が変更される場合もあるし、変更されない場合もある。

【 0020 】

「エフェクター剤」なる用語は、ドナー抗体またはドナー抗体の他のフラグメントの改変された抗体および／または天然または合成軽または重鎖抗体を通常の手段により関連させることができる非蛋白キャリア分子を意味する。かかる非蛋白キャリアは、例えば診断分野において使用されるような通常の担体、例えば、ポリスチレンまたは他のプラスチックビーズ、多糖類、例えば B I A core (P h a r m a c i a) システムにおいて使用されるようなもの、あるいは医学分野において有用で、ヒトおよび動物への投与に関して安全な他の非蛋白物質を含むことができる。他のエフェクター剤は、重金属原子または同位元素をキレート化するためのマクロサイクルを含むことができる。かかるエフェクター剤は、例えばポリエチレングリコールなどの改変された抗体の半減期を増大させるためにも有用である。

【 0021 】

本発明の抗体、改変された抗体およびフラグメントの構築における使用に関して、ヒト凝

10

20

30

40

50

固因子、好ましくは IX / IXa 因子、X / Xa 因子、XI / XIa 因子、VII / VIIa 因子、V / Va 因子、VII / VIIa 因子またはトロンビン / プロトロンビンあるいはこれらのペプチドエピトープとの提示により所望の免疫グロブリンを生成するために非ヒト種、例えば、ウシ、ヒツジ、サル、ニワトリ、齧歯類（例えば、ネズミおよびラット）を用いることができる。それぞれの凝固因子に対する非ヒト mAb を分泌するハイブリドーマ細胞系を提供するために、通常のハイブリドーマ技術が用いられる。かかるハイブリドーマを次に、実施例の項において記載するように、IX / IXa 因子、X / Xa 因子、XI / XIa 因子、VII / VIIa 因子、V / Va 因子、VII / VIIa 因子またはトロンビン / プロトロンビンコートされた 96 ウェルプレートを用いて、あるいは別法として、ストレプタビジン - コートされたプレートと結合したビオチニル化 IX / IXa 因子、X / Xa 因子、XI / XIa 因子、VII / VIIa 因子、V / Va 因子、VII / VIIa 因子またはトロンビン / プロトロンビンを用いて、結合についてスクリーンする。別法として、当業者に周知で、本発明において使用される技術により完全ヒト mAbs を生成することができる。
10

【0022】

本発明の自己限定的中和 mAb の一例は、キメラまたはヒト化分子の発生のために使用できる mAb BC2、ネズミ抗体である。BC2 mAb は凝固時間に対する自己限定的阻害活性により特徴づけられる。aPTT アッセイにより測定されるように、BC2 mAb の凝固時間に対する影響は、約 100 秒の最大値を示す。BX2 mAb はさらに、IXa 因子と結合し、IX 因子が IXa 因子に変換するのを阻害し、IXa 因子活性を阻害する。二価金属補因子は活性に必要であり、mAb は Mn²⁺ よりも Ca²⁺ について高い優先性を示す。が用いられる。aPTT アッセイにおいて観察される IC₅₀ は、略 20 50 nM である。BC2 mAb はラットと種交差反応性を示し、イソタイプ IgG2a である。

【0023】

他の所望のドナー抗体は、ネズミ mAb、BC1、9E4(2)F4 および 11G4(1)B9 である。これらの mAb は凝固時間に対する自己限定的阻害活性により特徴づけられる。aPTT アッセイにより測定すると、これらの mAb の凝固時間に対する影響は、9E4(2)F4 について約 90 ~ 100 秒、11G4(1)B9 について約 80 秒の最大値を示す。BC1 mAb も IXa 因子と結合し、IXa 因子活性を阻害するが、IX 因子の IXa 因子への変換を阻害しない。金属補因子はその活性について必要でない。aPTT 分析において BC1 について観察される IC₅₀ は、約 35 nM である。BC1 mAb はイソタイプ IgG1 である。
30

【0024】

凝固時間に対する自己限定的阻害活性により特徴づけられるさらにもう一つの望ましいドナー抗体は、ネズミ mAb、HFXLC である。aPTT アッセイにより測定すると、HFXLC mAb の凝固時間に対する影響は、約 50 ~ 60 秒の最大値を示す。HFXLC mAb は X 因子軽鎖と結合し、X / Xa 因子活性を阻害する。aPTT 分析において観察される IC₅₀ はおよそ 20 nM である。

凝固時間に対する自己限定的阻害活性により特徴づけられるさらにもう一つの望ましいドナー抗体は、ネズミ mAb、HFXI である。aPTT アッセイにより測定すると、HFXI mAb の凝固時間に対する影響は、約 100 秒の最大値を示す。HFXLC mAb は XI 因子軽鎖と結合し、XI / XIa 因子活性を阻害する。aPTT アッセイにおいて観察される IC₅₀ はおよそ 30 nM である。
40

【0025】

作用機構に関して特定の理論に拘束されることを意図としないが、これらの mAb は非競合的またはアロステリックな機構により凝固を調節するようであり、これにより部分的な阻害しか達成されない。

本発明は BC1、BC2、9E4(2)F4、11G4(1)B9、HFXLC、HFXI またはその超可変（すなわち、CDR）配列の使用に限定されない。自己限定的中和活
50

性により特徴づけられる他の適当な高親和性抗体または対応するC D Rをそのために置換することができる。単に例示と説明の簡便性のために、以下の記載においてドナー抗体をB C 1、B C 2、9 E 4 (2) F 4、1 1 G 4 (1) B 9、H F X L CまたはH F X Iと同一視した。

【0 0 2 6】

本発明はさらに、適当なヒト凝固因子または補因子に対するm A b由来のF a bフラグメントまたはF (a b')₂フラグメントの使用を含む。これらのフラグメントは、凝固因子、好ましくはIX / IX a因子、X / X a因子、X i / X I a因子、V I I I / V I I I a因子、V / V a因子、V I I / V I I a因子またはトロンビン / プロトロンビンに対する自己限定的中和活性を有する薬剤として有用である。F a bフラグメントは、軽鎖全体および重鎖のアミノ末端部分を含む。F (a b')₂フラグメントは、ジスルフィド結合により結合した2つのF a bフラグメントにより形成されるフラグメントである。m A b s B C 1、B C 2、9 E 4 (2) F 4、1 1 G 4 (1) B 9、H F X L CおよびH F X I並びに他の類似した高親和性抗体は、通常の手段、例えば、m A bの適当なタンパク分解酵素、パパインおよび/またはペプシンでの開裂、あるいは組換え法により得ることができるF a bフラグメントおよびF (a b')₂フラグメントの供給源を提供する。これらのF a bおよびF (a b')₂フラグメントはそれ自体治療薬、予防薬または診断用試薬として、また前記の組換え体またはヒト化抗体の形成において有用な可変領域およびC D R配列を含む配列のドナーとして有用である。

【0 0 2 7】

F a bおよびF (a b')₂フラグメントは、コンビナトリアルファージライブリー(例えば、Winterら、Ann Rev Immunol, 12, 433-455 (1994)を参照のこと)または免疫グロブリンシャッフリング(例えば、Marksら、Bio / Technology, 10, 779-783 (1992)を参照のこと)(両方とも全体として出典明示により本発明の一部とする)により構築することができ、ここにおいて選択された抗体(例えばB C 2)から得られるF dまたはV_H免疫グロブリンは軽鎖免疫グロブリンのレパートリー、V_L(またはV_K)と結合でき、新規F a bを形成する。反対に、選択された抗体から得られる軽鎖免疫グロブリンは重鎖免疫グロブリンのレパートリー、V_H(またはF d)と結合でき、新規F a b sを形成する。自己限定的中和IX因子F a bは、m A b B C 2のF dを軽鎖免疫グロブリンのレパートリーと結合させることにより得ることができる。従って、チェーンシャッフリング技術から独自の配列(ヌクレオチドおよびアミノ酸)を有する中和F a b sを回収することができる。

【0 0 2 8】

m A b B C 2または前記の他の抗体は、ドナー抗体の抗原結合特異性により特徴づけられる様々な改変された抗体を設計し、得るために有用な配列、例えば可変重および/または軽鎖ペプチド配列、フレームワーク配列、C D R配列、機能的フラグメント、およびその類似体、ならびにこれらをコードする核酸配列に寄与する。

可変軽鎖および重鎖ペプチド配列をコードする本発明の核酸配列、またはそのフラグメントも、C D Rまたはフレームワーク領域をコードする核酸配列内の特定の変化の変異導入、および結果として得られる修飾または融合核酸配列を発現のためにプラスミド中に導入するために有用である。例えば、フレームワークおよびC D R - コード化領域のヌクレオチド配列におけるサイレント置換は、突然変異誘発されたC D Rおよび/またはフレームワーク領域の挿入を促進する制限酵素部位を生成するために用いることができる。これらのC D R - コード化領域は本発明のヒト化抗体の構築において用いることができる。

【0 0 2 9】

B C 2重鎖可変領域の核酸およびアミノ酸配列を配列番号5および7に記載する。この領域から得られるC D R配列を配列番号8、9および10に記載する。

B C 2軽鎖可変領域の核酸配列を配列番号6および11に記載する。この領域から得られるC D R配列を配列番号12、13および14に記載する。

遺伝子コードの縮重を考慮して、本発明の可変重および軽鎖アミノ酸配列およびC D R配

10

20

30

40

50

列ならびにドナー抗体の抗原特異性を共有する機能的フラグメントおよびその類似体をコードする様々なコーディング配列を構築することができる。可変鎖ペプチド配列またはCDRをコードする本発明の単離された核酸配列、またはそのフラグメントは、第二免疫グロブリンパートナーと操作可能に連結されている場合、改変された抗体、例えばキメラまたはヒト化抗体あるいは本発明の他の操作された抗体を产生するために用いることができる。

【0030】

本明細書に記載された改変された抗体の一部をコードする単離された核酸配列に加えて、他のこのような核酸配列、例えば未変性CDR-エンコーディング配列と相補的なもの、またはCDR-コード化領域を取り巻く修飾されたヒトフレームワーク領域と相補的なものも本発明に含まれる。有用なDNA配列としては、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でDNA配列とハイブリッド形成する配列が挙げられる。T. Maniatisら、"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1982), pp. 387-389を参照のこと。このようなストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の一例は、4×SSC、65でハイブリダイゼーションし、続いて65で0.1×SSC中1時間洗浄する。別法として、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の一例は、50%ホルムアミド、4×SSC、42である。好ましくは、これらのハイブリッド形成DNA配列は少なくとも約18ヌクレオチドの長さ、すなわち略CDRの大きさである。

10

20

30

40

50

【0031】

改変された免疫グロブリン分子は、操作された抗体、例えば、キメラ抗体およびヒト化抗体を含む改変された抗体をコードすることができる。所望の改変された免疫グロブリンコーディング領域は、第一免疫グロブリンパートナー、例えばヒトフレームワークまたはヒト免疫グロブリン可変領域中に挿入された、IX/IXa因子、X/Xa因子、XI/XIa因子、VIII/VIIIa因子、V/Va因子、VI/VIa因子またはトロンビン/プロトロンビン抗体、好ましくは高親和性抗体、例えば、本発明により提供されるものの抗原特異性を有するペプチドコードするCDR-コード化領域を含む。

【0032】

好ましくは、第一免疫グロブリンパートナーは第二免疫グロブリンパートナーと操作可能に連結される。第二免疫グロブリンパートナーは前記定義の通りであり、対象となる第二の抗体領域をコードする配列、例えばFc領域を含む。第二免疫グロブリンパートナーはさらに、軽または重鎖定常領域がフレーム内でまたはリンカー配列により融合されるもう一つの免疫グロブリンをコードする配列を含んでもよい。凝固因子の機能的フラグメントまたはその類似体に対する操作された抗体は、同じ抗体との向上された結合を誘発するために設計することができる。

第二免疫グロブリンパートナーはさらに、第二免疫グロブリンが通常の手段により操作可能に連結される、非蛋白キャリア分子を含む前記のエフェクター剤と組み合わせることができる。

第二免疫グロブリンパートナー、例えば、抗体配列とエフェクター剤間の融合または結合は任意の好適な手段、例えば、通常の共有またはイオン結合、蛋白融合、またはヘテロ二官能性クロスリンカー、例えば、カルボジイミド、グルタルアルデヒドなどによることができる。かかる技術は当該分野において公知であり、通常の化学および生化学テキストに記載されている。

【0033】

さらに、単に第二免疫グロブリンパートナーとエフェクター剤間に所望の量のスペーサーを提供するために通常のリンカー配列を改変された免疫グロブリンコーディング領域中に構築することができる。かかるリンカーの設計は当業者には周知である。

加えて、本発明の分子のシグナル配列は、発現を向上させるために当業者に公知の技術により修飾することができる。

好ましい改変された抗体は、m A b B C 2 の抗原特異性を有する可変重および / 軽鎖ペプチドまたは蛋白配列、例えば V_H および V_L 鎖を含む。さらにもう一つの望ましい本発明の改変された抗体は、ネズミ抗体分子 B C 2 の重および / または軽鎖の可変領域の C D R の少なくとも 1 つ、好ましくはすべてを含み、残りの配列はヒト起源由来のものであるアミノ酸配列、または機能的フラグメントまたはその類似体により特徴づけられる。

【 0 0 3 4 】

さらにもう一つの例において、本発明の改変された抗体は、追加の薬剤と結合させてもよい。例えば、完全抗体分子の F c フラグメントまたは C H 2 C H 3 ドメインが酵素または他の検出可能な分子（すなわち、ポリペプチドエフェクターまたはレポーター分子）により置換されている本発明の改変された抗体を產生するために組換え D N A 配列技術を用いることができる。

10

第二免疫グロブリンパートナーはまた、凝固因子、好ましくは I X / I X a 因子、 X / X a 因子、 X I / X I a 因子、 V I I I / V I I I a 因子、 V / V a 因子、 V I I / V I I a 因子またはトロンビン / プロトロンビンに対する抗原特異性を有する C D R - 含有配列に対してヘテロローガスな、非免疫グロブリンペプチド、蛋白またはそのフラグメントと操作可能に連結させることができる。結果として得られる蛋白は、発現により抗原特異性と非免疫グロブリンの特徴の両方を示す。この融合パートナー特性は、例えば機能的特徴、例えば、もう一つの結合またはレセプタードメインあるいは融合パートナーそれ自体が治療蛋白であるならば治療特性であってもよい。

【 0 0 3 5 】

本発明のもう一つの望ましい蛋白は、完全長重および軽鎖またはその独立したフラグメント、例えば F a b または F (a b ')₂ フラグメント、重鎖ダイマーまたはその最小組換えフラグメント、例えば、 F v または一本鎖抗体 (S C A) または選択されたドナー m A b 、例えば m A b B C 1 、 B C 2 、 9 E 4 (2) F 4 、 1 1 G 4 (1) B 9 、 H F X L C または H F X I と同じ特異性を有する任意の他の分子を有する抗体分子を含む。かかる蛋白は改変された抗体の形態において用いることができるか、またはその未融合形態において用いることができる。

20

第二免疫グロブリンパートナーが、例えば任意のイソタイプまたはクラスの免疫グロブリンフレームワークまたは定常領域などのドナー抗体と異なる抗体由来である場合はいつでも、操作された抗体が得られる。操作された抗体は、一つの供給源、例えば、アクセプター抗体からの免疫グロブリン (I g) 定常領域および可変フレームワーク領域、およびドナー抗体、例えば、本明細書に記載の抗 - I X / I X a 因子、 X / X a 因子、 X I / X I a 因子、 V I I I / V I I I a 因子、 V / V a 因子、 V I I / V I I a 因子、トロンビン / プロトロンビン抗体からの 1 以上の（好ましくはすべての） C D R を含むことができる。加えて、核酸またはアミノ酸レベルでのアクセプター m A b 軽および / または重鎖可変ドメインフレームワーク領域、またはドナー C D R 領域の変更、例えば、欠失、置換または付加は、ドナー抗体抗原結合特異性を保持するために行うことができる。

30

【 0 0 3 6 】

このような操作された抗体は、凝固因子 m A b (所望により前記のように修飾してもよい) の可変重および / 軽鎖の一つ（または両方）または 1 以上の重または軽鎖 C D R を使用するために設計される。本発明の操作された抗体は自己限定的中和活性を示す。

40

このような操作された抗体は、選択されたヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域を含むヒト化抗体またはサブタイプまたは凝固因子抗体機能フラグメントと融合したヒト重および軽鎖定常領域を含むキメラ抗体を含む。好適なヒト（または他の動物）アクセプター抗体は、通常のデータベース、例えば、 K A B A T データベース、 L o s A l a m o s データベース、および S w i s s P r o t e i n データベースからドナー抗体のヌクレオチドおよびアミノ酸配列に対する相同性により選択されるものであってもよい。ドナー抗体のフレームワーク領域に対する相同性により特徴づけられるヒト抗体（アミノ酸に基づく）は、ドナー C D R の挿入のための重鎖可変フレームワーク領域を提供するために適している。軽鎖可変フレームワーク領域を供与できる好適なアクセプター抗体を同様にし

50

て選択できる。アクセプター抗体重および軽鎖は同じアクセプター抗体起源である必要はないことは重要である。

【0037】

好みしくは、ヘテロローガスなフレームワークおよび定常領域は、ヒト免疫グロブリンクラスおよびイソタイプ、例えば、IgG（サブタイプ1～4）、IgM、IgA、およびIgEから選択される。しかしながら、アクセプター抗体はヒト免疫グロブリン蛋白配列のみを含む必要はない。例えば、ヒト免疫グロブリン鎖のDNA配列エンコーディング部分が非免疫グロブリンアミノ酸配列、例えば、ポリペプチドエフェクターまたはレポーターモノクローン抗体をコードするDNA配列と融合した遺伝子を構築することができる。

特に好みしいヒト化抗体は、選択されたヒト抗体配列のフレームワーク領域上に挿入されたBC2のCDRを含む。ヒト化抗体の中和のために、IX因子抗体重鎖および/または軽鎖可変領域から得られる1、2または好みしくは3個のCDRを選択されたヒト抗体配列のフレームワーク領域中に挿入し、後者の抗体の未変性CDRを置換する。

【0038】

好みしくは、ヒト化抗体において、ヒト重および軽鎖の両方における可変ドメインは1以上のCDR置換により操作されている。6個のCDRすべて、または6未満のCDRの様々な組み合わせを用いることができる。好みしくはすべての6のCDRを置換する。ヒト重鎖のみにおけるCDRを、軽鎖としてヒトアクセプター抗体から得られる未修飾軽鎖を用いて置換することができる。さらに別法として、適合性軽鎖をもうひとつのヒト抗体から通常の抗体データベースにより選択することができる。操作された抗体の残りは好適なアクセプターヒト免疫グロブリンから得ることができる。

操作されたヒト化抗体はしたがって、好みしくは天然のヒト抗体またはそのフラグメントの構造を有し、有効な治療的用途、例えば、ヒトにおける血栓性および塞栓性疾患の治療に必要とされる性質の組み合わせを有する。

【0039】

最も好みしくは、ヒト化抗体は配列番号31、52、または89に記載されているような重鎖アミノ酸配列を有する。また、最も好みしいのは、配列番号44、57、62、74、78または99に記載されているような軽鎖アミノ酸配列を有するヒト化抗体である。特に好みしいのは、重鎖が配列番号31に記載されているようなアミノ酸配列を有し、軽鎖が配列番号44に記載されているようなアミノ酸配列を有するヒト化抗体SB249413である。重鎖が配列番号52に記載されているようなアミノ酸配列を有し、軽鎖が配列番号57に記載されているようなアミノ酸配列を有するヒト化抗体SB249415も特に好みしい。重鎖が配列番号52に記載されているようなアミノ酸配列を有し、軽鎖が配列番号57に記載されているようなアミノ酸配列を有するヒト化抗体SB249415である。さらに、特に好みしいのは、重鎖が配列番号52に記載されているようなアミノ酸配列を有し、軽鎖が配列番号62に記載されているようなアミノ酸配列を有するヒト化抗体SB249416も特に好みしい。重鎖が配列番号52に記載されているようなアミノ酸配列を有し、軽鎖が配列番号74に記載されているようなアミノ酸配列を有するヒト化抗体SB249417も特に好みしい。重鎖が配列番号52に記載されているようなアミノ酸配列を有し、軽鎖が配列番号78に記載されているようなアミノ酸配列を有するヒト化抗体SB257731も特に好みしい。重鎖が配列番号89に記載されているアミノ酸配列を有し、軽鎖が配列番号99に記載されているアミノ酸配列を有するヒト化抗体SB257732も特に好みしい。

【0040】

操作された抗体はさらに可変ドメインアミノ酸の変化により、必ずしもドナー抗体（すなわち、類似体）の特異性および高親和性に影響を及ぼすことなくさらに修飾することができることは当業者には理解されるであろう。重および軽鎖アミノ酸は可変ドメインフレームワークまたはCDRのいずれか、あるいは両方において他のアミノ酸により置換することができる。これらの置換はドナー抗体または特定のサブグループから得られるコンセンサス配列により供給することができる。

10

20

30

40

50

加えて、定常領域は本発明の分子の選択的性質を向上または減少させるために変更することができる。例えば、二量化、Fcレセプターとの結合、または補体を結合または活性化する能力(例えば、Angalら、Mol Immunol, 30, 105-108(1993), Xulら、J Biol Chem, 269, 3469-3474(1994), Winterら、EP 307434-Bを参照のこと)。

【0041】

キメラ抗体である改変された抗体は、フレームワーク領域を含む全非ヒトドナー抗体重鎖および軽鎖可変領域を、両鎖のヒト免疫グロブリン定常領域と関連して提供することにより前記のヒト化抗体と異なる。本発明のヒト化抗体と比較して追加の非ヒト配列を保持するキメラ抗体はヒトにおいて顕著な免疫応答を誘発することが予想される。

10

かかる抗体は、以下に記載するように、血栓性および塞栓性障害の予防および治療において有用である。

好ましくは、mAb BC2または他の好適なドナーmAb、例えばBC1、9E4(2)F4、11G4(1)B9、HFXL C、HFXI、およびそのエンコーディング核酸配列の可変軽および/または重鎖配列およびCDRは、次のプロセスにより、本発明の改変された抗体、好ましくはヒト化抗体の構築において用いられる。本発明の他の例を生成させるために同じかまたは類似した技術も用いることができる。

【0042】

選択されたドナーmAb、例えば、ネズミ抗体BC2を産生するハイブリドーマは通常クローンされ、その重および軽鎖可変領域のDNAは当業者に公知の技術、例えば、Sambrookら、"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory(1989)に記載されている技術により得られる。少なくともCDR-コード化領域およびドナーmAb結合特異性を保持するために必要なアクセプターmAb軽および/または重可変ドメインフレームワーク領域の部分を含むBC2の可変重および軽鎖領域、ならびにヒト免疫グロブリンから得られる抗体鎖の残りの免疫グロブリン由来の部分は、ポリヌクレオチドプライマーおよび逆転写酵素を用いて得られる。CDR-コード化領域は公知データベースを用い、他の抗体との比較により同定される。

20

【0043】

マウス/ヒトキメラ抗体を次に調製し、結合特異性について分析する。かかるキメラ抗体は、完全非ヒトドナー抗体V_HおよびV_L領域を、両鎖のヒトIg定常領域との組み合わせにおいて含む。

30

ヒト抗体から得られる重鎖可変領域の相同性フレームワーク領域はコンピューター化されたデータベース、例えば、KABATを用いて同定され、BC2に対する相同性を有するヒト抗体はアクセプター抗体として選択される。ヒト抗体フレームワーク内にBC2 CDR-コード化領域を含む合成重鎖可変領域の配列は、制限部位を組み入れるためにフレームワーク領域内に任意のヌクレオチド置換を有するように設計される。この設計された配列を次に長い合成オリゴマーを用いて合成する。別法として、オリゴヌクレオチドを重複させることにより設計された配列を合成し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅し、誤差を補正する。好適な軽鎖可変フレームワーク領域は同様にして設計することができる。

40

【0044】

ヒト化抗体はキメラ抗体から得ることができ、好ましくは、重および軽鎖から得られるドナーmAb CDR-コード化領域を選択された重および軽鎖フレームワーク内に適当に挿入することにより合成することができる。別法として、標準的突然変異誘発技術を用いて本発明のヒト化抗体を調製することができる。従って、結果として得られるヒト化抗体はヒトフレームワーク領域およびドナーmAb CDR-コード化領域を含む。その後、フレームワーク領域を操作してもよい。結果として得られるヒト化抗体を組換え宿主細胞、例えば、COS、CHOまたは骨髄腫細胞において発現することができる。他の好適なIX因子特異性または他の凝集因子特異性、自己限定的、中和、高親和性、比ヒト抗体に

50

対してこの技術を用いて他のヒト化抗体を調製することができる。

【0045】

改変された抗体のこれらのコーディング配列を宿主細胞の複製および宿主細胞における発現、および／または宿主細胞からの分泌を制御できる通常の調節配列と操作的に関連させることにより、通常の発現ベクターまたは組換えプラスミドを產生する。調節配列は、プロモーター配列、例えば、CMVプロモーター、およびシグナル配列を含み、これは他の公知抗体から誘導することができる。同様に、相補的抗体軽または重鎖をコードするDNA配列を有する第二の発現ベクターを產生することができる。好ましくは、この第二の発現ベクターは、できるだけ各ポリペプチド鎖が機能的に発現されるために、コーディング配列と選択可能なマーカー以外は第一のものと同一である。別法として、改変された抗体の重および軽鎖コーディング配列は一つのベクターに存在してもよい。

10

【0046】

選択された宿主細胞は、通常の技術により、第一および第二ベクターの両方と同時形質導入されて（または一つのベクターにより単に形質導入されて）、組換えまたは合成軽および重鎖の両方を含む本発明の形質導入された宿主細胞が生じる。形質導入された細胞を次に通常の技術により培養して、本発明の操作された抗体を產生する。組換え重鎖および／または軽鎖の両方の組み合わせを含むヒト化抗体を適当なアッセイ、例えば、ELISAまたはRIAにより培地からスクリーンする。本発明の他の改変された抗体および分子を構築するために類似した通常の技術を用いることができる。

20

本発明の方法および組成物の構築において用いられるクローニングおよびサブクローニング工程に適したベクターは当業者が選択することができる。例えば、AmershamまたはPharmaciaなどの供給業者から商業的に入手可能なpUCシリーズのクローニングベクター、例えば、pUC19を用いることができる。さらに、容易に複製できる、多くのクローニング部位および選択可能な遺伝子（例えば、抗生物質耐性）を有し、容易に操作される任意のベクターをクローニングに用いることができる。従って、クローニングベクターの選択は本発明の制限的要素ではない。

【0047】

同様に、本発明に従って操作された抗体を発現するための用いられるベクターは、任意の通常のベクターから当業者により選択することができる。ベクターはさらに、選択された宿主細胞においてヘテロローガスなDNA配列の複製および発現を行う選択された調節配列（例えばCMVプロモーター）も含む。これらのベクターは操作された抗体または改変された免疫グロブリンコーディング領域をコードする前記DNA配列を含む。加えて、ベクターは操作を容易にするために所望の制限部位を挿入することにより修飾された、選択された免疫グロブリン配列を組み入れることができる。

30

発現ベクターはまた、ヘテロローガスなDNA配列、例えば、哺乳動物ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（DHFR）の発現を増幅するために適した遺伝子により特徴づけられる。他の好ましいベクター配列は、ポリAシグナル配列、例えば、ウシ成長ホルモン（BGH）から得られるものおよびベータグロブリンプロモーター配列（beta-globin）を含む。本発明において有用な発現ベクターは、当業者に周知の技術により合成することができる。

40

【0048】

かかるベクターの成分、例えば、レプリコン、選択遺伝子、エンハンサー、プロモーター、シグナル配列などは、商業的または天然の供給源から入手できるか、または選択された宿主における組換えDNA配列の産物の発現および／または分泌において用いられる公知方法により合成することができる。他の適当な発現ベクターは、哺乳動物、細菌、昆虫、酵母および真菌発現について当該分野においてその多くのタイプが公知であり、この目的のために選択することができる。

本発明はさらに、操作された抗体またはその改変された免疫グロブリン分子のコーディング配列を含む組換えプラスミドで形質導入された細胞系も含む。これらのクローニングベクターのクローニングおよび他の操作に有用な宿主細胞も通常のものである。しかしながら

50

ら、最も望ましくは、イー・コリ (E. coli) の様々な株から得られる細胞が、クローニングベクターの複製および本発明の改変された抗体の構築における他の工程に用いられる。

【0049】

本発明の操作された抗体または改変された抗体の発現に適した宿主細胞または細胞系は好みしくは哺乳動物細胞、例えば、CHO、COS、纖維芽細胞（例えば、3T3）および骨髄細胞であり、より好みしくは、CHOまたは骨髄細胞である。ヒト細胞を用いることができ、したがって分子をヒトグリコシル化パターンで修飾されるようにできる。別法として、他の真核細胞系を用いることができる。好適な哺乳動物宿主細胞および形質転換、培養、増幅、スクリーニングおよび生成物産生および精製の方法は当該分野において公知である。例えば、Sambrookら、前出を参照のこと。

細菌細胞は本発明の組換えFabの発現に適した宿主細胞として有用であることが判明している（Pluckthun, A., Immunol Rev, 130, 151-188 (1992) を参照のこと）。しかしながら、細菌細胞において発現される蛋白はフォールドされていないかまたは不適切にフォールドされた形態または非グリコシル化形態である傾向にあるので、細菌細胞において産生される任意の組換えFabを抗原結合能力の保持についてスクリーンしなければならない。細菌細胞により発現される分子が適切にフォールドされた形態において産生されたならば、その細菌細胞は望ましい宿主である。例えば、発現に用いられる様々なイー・コリ株はバイオテクノロジーの分野において宿主細胞として一般的である。ビー・サチリス (B. subtilis)、ストレプトミセス (Streptomyces)、他のバチルスなどの様々な株を用いることができる。

【0050】

望ましいならば、当業者に公知の酵母細胞の株も宿主細胞として利用可能であり、昆虫細胞、例えば、ショウジョウバエ (Drosophila) および鱗翅類 (Lepidoptera) およびウイルス発現系も利用可能である。例えば、Millerら、Genetic Engineering, 8, 277-298, Plenum Press (1986) および引用されている文献を参照のこと。

本発明の様々なベクターを構築できる一般法、本発明の宿主細胞を産生するために必要な形質導入法、およびかかる宿主細胞から本発明の改変された抗体を産生するために必要な培養法はすべて慣例的技術である。同様に、一旦産生されると、本発明の改変された抗体を、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む当該分野の標準的な手順に従って細胞培養物から精製することができる。かかる技術は当業者の技術範囲内であり、本発明を制限するものではない。

【0051】

ヒト化抗体のさらにもう一つの発現法は、米国特許第4873316号に記載されているようなトランスジェニック動物における発現を利用する。これは、遺伝形質転換により哺乳動物中に組み入れられた場合にメスにその乳中に所望の組換え蛋白を産生させる動物のカゼインプロモーターを用いた発現系に関する。

所望の方法で一旦発現されると、操作された抗体を次に適当なアッセイを使用してインビトロ活性について試験する。現在、IX因子または他の適当な凝固因子に対する操作された抗体の定性的および定量的結合を評価するために通常のELISAアッセイフォーマットが用いられる。加えて、通常のクリアランスメカニズムにもかかわらず、体内で操作された抗体の残留率を評価するために、その後のヒト臨床試験の前に中和効力を検証するために他のin vitroアッセイを用いることができる。

【0052】

BC2から調製されるヒト化抗体について記載された手順に従って、当業者はまた本明細書に記載された他のドナー、可変領域配列およびCDRペプチドからヒト化抗体を構築することができる。操作された抗体は、操作された抗体の受容体により「自己」として潜在的に認識される可変領域フレームワークを用いて産生できる。可変領域フレームワークに対するわずかに修飾することにより受容体の免疫原性を著しく増大させずに抗原結合を大

10

20

30

40

50

きく増大させることができる。かかる操作された抗体は凝固因子により媒介される状態についてヒトを有効に治療できる。かかる抗体はまたかかる状態の診断においても有用である。

【0053】

本発明はまた、動物、特にヒトにおける血栓症を抑制する方法であって、有効量の自己限定向中和活性を有する抗凝固因子モノクローナル抗体をプラスミノーゲンアクチベーターとの組み合わせにおいて投与することを含む方法に関する。

併用療法は、血流の回復のための時間を減少させ、血管再灌流の頻度および合計期間を増大させるプラスミノーゲンアクチベーターの最適以下の濃度での血栓崩壊を向上させる。ヘパリンと対照的に、併用療法は通常の止血機能を著しく妨害せず、フィブリノーゲン、プラスミノーゲンおよびアルファ-2-抗プラスミンレベルを減少させる。従って、本発明はさらに、動物における血栓症の治療における血栓溶解剤の必要な用量を減少させる方法であって、血栓溶解剤との組み合わせにおいて内因性凝固経路の成分を特異的に標的とする抗凝固剤を投与することを含む方法に関する。

【0054】

好ましくは、凝固因子は内因性または共通凝固経路から得られる。最も好ましくは、抗凝固因子モノクローナル抗体は、抗-I X 因子、抗-I X a 因子、抗-X 因子、抗-X a 因子、抗-X I 因子、抗-X I a 因子、抗-V I I I 因子、抗-V I I I a 因子、抗-V 因子、抗-V a 因子、抗-V I I 因子、抗-V I I a 因子、抗トロンビンまたは抗プロトロンビンである。m A b は、本明細書に記載された1以上の操作された抗体または改変された抗体あるいはそのフラグメントを含むことができる。

好ましくは、プラスミノーゲンアクチベーターは t P A、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼである。特に好ましいのは、t P Aである。例えば、Tachias and Madison, J Biol Chem, 272, 14580-14585 (1997); Fujisera, Circulation, 95, 715-722 (1997); Coombsら、J Biol Chem, 273, 4323-4328 (1998); Vande Werfら、Am Heart J, 137, 786-791 (1999) に記載されているような t P A 变種ならびにストレプトキナーゼおよびウロキナーゼ变種、例えば、一本鎖ウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベーター、アシル化プラスミノーゲンストレプトキナーゼアクチベーター複合体、吸血コウモリ起源のスタフィロキナーゼおよびプラスミノーゲンアクチベーターも好ましい。

【0055】

別法として、アセチルサリチル酸を抗凝固因子モノクローナル抗体との組み合わせにおいて投与することができる。場合によっては、併用療法は抗凝固因子モノクローナル抗体の治療的に有効な用量を減少させる。

本発明の分子の使用により誘発される治療応答は、それぞれの凝固因子との結合およびその後の凝固力スケードの自己限定向抑制により生じる。従って、本発明の分子は、治療適用途に適した製剤および処方における場合、これに限定されないが、心筋梗塞、不安定アンギナ、心房細動、発作、腎損傷、肺塞栓症、深静脈血栓症および人口臓器および補綴移植に関連する異常な凝固活性に感受性であるかまたは経験した個人に非常に望ましい。特に好ましい用途は、心筋梗塞である。

【0056】

もう一つの好ましい用途は、血栓塞栓後に誘発される虚血の治療においてである。従って、本発明はさらに、動物の血栓塞栓後に誘発される虚血の治療法であって、抗-I X 因子抗体または抗体フラグメントを投与することを含む方法に関する。抗体またはフラグメントは、塞栓後、すなわち、脈管構造内の任意の場所で生じた血塊が脳脈管構造中に移動し、停滞し、血流をブロックおよび/または減少させ、虚血を引き起こした後に投与することができる。抗体またはフラグメントはまた、発作後、すなわち、塞栓形成から起こる神経機能障害を個人または観察者の側で認識した後にも投与することができる。さらに、本発明は動物の血栓塞栓後に誘発される虚血を治療する方法であって、抗-I X 因子抗体

10

20

30

40

50

または抗体フラグメントをプラスミノーゲンアクチベーターとの組み合わせにおいて投与することを含む方法に関する。抗体またはフラグメントおよびプラスミノーゲンアクチベーターは、塞栓後または発作後に投与することができる。これらの治療法の結果、側副血管における血管灌流が維持される。本発明の損傷後の治療は、例えば、虚血支持構造において継続する病理的血栓症などの、梗塞組織を増大させ、神経学的障害を大きくする可能性のある持続性虚血の結果を緩和する。

【0057】

さらに、本発明は動物の血栓塞栓後に誘発される虚血の治療における血栓溶解剤の必要な用量を減少させる方法であって、抗-IX因子抗体を血栓溶解剤との組み合わせにおいて投与することを含む方法に関する。

10

もう一つの好ましい用途は、血栓塞栓性発作にかかりやすい動物に対する予防的投与である。従って、本発明はまた、動物における血栓塞栓性発作の予防法であって、抗-IX因子抗体を血栓塞栓性発作の危険性のある動物に投与することを含む方法に関する。血栓塞栓性発作の危険性のあるものとしては、これらに限定されないが、心房細動にかかりやすい患者または外科手術的介入または他の凝固促進薬侵襲性技術を受けているものが挙げられる。

本発明の改変された抗体、抗体およびそのフラグメントはさらに、他の抗体、特に本発明の操作された抗体が向けられる状態の原因である他のマーカー（エピトープ）と反応性のヒトmAbと組み合わせて用いることができる。

20

【0058】

本発明の治療薬は、約1日から約3週間、あるいは必要に応じて、異常な凝固状態の治療に望ましいと考えられる。これは、現在使用されている抗凝固剤ヘパリンおよびワルファリンよりも非常に優れている。用量および治療期間は、ヒトの循環における本発明の分子の相対的持続期間に関連し、治療される状態および患者の身体全体の健康状態に応じて当業者が調節することができる。

本発明の治療薬の投与様式は、該薬剤を宿主に送達する任意の適当な経路であってよい。本発明の改変された抗体、抗体、操作された抗体、およびそのフラグメント、プラスミノーゲンアクチベーターおよび医薬組成物は非経口投与、すなわち、皮下、筋肉内、静脈内または鼻内投与に特に有用である。

30

【0059】

本発明の治療薬は、活性成分として有効量の本発明の操作された（例えばヒト化）抗体およびプラスミノーゲンアクチベーターを医薬的に許容される担体中に含む医薬組成物として調製することができる。別法として、本発明の医薬組成物はまたアセチルサリチル酸を含むこともできる。本発明の予防薬において、操作された抗体を含む水性懸濁液または溶液で、好ましくは生理的pHに緩衝され、すぐに注射できる形態のものが好ましい。非経口投与用組成物は、通常、医薬的に許容される担体、好ましくは水性担体中に溶解された本発明の操作された抗体またはそのカクテルの溶液を含む。さまざまな水性担体、例えば、0.4%塩溶液、0.3%グリシンなどを用いることができる。これらの溶液は、滅菌され、一般に粒状物質を含まない。これらの溶液は、通常の、よく知られた滅菌技術（例えば、濾過）により滅菌することができる。組成物は、生理学的状態に近づけるために必要な医薬的に許容される補助物質、例えば、pH調節剤および緩衝剤などを含むことができる。かかる医薬処方中の本発明の抗体の濃度は広範囲に変化し得、すなわち、約0.5重量%未満、通常1重量%または少なくとも1重量%から15または20重量%まで変化し、主に液体の体積、粘度などに応じて、選択される具体的な投与様式に従って選択される。

40

【0060】

従って、筋肉内注射用の本発明の医薬組成物は、1mLの滅菌緩衝水、および約1ngないし約100mg、例えば約50ngないし約30mgまたはより好ましくは約5mgないし約25mgの本発明の操作された抗体を含むように調製することができる。同様に、静脈内注入用の本発明の医薬組成物は、約250mLの滅菌リンゲル液、および約1mg

50

ないし約30mg、好ましくは5mgないし約25mgの本発明の操作された抗体を含むように調製することができる。実際の非経口投与可能な組成物の調製法は当業者に周知であるか明らかであり、例えば、"Remington's Pharmaceutical Science", 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvaniaにおいてより詳細に記載されている。

【0061】

本発明の治療薬は、医薬製剤における場合、単位投与形態で提示されるのが好ましい。適当な治療的に有効な用量は、当業者が容易に決定できる。ヒトまたは他の動物における血栓および塞栓性障害を有効に治療するために、体重1kgあたり0.1mgないし約20mgの本発明の蛋白または抗体の一用量を非経口的に、好ましくは静脈内または筋肉内投与する。かかる投与は、必要ならば血栓反応中医師により適当に選択される適当な間隔で繰り返すことができる。

本明細書に記載する抗体、改変された抗体またはフラグメントは、貯蔵するために凍結乾燥し、使用前に適当な担体で復元することができる。この技術は、通常の免疫グロブリンに関して有効であることが証明されており、当該分野において公知の凍結乾燥および復元技術を用いることができる。

本発明を以下の具体的な、非限定的実施例を用いて説明する。

【0062】

実施例1

抗-IX因子モノクローナル抗体の調製およびスクリーニング

メスBalb/Cマウスに、Jenny, R.ら、Prep Biochem, 16, 227-245 (1986)に記載されているようにして精製したヒトIX因子を注射した。典型的には、各マウスに、0.15mLのリン酸塩緩衝食塩水(PBS)中に溶解し、0.15mLの完全フロイントアジュvantと混合した、100ugの蛋白の第1回注射をした。0.15mLのPBSと0.15mLの不完全フロイントアジュvant中の50ug蛋白のブースター免疫化を略隔週に2~3ヶ月の期間にわたって行った。最終ブースト後、マウスに脾臓/骨髄腫細胞融合前3日に50ugのPBS中IX因子を投与した。脾臓細胞を免疫化されたマウスから取り出し、Oi, V.T.らにより"Selected Methods in Cellular Immunology", Mishe11, B.B. and Shigigi, S.M., eds., Freeman Press, San Franciscoに記載されているようにポリエチレングリコールを用いてNS-1骨髄腫細胞(Kohler, G.ら、Eur J Immunol, 6, 292-295 (1976))と融合させた。融合後、細胞を、10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地中に再懸濁させ、アリコートを、0.5mLの腹膜洗浄細胞-順化培地を含む4つの24ウェルプレートのそれぞれのウェルに入れた。次の日に、各ウェルに10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地中1.0mLの 2×10^{-6} Mのハイポキサンチン、 8×10^{-7} Mのアミノブテリンおよび 3.2×10^{-5} Mのチミジンを添加した。培地の半分を除去し、 1×10^{-4} Mのハイポキサンチンおよび 1.6×10^{-5} Mのチミジンを含む新しい培地で交換することにより細胞に3~4日ごとに養分を供給した。

【0063】

略2週間後、1.0mLのハイブリドーマ培地を各ウェルから除去し、Jenny, R.J.らによりMeth Enzymol, 222, 400-416 (1993)において記載されているようなELISAアッセイを用いて抗-IX因子について試験した。簡単に言うと、IX因子を96-ウェルマイクロタイプレートのプラスチックウェル上に固定した。精製された抗体のハイブリドーマ上清または希釈液を次にウェル中でインキュベートした。ウェルを洗浄し、抗体-抗原複合体の存在を西洋ワサビペルオキシダーゼと接合させたヤギ抗ネズミ免疫グロブリンDain抗体および色素原基質o-ジアニシジンで検出した。

抗-IX抗体を含むウェルを制限希釈法によりサブクローンし、96-ウェルプレート中

10

20

30

40

50

で増殖させた。クローンされたハイブリドーマ細胞培養物から得られた上清を前記の E L I S A アッセイにより I X 因子に対する抗体についてスクリーンし、陽性ハイブリドーマからの細胞を広げ、凍結し、液体窒素中で貯蔵し、マウスの腹水腫瘍として増殖させた。

【 0 0 6 4 】

実施例 2

凝固における抗凝固因子抗体の自己限定的効果

活性化部分トロンボプラスチン時間 (a P T T) に対する抗凝固因子抗体の濃度の増大の影響をフィブロメーター (fibrometer) (B e c t o n - D i c k i n s o n M i c r o b i o l o g y S y s t e m s , C o c k e y s v i l l e , M a r y l a n d) においてバクスター・リファレンス法 L I B 0 2 9 3 - J 、 3 / 9 3 改訂版 (B a x t e r S c i e n t i f i c , E d i s o n , N e w J e r s e y) を用いて測定した。 10

実験開始前に、 5 m L 試験管中の 2 ~ 3 m L の 0 . 0 2 M C a C l ₂ をフィブロメーターの加熱チャンバー中に入れた。ヒト血漿サンプルは、新たに抜き取り、氷上に維持するか、または止血参考血漿 (A m e r i c a D i a g n o s t i c , G r e e n w i c h , C o n n e c t i c u t) から製造業者らの勧告により再構成するかのいずれかであった。

豚腸粘膜から得た未分画ヘパリン (S i g m a C h e m i c a l , S t . L o u i s , M i s s o u r i) 、豚腸粘膜から得た低分子量ヘパリン (L o v e n o x 、 エノキサパリンナトリウム、 R h o n e - P o u l e n c R o r e r P h a r m a c e u t i c a l s , C o l l e g e v i l l e , P e n n s y l v a n i a) または m A b 抗凝固剤を 5 0 u M ストック溶液として調製し、直接試験血漿中に連続して希釈した。抗凝固剤を含まず、血漿を含むプランクを対照とした。 20

【 0 0 6 5 】

2 つの f i b r o T u b e フィブロメーターカップを、それぞれ 1 0 0 u l の試験血漿または抗凝固剤を含む 1 0 0 u l の試験血漿、および 1 2 5 u l のアクチン活性化セファロプラスチン試薬 (アクチン試薬、エラグ酸中ウサギ脳セファリンから得る、 B a x t e r S c i e n t i f i c から入手可能) で満たし、 3 7 のフィブロメーターウェル中に入れた。

1 分後、 1 0 0 u l のアクチン試薬を血漿含有カップに移し、内容物をピペットで数回混合した。3 分インキュベーションした後、 1 0 0 u l の C a C l ₂ を 3 7 で予熱したものを、自動ピペット / タイマー - トリガー (B e c t o n - D i c k i n s o n) を用いて血漿 - アクチン試薬混合物に添加した。凝固時間を記録し、図 1 に示した結果は、合計アッセイ体積 3 0 0 u l 中の抗凝固剤の最終濃度の関数としての凝固時間として示す。アッセイにおける I X 因子の基準濃度は 3 0 ~ 4 0 n M である。 30

【 0 0 6 6 】

図 1 に示した結果は、ネズミ抗 - I X 因子 m A b B C 1 および B C 2 の濃度の増加の a P T T 凝固時間に対する影響を示す。両 m A b は a P T T を延長することにより凝固を抑制し、両 m A b は a P T T に対する最終飽和効果に達する。 I C _{5 0} 値は B C 1 および B C 2 についてそれぞれ約 3 5 n M および約 5 0 n M で類似しているが、2 つの抗体に対する最大応答における差は顕著である。 B C 1 の飽和濃度は a P T T を 5 0 % 、約 4 0 秒まで増大させる。一方、 B C 2 は a P T T を 3 . 5 倍、約 9 0 秒まで増大させる。ヘパリンでの抗凝固療法において用いられる治療標的領域を強調する。結果から、2 つの m A b はヘパリン治療 a P T T 範囲を包含することがわかる。 40

m A b B C 1 および B C 2 の性質を表 I にまとめる。 B C m A b のそれぞれはチモーゲン、 I X 因子の両方、ならびに活性プロテアーゼ、 I X a 因子を認識するが、 B C 2 のみが両チモーゲン活性化ならびにプロテアーゼ活性をブロックできる。 B C 1 および B C 2 はシノモルグスサル (C y n o m o l o g o u s m o n k e y) I X 因子と公差反応することが判明している。さらに、 B C 2 はラット I X 因子とも交差反応する。

【 0 0 6 7 】

【表1】

第Ⅰ表 抗-I X 因子m A b のインビトロ性質のまとめ

	BC1	BC2	
I X 因子と結合する	イエス	イエス	
I X a 因子と結合する	イエス	イエス	
I X の I X a への変換を阻害する	ノー	イエス	
X a s e 複合体での I X a 活性を 阻害する	イエス	イエス	10
補因子の必要性	なし	二価金属	
		Ca ²⁺ > Mn ²⁺	
aPTT 最大 × 100%	150	350	
aPTT 通常			
IC ₅₀ , nM	約 35	約 50	20
種交差反応性	サル	ラット、サル	
イソ型	IgG1	IgG2a	

【0068】

図2に示す結果は、抗-I X 因子m A b 9 E 4 (2) F 4 および 11 G 4 (1) B 9 の濃度の増加のaPTT凝固時間に対する効果を示す。アッセイ用の血漿を標準濃度の半分に希釈し、45秒の初期aPTTを得た。両m A bはaPTTを延長することにより凝固を抑制し、両m A bはaPTTに関して最終飽和効果に達する。9 E 4 (2) F 4 および 11 G 4 (1) B 9 の飽和濃度は、aPTTを9 E 4 (2) F 4 については約90から100秒まで増大させ、11 G 4 (1) B 9 については約80秒まで増大させる。結果は、2つのm A bはヘパリン治療aPTT範囲の上限であることを示す。

図3に示す結果は、抗-X因子m A g H F X L C (対軽鎖エピトープ)、H F X H C (対重鎖エピトープ)および抗-X I 因子m a b H F X I の濃度の増加のaPTT凝固時間に対する効果を示す。これらのm A bはEnzyme Research Laboratories (South Bend, IN)から入手した。m A b H F X L C の濃度およびH F X I は、aPTTを延長することにより凝固を抑制し、両m A bはaPTTに関して最終飽和効果に達する。H F X L C のIC₅₀値は約40nMであり；飽和濃度はaPTTを約60秒まで増大させる。H F X I のIC₅₀値は約20nMであり；飽和濃度はaPTTを約100秒まで増大させる。結果は、H F X L C はヘパリン治療aPTT範囲内にあるが、H F X I はヘパリン治療範囲の上端であることを示す。m A b H F X H C はaPTT凝固時間に対して影響を及ぼさなかった。

aPTTの自己限定的延長は、V I I I 因子に対する抗体、I X a 因子に対する補因子についても観察される。例えば、A f f i n i t y B i o l o g i c a l s , I n c . から購入した抗ヒトV I I I 因子抗体S A F 8 C - I G はaPTTを約65秒の最大値まで増大させた。aPTTの最大半減延長は、約100nM抗体で達成された。

【0069】

30

40

50

実施例 3

ラット血栓モデルにおけるネズミ IX 因子 m A b の効果

抗 - IX 因子抗体の動脈血栓症の予防における効果を評価するために、 Schumacher らにより J Cardio Pharm, 22, 526-533 (1993) において報告されているようなラット頸動脈血栓症モデルを採用した。このモデルは、頸動脈表面上に適用された FeCl₃ 溶液により生じる酸素ラジカルによる頸動脈内皮に対する局所的損傷からなる。

簡単に言うと、ラットをペントバルビトンナトリウムで麻酔し、頸静脈に静脈内注入のためにカニューレを挿入し、血圧および心拍数をモニターするために左大腿動脈にカニューレを挿入した。無菌技術により首を外科的に切開することにより頸動脈を取り出し、血流測定のために磁気フロープローブを装備した。安定化期間後、次の変数のベースラインパラメータを確立した：頸動脈血流、動脈圧、心拍数、活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) およびプロトロンビン時間 (PT)。その後、 50% FeCl₃ 溶液中に浸漬したあらかじめ測定したワットマン濾紙を頸動脈上に 15 分間置き、その下にある内皮細胞を完全に傷つけた。 FeCl₃ 浸漬濾紙を除去した後、実験を 60 分にわたって完了させた。実験の最後に、頸動脈血栓を頸動脈から取り出し、秤量した。

【 0070 】

すべての薬剤は頸動脈損傷の開始前 15 分に投与した。次の処置を試験し、 IX 因子 m A b BC 2 と比較した。

1. ヘパリン： 15 、 30 、 60 、または 120 U / kg ボーラス、続いて 0.5 、 1 、 2 または 4 U / kg / 分をそれぞれ 60 分かけて注入
2. アセチルサリチル酸 (ASA) 、アスピリン) : 5 mg / kg ボーラス
3. 抗 - IX 因子 m A b BC 2 : 1 、 3 または 6 mg / kg ボーラス、続いて 0.3 、 1 、または 0.2 ug / kg / 分をそれぞれ 60 分かけて注入
4. ヘパリン : 300 U / kg ボーラス + 1 U / kg / 分 + ASA 5 mg / kg
5. 抗 - IX 因子 m A b BC 2 : 1 mg / kg + 0.3 ug / kg / 分 + ASA 5 mg / kg

【 0071 】

図 4 および 5 は、ヘパリン、 ASA および IX 因子 m A b BC 2 の aPTT (図 4) および PT (図 5) に対する効果を示すことにより抗凝固剤 / 血栓症養生法の比較薬理学を表す。

出血性体质の重要な指標である aPTT を研究において使用される抗凝固剤 / 血栓症薬の出血傾向に対する効果を評価する第一の基準として用いた。図 4 における結果は、ヘパリンによる用量に依存した aPTT の延長を表し、凝固時間の最大の延長は 2 種の高用量で試験範囲を超えた。 ASA 単独は、 aPTT を著しく増大しなかったが、ヘパリンとの組み合わせにおいて顕著な相乗効果が観察された。 IX 因子 m A b は aPTT に対して適度の効果を有し、最も高い用量においても、凝固時間の増大は臨床的に実施される標準的抗凝固剤の限度の 3 倍を越えなかった。最も注目に値することは、低用量の IX 因子 m A b BC 2 は ASA との組み合わせにおいて aPTT を変化させなかった。

【 0072 】

図 5 において、データは PT もヘパリンにより 2 種の高用量で、また ASA + ヘパリンの組み合わせにより著しく延長されるが、 IX 因子 m A b 単独または ASA との組み合わせでは延長されないことを示す。

ヘパリン、 ASA および IX 因子 m A b の頸動脈閉塞に対する効果を図 6 に示す。結果は、すべてのビヒクル処置された動物の頸動脈は損傷に反応して閉塞することを示す。ヘパリンは用量に依存して頸動脈の閉塞を抑制した。最高の用量でヘパリンは完全に頸動脈の閉塞を防止したが；この用量では凝固は開始できなかった。 ASA 単独は頸動脈の閉塞に対してわずかな影響しかなかった。 ASA とヘパリンの組み合わせも頸動脈の閉塞を完全に防止できなかった。 IX 因子 m A b は 2 種の高用量で頸動脈閉塞を完全にプロックし、臨床的に望ましい目的値を越えて凝固を延長しなかった。さらに低い用量の IX 因子 m A

10

20

30

40

50

bは、単独では開通性をほとんど確実にできなかつたが、ASAとの組み合わせにおいて投与された場合には頸動脈閉塞を完全に抑制した。

【0073】

ヘパリン、ASAおよびIX因子mAbの血栓重量に対する効果を図7に示す。ヘパリンは用量に依存して頸動脈における血栓量を減少させた。しかしながら、完全に凝固をブロックしたにもかかわらず、頸動脈において幾分血栓が残存しているのが見られた。ASA単独またはヘパリン(30U/kg)との組み合わせにおいては血栓重量に対して部分的な効果しかなかつた。IX因子mAbは用量に依存して血栓量を減少させ、高用量は実質的に完全に血栓形成を防止した。さらに、低用量の高IX因子mAbとASAとの組み合わせは、凝固インデックスに悪影響を及ぼさずに頸動脈閉塞を完全に防止する方法であるが、血栓形成を完全に防止した。

ラット頸動脈血栓症モデルにおいて実施された実験は、IX因子mAbの高血栓発生性動脈損傷モデルにおける血栓症の防止を明らかに示す。最も注目すべきことには、IX因子mAbの効果は、aPTTにより規定される所望の抗凝固目的内であることが示された。さらに、現在用いられている標準的抗凝固剤であるヘパリンは、非凝固性血液を生じる程度まで凝固をひどく損なう用量でのみIX因子mAbに匹敵する効果に達した。興味深いことに、観察されたASAとヘパリンの共同処置により得られる増強および相乗効果は、ASAを抗-IX因子mAbとともに投与した場合にもみられた。しかしながら、抗血栓および抗凝固効果の両方を増強するヘパリンとASAの組み合わせと異なり、IX因子mAbとASAの組み合わせは抗血栓効果を増強するが、ex vivo血液凝固パラメータに対しては一貫した影響を及ぼさなかつた。併せて考えると、データは、ヘパリン、ASAまたはヘパリンとASAの組み合わせと比較して優れたIX因子mAbの抗血栓症能力を示す。

【0074】

実施例4

ラット血栓症モデルの走査電子顕微鏡検査法

ラット頸動脈のセグメントをシャム、塩化鉄のみおよび塩化鉄+6mg/kg IX因子抗体から、一群につき3個、塩化鉄を適用後15分で集めた。ホルムアルデヒドで灌流することにより動脈を固定し、損傷部分の上下で結紮した。固定された動脈を脱水し、ヘキサメチルジシラザン中でインキュベートし、デシケーター中で乾燥した。乾燥した動脈を縦に切開し、走査電子顕微鏡(SEM)スタブ上にのせ、金でスパッターコートした。

シャム動脈のSEMにより、本質的に正常な内皮は血小板がほとんど散乱していないことが明らかになつた。内皮にいくつかの切れ目があり、これはおそらく手術中の機械的損傷の結果で、その下にある基底膜が一面血小板により覆われていた。シャムラットにおいては血栓形成の証拠は観察されなかつた。

塩化鉄で処置した動脈のSEMにより、大きな壁面の血栓が明らかになり、これは血管の管腔の大部分を占めていた。血栓は凝集した血小板、赤血球ならびに無定型および纖維状蛋白物質からなつていていた。蛋白物質はフィブリンと一致する。動脈の内皮は大きな血栓によりほとんど不明瞭であった。見えるところは、塩化鉄で処置した部分の上に重なる内皮は多くの接着性血小板および無定型蛋白物質により覆われていた。

IX因子抗体で処置されたラットから得られた塩化鉄で処置された動脈のSEMにより、血管の管腔は血栓がほとんどないことが明らかになつた。塩化鉄で処置された部分に重なる内皮は、甚大な損傷を示し、一部は接着性血小板および血小板凝集物で覆われているが、蛋白物質はほとんどないかまたはなかつた。

【0075】

実施例5

抗-IX因子mAb BC2重および軽鎖cDNA配列分析

全RNAをTriReagent(Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH)を用いて、製造業者のプロトコルに従つて精製した。RNAをイソプロパノールで沈殿させ、0.5%SDS中に溶解させ、0.

10

20

30

40

50

5 M NaClで調節した。ポリA⁺ RNAをDynabeads Oligo(dT)₂₅(Dynal A. S., Lake Success, NY)で、製造業者のプロトコルに従って単離した。ポリA⁺ RNAをビーズから溶出させ、TE緩衝液中に再懸濁させた。100ngのRNAの12アリコートを製造業者の指示(Boehringer Mannheim Cat. No. 1483-188)によりRT-PCRキットでプライミングのためのdT oligoを用いて逆転写した。重鎖について、6RNA/DNAハイブリッドのPCR増幅を、ネズミIgG2aヒンジプライマー(配列番号1)および重鎖シグナル配列プライマー(配列番号2)を用いて25サイクル行った。同様に、軽鎖について、6RNA/DNAハイブリッドのPCR増幅を、ネズミカッパプライマー(配列番号3)および縮重鎖シグナル配列プライマー(配列番号4)を用いて25サイクル行った。12回の増幅のそれから得られたPCR産物を、PCR2000ベクター(TAクローニングキット、Invitrogen, Cat. No. K2000-01)中に結紮した。組換えクローンのコロニーをランダムに選び出し、プラスミドDNAのミニ調製物を、Birnboim and Doly in Nucleic Acids Res. 7, 1513(1979)により記載されているアルカリ抽出法を用いて調製した。単離されたプラスミドDNAをEcoRIで消化し、0.8%アガロースゲル上で分析した。適当な大きさ、すなわち重鎖については約700bp、軽鎖については約700bpの二本鎖cDNA挿入物をSanger法の変法により配列化させた。全12の重および軽鎖の配列を比較して、コンセンサスBC2重鎖可変領域配列(配列番号5)およびコンセンサスBC2軽鎖可変領域配列(配列番号6)を得た。

10

BC2重鎖可変領域cDNAの配列分析により、121のアミノ酸配列(配列番号7)をコードする363のスクレオチドオープンリーディングフレームが明らかになった。重鎖CDR1、2および3配列をそれぞれ配列番号8、9および10に示す。

20

BC2軽鎖可変領域cDNAの配列分析により、107のアミノ酸配列(配列番号11)をコードする321のスクレオチドオープンリーディングフレームが明らかになった。軽鎖CDR1、2および3配列をそれぞれ配列番号12、13および14に示す。

20

【0076】

実施例6

ヒト化抗体

SB249413、SB249415、SB249416、SB249417、SB257731およびSB257732と称する6のヒト化抗体を、ヒト抗体フレームワーク中に前記のネズミCDRを含むように設計した。

30

SB249413

SB249413は重鎖F9HZHC1-0および軽鎖F9HZLC1-0を含む。合成可変領域ヒト化重鎖F9HZHC1-0は、免疫グロブリンRF-TS3'CL(Capra, J. D. ら、J. Clin. Invest. 86, 1320-1328(1990)、KabatデータベースにおいてKabp ro: Hhc10wと同定)から得られた重鎖の最初の3つのフレームワーク領域およびすでに記載されたBC2重鎖CDRを用いて設計された。CDR提示に影響を及ぼし得るフレームワークアミノ酸置換は生じなかつた。4のオーバーラップする合成オリゴスクレオチドが生じ(配列番号15、16、17および18)、これはアニールされ、拡張された場合、CDR3(配列番号19および20)を含む重鎖可変領域を表すアミノ酸をコードする。この合成遺伝子を次にPCRプライマー(配列番号21および22)を用いて増幅し、PCR2000ベクター(TAクローニングキット、Invitrogen, Cat. No. K2000-01)中に結紮し、SpeI、KpnI制限消化物から単離した。可変領域(配列番号23および24)の最初の5個のアミノ酸を含むcappathシグナル配列をコードする第二のDNAフラグメントを、ヒト化抗呼吸器合胞体ウイルス重鎖(配列番号25)をコードする構築物の適当な領域を2のプライマー(配列番号26および27)でPCR増幅させ、制限酵素EcoRIおよびSpeIで消化することにより調製した。生じた2つのフラグメントを、残りのヒトコンセンサスフレームワーク4およびIgG1定常領域を含むEco

40

40

50

R 1、K p n I 消化された p F H Z H C 2 - 6 p C D 哺乳動物細胞発現ベクター中に結紮した。ベクターは公開国際特許出願番号 WO 94 / 05690 に記載されている p F H Z H C 2 - 3 p C D ベクターの 1 つのアミノ酸変異を含んでいた。p F H Z H C 2 - 3 p C D を X b a I および E c o R 5 で消化し、2 つの合成オリゴヌクレオチド（配列番号 28 および 29）から生じたリンカーを挿入することにより、フレームワーク 2 の最終残基（残基 49）を S e r から A l a に突然変異させた。F 9 H Z H C 1 - 0 挿入物の配列を配列番号 30 および 31 に示す。

合成可変領域ヒト化軽鎖 F 9 H Z L C 1 - 0 を、免疫グロブリン L S 8 ' C L (C a r m a c k ら、J. E x p. M e d. 169, 1631 - 1643 (1989)、K a t b a t データベースにおいて K a b p r o : H k 1 3 1 8 と同定) から得られたヒト軽鎖のフレームワーク領域およびすでに記載された B C 2 軽鎖 C D R を用いて設計した。C D R 提示に影響を及ぼし得るフレームワークアミノ酸置換は生じなかった。2 つのオーバーラップする合成オリゴヌクレオチドが生じ（配列番号 32 および 33）、これはアニールされ、拡張された場合に、軽鎖可変領域（配列番号 34 および 35）を表すアミノ酸をコードする。この合成遺伝子を次に P C R プライマー（配列番号 36 および 37）を用いて増幅し、p C R 2 0 0 0 ベクター（T A クローニングキット、I n v i t r o g e n, C a t. N o. K 2 0 0 0 - 0 1）中に結紮し、S c a I、S c a I I 制限消化物から単離した。可変領域の最初の 2 個のアミノ酸（配列番号 38 および 39）を含む c a m p a t h シグナル配列をコードする第二の D N A 配列フラグメントを、ヒト化抗呼吸器合胞体ウイルス重鎖（配列番号 25）をコードする構築物の適当な領域を 2 つのプライマー（配列番号 26 および 40）で P C R プライマー増幅し、制限酵素 E c o R I および S c a I で消化することにより調製した。生じた 2 つのフラグメントを、残りのヒトフレームワーク 4 およびカッパ定常領域を含む E c o R 1、S c a I I 消化 p F H z L C 1 - 2 p C N 哺乳動物細胞発現ベクター中に結紮した。ベクターは、公開国際特許出願番号 WO 94 / 05690 に記載されている p F H Z L C 1 - 1 p C N ベクターの 1 つのアミノ酸突然変異を含んでいた。p F H Z L C 1 - p C N を S m a I および K p n 1 で消化し、2 つの合成オリゴヌクレオチド（配列番号 41 および 42）から生じたリンカーを挿入することにより、フレームワーク 2 残基を S e r から P r o へ突然変異させた。F 9 H Z L C 1 - 0 挿入物の配列を配列番号 43 および 44 に示す。

【 0 0 7 7 】

30

S B 2 4 9 4 1 5

S B 2 4 9 4 1 5 は重鎖 F 9 H Z H C 1 - 1 および軽鎖 F 9 H Z L C 1 - 1 を含む。これらの重および軽鎖構築物はそれぞれ F 9 H Z H C 1 - 0 および F 9 H Z L C 1 - 0 に基づくが、これらは C D R 提示に影響を及ぼし得るフレームワークアミノ酸置換を有する。

F 9 H Z H C 1 - 1 は C D R 提示に影響を及ぼし得る 3 つのフレームワークアミノ酸置換を有する。2 つのオーバーラップする合成オリゴヌクレオチドが生じ（配列番号 45 および 46）、これは、アニールされ、拡張された場合に、改変された重鎖可変領域（配列番号 47 および 48）の改変された部分を表すアミノ酸をコードする。この合成遺伝子を次に P C R プライマー（配列番号 49 および 50）を用いて増幅し、p C R 2 0 0 0 ベクター（T A クローニングキット、I n v i t r o g e n, C a t. N o. K 2 0 0 0 - 0 1）中に結紮し、E c o N I、K p n I 制限消化物から単離した。このフラグメントを E c o N I、K p n I 消化 F 9 H Z H C 1 - 0（配列番号 30）ベクター中に結紮した。F 9 H Z H C 1 - 1 挿入物の配列を配列番号 51 および 52 に示す。

40

F 9 H Z L C 1 - 1 は、C D R 提示に影響を及ぼし得る 4 つのフレームワークアミノ酸置換を有する。2 つの合成オリゴヌクレオチドが生じ（配列番号 53 および 54）、これはアニールされた場合に、K p n I および B a m H I 付着末端を有し、軽鎖可変領域（配列番号 55）の改変された部分を表すアミノ酸をコードする。F 9 H Z L C 1 - 0（配列番号 43）を制限酵素 K p n I および B a m H I で消化し、合成 D N A 配列と結紮した。F 9 H Z L C 1 - 1 挿入物の配列を配列番号 56 および 57 に示す。

【 0 0 7 8 】

50

S B 2 4 9 4 1 6

S B 2 4 9 4 1 6 は重鎖 F 9 H Z H C 1 - 1 (前記) (配列番号 5 2) および軽鎖 F 9 H Z L C 1 - 2 を含む。軽鎖構造は F 9 H Z L C 1 - 1 に基づくが、これは C D R 提示に影響を及ぼし得るもう一つのフレームワークアミノ酸置換を有する。

2つの合成オリゴヌクレオチドが生じ (配列番号 5 8 および 5 9) 、これらは、アニールされた場合に B a m H I および X b a I 付着末端を有し、軽鎖可変領域 (配列番号 6 0) の改変された部分を表すアミノ酸をコードする。F 9 H Z L C 1 - 1 (配列番号 5 6) ベクターを制限酵素 B a m H I および X b a I で消化し、合成 D N A と結縫した。F 9 H Z L C 1 - 2 挿入物の配列を、配列番号 6 1 および 6 2 に示す。

【0 0 7 9】

10

S B 2 4 9 4 1 7

S B 2 4 9 4 1 7 は重鎖 F 9 H Z H C 1 - 1 (前記) (配列番号 5 2) および軽鎖 F 9 H Z L C 2 - 0 を含む。F 9 H Z L C 2 - 0 合成可変領域ヒト化軽鎖を、免疫グロブリン R E I (P a l m a n d H i l s c h e m a n n, Z. P h y s i o l . C h e m . 3 5 4, 1 6 5 1 - 1 6 5 4 (1973) K a b a t データベースにおいて K a b p r o : H K L 1 1 1 と同定) から得られるヒト軽鎖のフレームワーク領域およびすでに記載した B C 2 軽鎖 C D R を用いて設計した。5 のアミノ酸コンセンサスヒト置換を導入した。C D R 提示に影響を及ぼし得る 6 のフレームワークアミノ酸ネズミ置換が生じた。2 のオーバーラップする合成オリゴヌクレオチドが生じ (配列番号 6 3 および 6 4) 、これは、アニールされ、拡張された場合に、軽鎖可変領域 (配列番号 6 5 および 6 6) を表すアミノ酸をコードする。この合成遺伝子を次に P C R プライマー (配列番号 6 7 および 6 8) を用いて増幅し、p C R 2 0 0 0 ベクター (T A クローニングキット、I n v i t r o g e n, C a t . N o . K 2 0 0 0 - 0 1) 中に結縫し、S c a I 、S c a I I 制限消化物から単離した。可変領域 (配列番号 3 8) の最初の 2 個のアミノ酸を含む c a m p a t h シグナル配列をコードする第二の D N A フラグメントを、抗呼吸器合胞体ウイルス重鎖 (配列番号 2 5) をコードする構築物の適当な領域を 2 つのプライマー (配列番号 2 6 および 6 9) で P C R 増幅し、制限酵素 E c o R I および S c a I で消化することにより調製した。2 つの合成オリゴヌクレオチド (配列番号 7 1 および 7 2) をアニールすることにより、ヒトフレームワーク 4 (配列番号 7 0) の残りをコードし、S c a I I および N a r I 付着末端を有する第三の D N A フラグメントが生じた。F 9 H Z L C 1 - 0 (配列番号 4 3) を制限酵素 E c o R I および N a r I で消化し、3 の D N A フラグメントと結縫した。F 9 H Z L C 2 - 0 挿入物の配列を配列番号 7 3 および 7 4 に示す。

20

【0 0 8 0】

30

S B 2 5 7 7 3 1

S B 2 5 7 7 3 1 は重鎖 F 9 H Z H C 1 - 1 (配列番号 5 2) および軽鎖 F 9 H Z L C 1 - 3 、F 9 H Z L C 1 - 2 (配列番号 6 2) の一つのアミノ酸突然変異を含む。F 9 H Z L C 1 - 2 を 2 つのプライマー (配列番号 2 6 および 6 9) で P C R 増幅し、制限酵素 E c o R I および S c a I で消化した。9 4 b p フラグメント (配列番号 7 5 および 7 6) を単離した。フラグメントを E c o R I 、S c a I 消化された F 9 H Z L C 1 - 2 ベクター中に結縫して、軽鎖構築物 F 9 H Z L C 1 - 3 を得た。F 9 H Z L C 1 - 3 挿入物の配列を配列番号 7 7 および 7 8 に示す。

40

【0 0 8 1】

S B 2 5 7 7 3 2

S B 2 5 7 7 3 2 は、合成可変領域ヒト化重鎖 F 9 H Z H C 3 - 0 および軽鎖 F 9 H Z L C 3 - 0 を含む。4 の重複する合成オリゴヌクレオチドが生じ (配列番号 7 9 、 8 0 、 8 1 および 8 2) 、これは、アニールされ、拡張された場合に、変更される重鎖可変領域 (配列番号 8 3 および 8 4) を表すアミノ酸をコードする。この合成遺伝子を次に P C R プライマー (配列番号 8 5 および 8 6) を用いて増幅し、p C R 2 0 0 0 ベクター (T A クローニングキット、I n v i t r o g e n, C a t . N o . K 2 0 0 0 - 0 1) 中に結縫し、S t u I 、K p n I 制限消化物から単離した。単離されたフラグメントを S t u

50

I、KpnI消化F9HZHC1-1(配列番号52)ベクター中に結紮した。このベクターを次にEcoRI、SpeIで消化して、シグナル配列を除去した。可変領域の最初の5のアミノ酸を含むcampathシグナル配列(配列番号23)をコードするDNA配列フラグメントを、F9HZHC1-0の2つのプライマー(配列番号26および87)でPCR増幅し、制限酵素EcoRIおよびSpeIで消化することにより調製した。生じたフラグメントをベクター中に結紮した。F9HZHC3-0挿入物の配列を配列番号88および89に示す。

【0082】

4のオーバーラップする合成オリゴヌクレオチドが生じ(配列番号90、91、92および93)、これは、アニールし、拡張された場合に、軽鎖可変領域(配列番号94および95)を表すアミノ酸をコードする。この合成遺伝子を次にPCRプライマー(配列番号96および97)を用いて増幅し、pCR2000ベクター(TAクローニングキット、Invitrogen, Cat. No. K2000-01)中に結紮し、SacI、NarI制限消化物から単離した。単離されたフラグメントをSacI、NarI消化F9HZLC1-3(配列番号77)ベクター中に結紮した。F9HZLC3-0挿入物の配列を配列番号98および99に示す。

ヒト化抗-IgX因子mAbをCHO細胞中で発現させた。無血清培地で懸濁増殖に適したDG-44細胞系を、Innova210プラットホームシェーカー(New Brunswick Scientific)上で150rpm、37度、5%CO₂、95%空気加湿インキュベーター中で、250mlの使い捨て滅菌三角フラスコ(Corning)中で1Xヌクレオシドおよび0.05%F68を含む100mlの無蛋白培地中で増殖させた。これらの細胞を4×10⁵細胞/mlで毎週2回継代した。それぞれ15ugのpCN-Lc-軽鎖およびpCD-Hc-重鎖ベクターをNot1での消化により直線化し、無菌条件下で共沈殿させ、50ulの1XTE緩衝液(10mMTris、1mM EDTA、pH7.5)中に再懸濁させた。Bio-Rad Gene Pulser(Bio-Rad Laboratories)を用いてDNAをAcc-98細胞中にHensleyら(J. Biol. Chem. 269, 23949-23958(1994))の技術を用いて電気穿孔(electroporate)した。1.2×10⁷細胞を12.5mlの氷冷PBS sucrose(PBS、272mMシュクロース、7mMリン酸ナトリウムpH7.4、1mMMgCl₂)中で1回洗浄し、0.8mlのPBS中に再懸濁させ、50ulのDNA溶液に添加し、氷上で15分間インキュベートした。細胞を380V、25マイクロファラードでパルスし、次に氷上で10分間インキュベートした。細胞を維持培地中5×10⁵細胞/プレートで96ウェル培養プレート中に24時間選択前に平板培養した。細胞を維持培地中、400ug/mlG418(Geneticin, Life Technologies, Inc.)に対する耐性について選択した。アッセイの24時間前に、細胞に150ulの維持培地を供給した。

【0083】

各コロニーから得た順化培地を、電気化学発光(ECL)検出法を用いてOriginアナライザー(IGEN, Inc.)で分析した。Yangら、Biotechnology, 12, 193-194(1994)を参照のこと。

アッセイを行うために必要な溶液(アッセイ緩衝液)およびアナライザーの操作に必要な溶液(セルクリーナー)はすべてIGENから入手した。抗体(抗ヒトIgG(g-鎖特異性)、Sigma ChemicalおよびヒトIgG(H+L)に対するF(ab')₂フラグメント、Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.)をTAG:NHS-エステル(IGEN, Inc.)でTAG:蛋白=7:1(モル比)で標識し、一方、プロテインA(Sigma)をビオチン-LC-スルホ-NHS-エステル(IGEN, Inc.)でビオチン:蛋白=20:1(モル比)で標識し、両方ともIGENの推奨基準に従った。ストレプトアビシンコートされた磁気ビーズ(M-280)をDynalから入手した。

10

20

30

40

50

【0084】

次のプロトコルを用いてイムノアッセイを行った：サンプルにつき、50u1のストレプトアビジン-コートされたビーズ（最終濃度600ug/ml PBS中希釈、pH7.8、1.25%Tweenを含む）を50u1のビオチン-プロテインA（最終濃度1u1/PBS中希釈、pH7.8、1.25%Tweenを含む）と混合し、室温で15分間攪拌しながらインキュベートし、50u1のTAG抗体（最終濃度1.25ug/mlのヒトIgG(H+L)に対するF(ab')₂フラグメントおよび0.25ug/mlのPBS(pH7.8、1.25%Tweenを含む)中に希釈した抗ヒトIgG(g-鎖特異性)との混合物）を添加し、溶液を次に50u1の順化培地に添加し、攪拌しながら室温で1時間インキュベートした。200u1のアッセイ緩衝液を反応ミックスに添加し、サンプルをOrigin IIアナライザーで分析して、ECLを測定した。結果から、分析したコロニーの約20~37%が15ng/mlを越える抗体を分泌し、平均的発現は約150ng/mlであることがわかった。
10

【0085】

Procep A捕捉工程を用いてヒト化抗-IX因子mAbを順化培地から精製し、続いてイオン交換クロマトグラフィーを行い、DNA負荷を軽減した。Procep A吸着物質(Bioprocessing Ltd., Durham, England)を用いて、直径：高さ比が1:1のカラムを調製した。透明化順化培地を150cm/時でカラムにかけた。カラムを連続して、リン酸塩緩衝塩溶液(PBS)、1M NaClを含有するPBS、および最終的にPBSで洗浄した。結合物質を0.1M酢酸溶出で回収した。溶出液をpH5.5に調節し、水で希釈した(1:4)。希釈された溶液を、20mM酢酸ナトリウム、pH5.5で前平衡化したS-セファロースカラム(2.5×13cm)上に80cm/時でかけた。カラムを酢酸塩緩衝液で一定のベースラインが得られるまで洗浄し、結合した蛋白を20mMリン酸ナトリウム(pH7.4)で25cm/時で溶出させた。溶出した物質を0.4ミクロン膜で濾過し、4で貯蔵した。
20

【0086】

実施例7

マウス-ヒトキメラ抗体

100ngのBC2 RNAをRT-PCRキットで製造業者の指示に従い(Boehringer Mannheim Cat. No. 1483-188)、プライマーのためにdT oligoを用いて逆転写し、合成Scal I(配列番号100)およびNar I(配列番号101)プライマーを用いてPCRプライマー増幅して、Scal 1、Nar 1末端(配列番号102および103)を有するBC2軽鎖可変領域を得た。このDNA配列をScal I、Nar I消化されたF9HZHC1-3(配列番号77)中に結合し、Scal I、Nar Iで消化して、マウス-ヒトキメラ軽鎖F9CHLC(配列番号104および105)を得た。
30

100ngのBC2 RNAをRT-PCRキットで製造業者の指示に従い(Boehringer Mannheim Cat. No. 1483-188)、プライマーのためにdT oligoを用いて逆転写し、合成Spe I(配列番号106)およびNhe I(配列番号107)プライマーでPCRプライマー増幅して、Spe 1、Nhe 1末端(配列番号102および103)を有するBC2重鎖可変領域を得た。campathシグナル配列をRSVHZ19重鎖(配列番号25)からEcoRI(配列番号26)およびSpe I(配列番号87)プライマーでPCR増幅した。これらの2つのDNAフラグメントを、公開国際特許出願番号WO95/07301に記載されたEcoRI、Nhe I消化されたIL4CHHCpcdベクター(IL4可変領域をBC2IX因子マウス可変領域で置換)中に結合して、マウス-ヒトキメラ重鎖F9CHHC(配列番号110および111)を得た。
40

104および105を得た。

マウス-ヒトキメラ抗体ch F IXの同時形質導入をヒト化構築物に関してすでに記載したようにして行った。
50

【0087】

実施例8

ラット血栓症モデルにおけるIX因子mAbの効果

ヒト化抗-IX因子抗体の動脈血栓症の防止における効果を評価するために、実施例3に記載したラット頸動脈血栓症モデルを使用した。ベースラインパラメータを頸動脈血流、動脈圧、心拍数、血管開放性および活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)について確立した。15分後、頸動脈損傷を10分間行った。パラメータを頸動脈損傷開始後60分で測定した。頸動脈血栓を頸動脈から取り出し、秤量した。

すべての試薬を頸動脈損傷開始の15分前に静脈内投与した。次の処置を調べ、抗-IX因子mAb BC2と比較した。

10

1. ビヒクル

2. ch FIX : 3 mg / kg ボーラス

3. SB249413 : 3 mg / kg ボーラス

4. SB249415 : 3 mg / kg ボーラス

5. SB249416 : 3 mg / kg ボーラス

6. SB249417 : 3 mg / kg ボーラス

7. SB257731 : 3 mg / kg ボーラス

8. ヘパリン : 60単位 / kg ボーラス + 2単位 / kg / 分注入

【0088】

aPTTを、実験において使用した抗凝固剤/血栓症薬の効果対出血傾向の評価の一次基準として使用した。図8における結果は、ヒト化IX因子mAb SB249413、SB249415、SB249416、SB249417およびSB257731は3.0 mg / kg でaPTTに対して適度の効果を有し、これは臨床的に許容される範囲内であることを示す。

20

IX因子mAbの血栓塊に対する効果を図9に示す。結果は、ヒト化mAbはすべて血栓塊を減少させるのに等しく有効であることを示す。

ラット頸動脈血栓症モデルにおいて行った実験は、高血栓発生性動脈損傷モデルにおけるヒト化IX因子mAbの血栓症防止における効果を示す。最も注目すべきことは、ヒト化抗-IX因子mAbのすべての効果は、aPTTにより定義される所望の治療的抗凝固目的内にあることが示された。

30

【0089】

実施例9

抗体の生化学的および生物物理学的性質

SB249417の分子量をMALD-MSで測定すると148000Daであった。SB249417の超遠心分析により同じ値が得られた。IX因子 + Ca²⁺の存在下で、BC2から得られる抗体はmAbと2分子のIX因子の合計量に対応する248000Daの塊で沈降した。より高次の凝集物の証拠はIX因子の存在下または非存在下で観察されなかった。

SB249417と結合するIX因子の速度論を、固定化プロテインA表面に結合した抗体でのBIAcore分析により評価した。49nMの組換えヒトIX因子(rhFIX、Genetics Institute)を用い、測定を5mM Ca²⁺の存在下で行った。相互作用は、急速な会合、 $k_{ass} = 2.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ および比較的遅いオフ速度、 $k_{diss} = 4.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ により特徴づけられた。IX因子結合のK_dの計算値は1.9nMであった。

40

表1にSB249417の生物物理学的性質をまとめた。

【0090】

【表2】

表 1

249417の生物物理学的性質のまとめ	
イソ型	I g G 1、カッパ
SDS-PAGE による純度	> 95% (減少する条件下)
分子量	
質量分光法	148000 Da
分析用超遠心分離法	148000 Da
I X因子結合の化学量論性	
等温滴定熱量測定法	I X因子 1.5 モル/mAb 1 モル
I X因子結合アフィニティ	
等温滴定熱量測定法	25°Cで $K_d = 4 \text{ nM}$
バイオセンサー	$K_d = 2 \text{ nM}$
I X因子結合速度論	
バイオセンサー	$K_{ass} = 2.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $K_{dis} = 4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

【0091】

表2に本発明のmAbのIX因子結合特性をまとめた。計算された解離定数は実験誤差の範囲内で本質的に同一であった。

30

【0092】

【表3】

表2

IX因子の抗-IX因子mA bに対する結合の速度論

mA b	k _{ass} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{dis} (s ⁻¹)	k _p 計算値 (nM)
SB 249417	2.0 ×10 ⁵	4.1×10 ⁻⁴	1.9
BC2	4.8×10 ⁵	9.1×10 ⁻⁴	1.9
Chf9	2.4 ×10 ⁵	3.0×10 ⁻⁴	1.3
SB 249413	6.5 ×10 ⁵	2.8×10 ⁻³	3.7-5.1
SB 249415	7.5 ×10 ⁵	1.8×10 ⁻⁴	1.1-2.3
SB 249416	5.2 ×10 ⁵	4.1×10 ⁻⁴	0.8
SB 257731	9.2 ×10 ⁵	9.9×10 ⁻⁴	1.1
SB 257732	1.1 ×10 ⁶	1.2×10 ⁻³	1.5

20

30

【0093】

r h F IX と S B 2 4 9 4 1 7 、 B C 2 と他のヒト化構築物間の相互作用を、結合の固有熱から溶液中の結合相互作用を測定する滴定ミクロ熱量測定により特徴づけた。106 uMのF IXを、2 uM mA b S B 2 4 9 4 1 7 を含むカロリーメーター中に9回注入した。結合を最初の4回に注入において発熱として検出した。後の5回の注入で、mA b 結合部位がF IXで飽和され、混合物のバックグラウンド熱だけが観察された。結果は、予想されるように、mA b につき略2のF IXのモル結合比で当量点が生じることがわかった。データの非線形最小二乗分析により結合親和性が得られる。

【0094】

mA b のr h F IX 親和性を34~44 の温度範囲にわたって、10 mM HEPES、10 mM CaCl₂、150 mM NaCl、pH 7.4 中で測定した。これらのデータから、37 での親和性を直接測定でき、25 での親和性がvan't Hoff式から計算できる。表3におけるデータは、S B 2 4 9 4 1 7 、B C 2 およびその他のヒト化構築物の親和性が誤差内(ファクター2)で同一であることを示す。

【0095】

【表4】

表3

抗FIX mAbの滴定熱量測定の結果

mAb	Kd, nM (25°C)	Kd, nM (37°C)	モル結合比 FIX/mAb		
BC2	10	20	1.4		
SB 249413	6	12	1.9		10
SB 249415	3	7	1.7		
SB 249417	4	12	1.5		
SB 257732	4	9	1.8		

10

20

30

40

【0096】

mAb SB 249413、SB 249415、SB 249417 および SB 257732 はすべて示差走査熱分析により非常に類似した熱安定性を示した。そのアンフォールディングT_msは70～75 の範囲であり、熱により誘発される変性に対して高度に安定性であることを示す。

【0097】

実施例10

IX因子の抗体により媒介される阻害の機構

ホモローガスな蛋白VII因子のフレームワーク中にスプライシングされたIX因子の配列からなるキメラ構築物のライブラリーを構築し、IX因子BC2 mAbのエピトープをマップするために使用した。Cheungら、Thromb. Res. 80, 419-427 (1995) を参照のこと。Biacore 2000表面プラズモン共鳴装置を用いて結合を測定した。NHS/EDC反応を用いてBC2抗体をチップに直接結合させた。結合を2分の接触時間により20uL/分で、25mM MOPS、H7.4、0.15M NaCl、5mM CaCl₂中、それぞれ200nMの所定の構築物で測定した。同じ緩衝液で蛋白を含まないものを用いて解離を3分間モニターした。50mM EDTAの存在下で野生型構築物について結合は検出されなかった。結果を表4に示す。

【0098】

【表5】

表4

IX因子構築物のBC2抗体に対する結合のまとめ

構築物	結合の程度	
血漿 IXa	結合	
r-IX	結合	
血漿 VII	結合なし	10
IX LC/VII HC	結合	
IX-A/VII	結合	
VII gla/IX	結合なし	
VII-A/IX	結合なし	
VII gla (IX 3-11)/IX	結合	
VII gla (IX 3-6)/IX	非常に弱い結合	20
VII gla (IX 9-11)/IX	非常に弱い結合	
IX K5A	結合	

【0099】

これらのデータから、IX因子軽鎖およびVII因子重鎖(IX LC/VII HC)；IX因子g1aおよび芳香族スタックドメイン(IX-A/VII)；VII因子g1aドメイン内のIX因子g1aドメインの3-11残基(VII gla (IX 3-11)/IX)；および残基5でリシンからアラニンへの置換を有するIX因子(IX 5K A)を含む構築物はBCに対する結合を示すことがわかる。VII gla (IX 3-11)/IX構築物は、野生型IX因子(血漿IXaおよびr-IX)と同等のBC2結合を示した。従って、BC2抗体はIX因子g1aドメインの3-11残基内に含まれるエピトープと結合する。

【0100】

実施例11

動脈血栓症の抗-IX因子抗体および組織型プラスミノーゲンアクチベーターでの処置動脈を完全に閉塞させた後にtPAの投与(補助的治療を伴うかまたは伴わない)を開始した。動脈中の血流を連続してモニターした。

オスSprague-Dawleyラット(Charles River, Raleigh, NC)(体重300~490グラム)をペントバルビタールナトリウムで麻酔した(55mg/kg、i.p.)。ラットを加熱された(37)手術板上に仰向けに寝かせ、首を切開し；気管を取り出し、PE-240 Intramedicチューブでカニューレ挿入した。左の頸動脈および頸静脈を次に取り出した。血流を測定するために、パラフィルムMシート(4mm²、American National Can)を頸動脈の下に置き、電磁気血流プローブ(Carolina Medical)を動脈上においた。薬剤投与のために、カニューレ(Tygon、0.02"×0.04"、Norton Performance Plastics)を頸静脈内に挿入した。左大腿動脈を次に取り出し、血圧の測定および血液サンプルを集めるためにカニューレを挿入した。

【0101】

10

20

30

40

50

実施例3に記載したように血流プローブから下流の頸動脈上に10分間おいた直径6.5mmのFeCl₃溶液(50%)で飽和させたガラス製ミクロフィルターペーパーの円状パッチを用いて頸動脈における血栓症を開始させた。このよく特徴づけられたモデルにおいて、血栓形成は通常15分以内に完了する。

抗-I X因子抗体、SB249415をtPA(Genetic, South San Francisco, CA)との組み合わせにおいてボーラスとして投与し、一方、ヘパリン(Elkins-Sinn Inc., Cherry Hill, NJ)をボーラスとして投与し、その後注入した。すべての薬剤注入は実験期間の最後まで - 血管閉塞時から60分、継続した。血液サンプル(1mL)をaPTTおよびPTアッセイのために、0、30および60分(実験の最後)で大腿動脈から3.8%クエン酸塩溶液中に集め、遠心分離した。aPTTおよびプロトロンビン時間(PT)をフィブロメーター(BB1L, Baxter Dade または MLA Electra 800 Automatic Coagulation Timer)により標準的方法でモニターした。実験の最後に、血栓を頸動脈から抽出し、秤量した。

【0102】

すべてのデータは、各グループにおけるラットの表示された数についての平均グループ値±SEMとして表す。複数比較のためのANOVAおよびBonferroni試験をグループ間分析に用い、p<0.05を有意とした。

閉塞性血栓の形成は、FeCl₃処置されたパッチをラット頸動脈に適用することにより頸動脈損傷を開始した後略15分で起こった。図10に示すように、tPA単独では、閉塞された血管の再灌流は、9mg/kgの量のtPAを投与した後にのみ観察され、処置された血管の67%が60分のプロトコル中に血流を回復した。このtPAの用量で、60U/kgヘパリンまたは3mg/kg抗-I X因子抗体SB249415を含めることにより、さらに再灌流の発生率は増大せず、このことはFeCl₃損傷モデルにおいて約30%の血栓は溶解しにくいことを示唆する。

【0103】

図10に示す結果は、低用量のtPAでは、再灌流の発生率は、どの抗凝固剤が血栓溶解剤と同時に投与されるかに非常に依存することを示す。60U/kgのヘパリンを投与する場合、再灌流を示す血管のパーセンテージは劇的に減少し、3および6mg/kgのtPAについて、それぞれわずか12.5%および40%の再灌流しか観察されなかった。しかしながら、3mg/kgのSB249415をtPAと同時に投与すると、3mg/kgのtPAでの再灌流の60%以上、6mg/kgのtPA用量での再灌流の79%以上を達成した。このように、抗-I X因子抗体は血栓溶解用量応答曲線を著しくシフトさせ、低用量の血栓溶解剤での再灌流を可能にする。

【0104】

血栓溶解および血塊形成は動的プロセスであり、開放とそれに続く再閉塞の期間が観察される場合があった。頸動脈血流を60分の実験プロトコル中連続してモニターしたので、頸動脈開放の合計時間を定量化することも可能であった。図11に示すように、血管開放の合計期間は、3mg/kgの抗-I X因子抗体+tPAの組み合わせにより実質的に増大する。これはtPAの最低量および中程度の量、それぞれ3および6mg/kgで明らかである。60U/kgのヘパリン+3mg/kgのtPAの組み合わせについて7.1±7.1分であるのに対して、3mg/kgのSB249415+3mg/kgのtPAの組み合わせた量で合計開放時間は30.6±9.2分であった。開放時間は3mg/kgのtPA単独では0であった。6mg/kgのtPAの用量で、ヘパリンと同時に投与すると、開放時間が非常にわずかに12.9±6.0分まで増大し、一方、tPA-SB249415の組み合わせは最大開放時間38.7±8.4分を達成する。tPAの最高用量(9mg/kg)でのみ、ヘパリンの組み合わせとSB249415で達成される開放時間は近づく(それぞれ31.9±4.8分および38.0±8.4分)。

【0105】

動脈梗塞後の血流の急速な回復は、虚血組織の損傷を最小限に抑えるために重要である。

10

20

30

40

50

図12における結果は、抗-I X因子抗体とt P Aとの組み合わせにより、t P A単独またはヘパリン+t P Aの組み合わせと比較して再灌流までの時間を減少させ、これはより低用量のt P Aで達成されることを示す。血栓溶解が3 mg / kgのSB249415+3 mg / kgのt P Aで行われる場合、血栓溶解までの時間は29.4±9.2分であった。3 fm g / kgのt P A単独では、再灌流は観察されなかった。60 U / kgヘパリン+3 mg / kg t P Aでは、血栓溶解までの時間は52.8±7.1分であった。より高用量、6および9 mg / kgのt P Aで、抗体+t P A処置法は、それぞれ19.4±6.3および20.8±8.7分以内で初期血栓溶解を達成した。添加された抗凝固剤の非存在下で、血栓溶解までの時間は6および9 mg / kgの用量に対してそれぞれ60分(すなわち、実験プロトコルの限度)および27.5±6.4分であった。60 U / kgヘパリンを添加すると、対応する血栓溶解までの時間は、44.0±7.1および27.0±4.9分であった。従って、SB249415を用いると、ヘパリンまたはt P A単独を用いるよりも早い再灌流が常に達成された。

【0106】

実施例12

止血機能に対する抗-I X因子抗体の効果

抗-I X因子またはヘパリンの補助剤としての止血機能の維持に対する影響を、t P A単独、t P A+ヘパリンおよびt P A+SB249415で処置したラットにおける治療期間の最後でのフィブリノーゲン、プラスミノーゲンおよびアルファ-2-抗プラスミンのレベルをモニターすることにより測定し、結果をビヒクル処置動物と比較した。図13において示すように、t P Aの用量が増大すると、測定される止血マーカーのそれぞれのレベルが減少した。アルファ-2-抗プラスミンのレベルはt P Aで処置されていない動物において約90%から、t P Aの用量が9 mg / kgに増大するにつれ約20%まで減少した。プラスミノーゲンレベルは、t P A処置をしない平均約100%から9 mg / kg処置群における約40%まで減少した。同様に、フィブリノーゲンレベルは約150 mg / d Lから高用量t P A群における約90 mg / d Lまで減少した。興味深いことに、補助剤の選択はこれらのマーカーに著しい影響を及ぼさないようである。各t P A用量で、同様のレベルのアルファ-2-抗プラスミン、プラスミノーゲンおよびフィブリノーゲンが、ビヒクル、30または60 U / kgのヘパリンあるいは1または3 mg / kg SB249415を投与された動物において観察され；止血マーカーにおいて観察される減少は血栓溶解剤t P Aの用量の関数であり、これらの減少は、特にフィブリノーゲンの場合において、6 mg / kg以上のt P A量、すなわち9 mg / kgの高用量群について特に大きいようである。

【0107】

異なる治療法の標準a P T T凝固アッセイa P T Tに対する効果もモニターした(図14)。t P Aの用量が増大すると、a P T Tはビヒクルおよび9 mg / kg t P Aについてそれぞれ19.3 s±0.6 sから30.0 s±1.6 sまで増大した。3 mg / kgのSB249415を投与すると、対照動物のa P T Tにおいて49.6 s±6.4 sまでわずかに増加した。SB249415をt P Aと同時投与した場合、観察される増加は若干大きく、t P Aの用量によって変わった。SB249415と3 mg / kgのt P Aとの組み合わせによりa P T Tが58.3 s±5.2 sになり、一方、SB249415と9 mg / kg用量のt P Aはa P T Tを77.3 s±19.7 sまで増大させた。30 U / kgまたは60 U / kgの量のヘパリンのいずれかを投与すると、a P T Tが大きく増大した。t P Aなしでは、30および60 U / kgの用量についてa P T Tはそれぞれ約300 s~600 sまでの範囲であった。t P A処置された動物において、a P T Tは約800 sであった。

ヘパリンで得られるa P T Tの向上は、有効な再灌流を達成するために高用量のt P Aが必要なので、特に止血パラメータの摂動と結合した場合に、出血傾向に寄与しやすい。反対に、SB249415はa P T Tの大きく増大させず、さらに少量のt P Aの使用を可能にし、心筋梗塞および発作の血栓溶解療法において著しい利点を提供する。

【0108】

実施例 13

S B 2 4 9 4 1 7 は発作における組織型プラスミノーゲンアクチベーターの溶解可能性を増大させる

これらの研究において使用したラット血栓塞栓性発作モデルは、B u s c h らにより B r a i n R e s e a r c h , 7 7 8 , 1 6 - 2 4 (1 9 9 7) において記載されているものと本質的に同じであった。モデルの 3 つの主な段階は、塞栓の調製、ラットの準備とそれに続く塞栓形成、および薬理学的調査である。

全血をドナーラットからクエン酸塩加ヴァキュテナー管中に抜き取った。クエン酸塩加血 (5 0 0 u l) をすぐに 1 単位のヒトトロンビンと 5 u l の 1 M C a C l ₂ を含む試験管に添加した (最終 C a C l ₂ 濃度 1 0 m M) 。 5 ~ 1 0 秒以内に、このカクテルの少量を長さ約 1 5 c m の P E 5 0 カテーテル中に抜き取り、室温で 1 時間凝固させた。この期間の最後に、管状血塊をカテーテルから塩溶液で満たしたペトリ皿中に押し出し、1 . 5 m m の長さの断片に切り出した。これらの断片 (血塊) の 1 2 個を 0 . 0 4 m g m l ラットアルブミンを含む塩溶液中に移し、約 6 0 u l の体積で P E 5 0 カテーテル中に戻した。ラット中に塞栓を形成するために血塊をカテーテル中、頭部から尾まで一列に並べた。

【0109】

オス S p r a g u e D a w l e y ラット (体重 3 5 0 ~ 4 0 0 g) を、アトロピン (0 . 5 m g / k g) を皮下投与するために手術により準備し、次に 5 % イソフルランで麻酔し、続いて 2 % の維持量を投与した。体温を 3 7 ~ 3 8 に維持した。無菌状態で、頸部に矢状正中線切開を行い、右総頸動脈 (C C A) 、右内頸動脈 (I C A) 、右外頸動脈 (E C A) 、および翼突口蓋動脈を露出させた。翼突口蓋動脈を縛って血行を止めた。一定長さの E C A を切り離し、次に縛って血行を止め、切断した。 C C A および I C A をクランプで締め、血栓を含む P E 5 0 カテーテルを E C A スタンプ中に挿入し、分岐点まで前進させた。 I C A クランプをはずし、血栓をゆっくりと I C A 中に注入し、同時に C C A の留め金をゆるめた。ビヒクル (塩溶液) 、 S B 2 4 9 4 1 7 (2 . 0 m g / k g) のいずれかおよび / または t - P A (5 . 0 m g / k g) の注入を、尾静脈を通して静脈内により塞栓形成後 5 分で開始した。 S B 2 4 9 4 1 7 を 1 回ボーラス投与として注入し、一方、 5 m g / k g の t - P A を 1 0 % ボーラスとして注入し、続いて残りの 9 0 % を 3 0 分かけて注入した。手術による切開を縫合し、ラットを回復させた。

【0110】

塞栓形成後 2 4 時間に、ラットを麻酔し、屠殺した。脳を取り出し、前頭極から 2 m m ごとに 7 の脳横断片を採取した。断片を 1 % 2 , 3 , 5 - トリフェニルテトラゾリウムクロリド中 2 0 分間インキュベートし、続いてホルマリン固定した。染色した脳断片を写真撮影し、画像分析システム (O p t i m u s I n c . , B o t h e l l , W a s h) を用いて分析した。知らされていないオペレーターにより梗塞をコンピュータースクリーン上にトレースすることにより、梗塞の面積 (m m ²) を計算した。各処置についての凝集平均梗塞を図 1 5 に示す (対照 (n = 2 0) 、 t P A (n = 7) および S B 2 4 9 4 1 7 (n = 6)) 。塞栓後のラットに t P A (5 . 0 m g / k g) を投与することにより、結果として得られる平均梗塞体積において約 3 3 % の減少が起こった。 S B 2 4 9 4 1 7 単独の投与により、結果として得られる梗塞体積において約 7 0 % の減少が起こった。 t P A (5 . 0 m g / k g) と S B 2 4 9 4 1 7 (2 . 0 m g / k g) の組み合わせはさらに防御を提供し、結果として、平均梗塞体積が約 8 8 % 減少した (P = 0 . 1 2 6) 。このモデルにおける梗塞は、線条体および新皮質において類似した頻度で起こった。梗塞組織の位置に基づくと、最も頻度の高い閉塞部位は中脳動脈 (M C A) であるようである。頻度は高くないが、脈絡膜、前および後大脳動脈も時折閉塞したことが示された。冠状断片 (省略) により見られるように、治療により起こる梗塞体積の減少のほとんどは中心 M C A 再灌流領分内であった。梗塞組織の分布は、治療後に認知できるほど変化しなかった。

【0111】

結果から、抗 - I X 因子抗体、例えば、 S B 2 4 9 4 1 7 は、塞栓後に投与された場合に

10

20

30

40

50

、単独療法またはtPAなどの血栓溶解剤の補助剤として使用した場合に、梗塞脳組織の形成を減少させることができることがわかる。抗-IgX因子抗体、例えばSB249417は血栓塞栓性発作の治療において、単独または血栓溶解剤の補助剤として臨床的有用性を有することが期待される。併用療法により、血栓溶解剤の量を減少させることができ、その後の出血性発作を促進する危険性が減少する。

【0112】

本発明はその精神または本質的性質を逸脱することなく他の特別な形態において具体化することができ、従って、前記の明細書ではなく、添付のクレームが本発明の範囲を示すので、これを参照するべきである。

【図面の簡単な説明】

10

【図1】正常なヒト血漿をネズミ抗-IgX因子mAb BC1およびBC2で滴定した実験結果をグラフで示す。

【図2】正常なヒト血漿をネズミ抗-IgX因子mAb 9E4(2)F4および11G4(1)B9で滴定した実験結果をグラフで示す。

【図3】正常なヒト血漿をネズミ抗-X因子mAb HF-XHCおよびHF-XLCならびにネズミ抗XI因子mAb HF-XIで滴定した実験結果をグラフで示す。

【図4】ラット頸動脈血栓症モデルにおける60分でのヘパリン、アセチルサリチル酸およびネズミIX因子mabの活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)に対する効果についての実験結果を柱状グラフで示す。

20

【図5】ラット頸動脈血栓症モデルにおける60分でのヘパリン、アセチルサリチル酸およびネズミIX因子mabのプロトロンビン時間に対する効果についての実験結果を柱状グラフで示す。

【図6】ラット頸動脈血栓症モデルにおける、頸動脈流の閉塞に対するヘパリン、アセチルサリチル酸およびネズミIX因子mabの効果についての実験結果を柱状グラフで示す。

【図7】ラット頸動脈血栓症モデルにおける血栓重量に対するヘパリン、アセチルサリチル酸およびネズミIX因子mabの効果についての実験結果を柱状グラフで示す。

【図8】ラット頸動脈血栓症モデルにおける60分でのヘパリン、ネズミIX因子mab BC2、キメラIX因子mabおよびヒト化IX因子mAbのaPTTに対する効果についての実験結果を柱状グラフで示す。

30

【図9】ラット頸動脈血栓症モデルにおけるヘパリン、ネズミIX因子mab BC2、キメラIX因子mabおよびヒト化IX因子mAbの血栓重量に対する効果についての実験結果を柱状グラフで示す。

【図10】抗-IgX因子mabおよびヘパリンのtPAにより媒介される再灌流に対する影響についての実験結果を柱状グラフで示す。

【図11】抗-IgX因子mabおよびヘパリンの頸動脈血管開通性に対する影響についての実験結果を柱状グラフで示す。

【図12】抗-IgX因子mabおよびヘパリンの血流の回復に対する影響についての実験結果を柱状グラフで示す。

【図13】止血パラメータ、フィブリノーゲン、プラスミノーゲンおよび抗プラスミンに対するtPAの影響を示す。

40

【図14】tPA、ヘパリンおよび抗-IgX因子mabのaPTTに対する影響を示す。

【図15】tPA、SB249417、およびtPAとSB249417の組み合わせの、血栓塞栓性卒中における集合平均梗塞体積に対する影響を示す。

【図1】

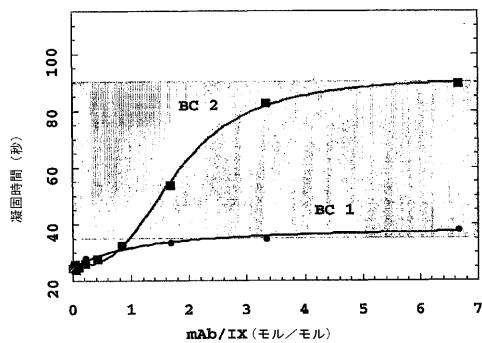


FIGURE 1

【図2】

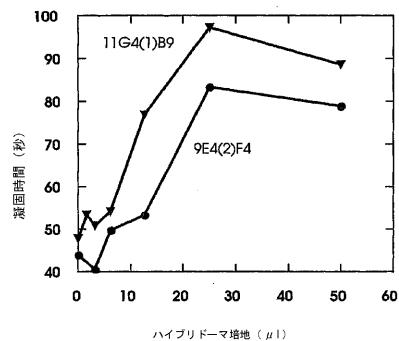


FIGURE 2

【図5】

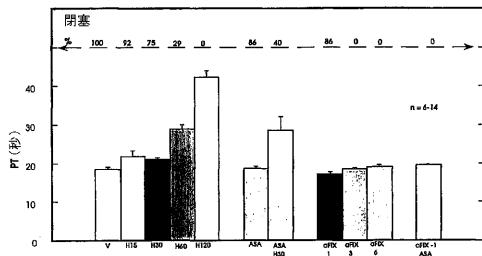


FIGURE 5

【図6】

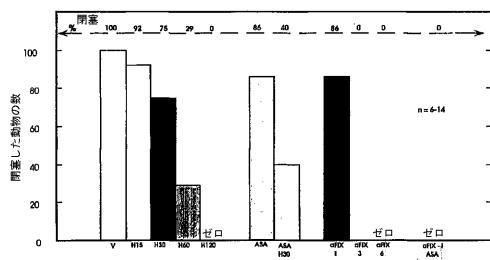


FIGURE 6

【図3】

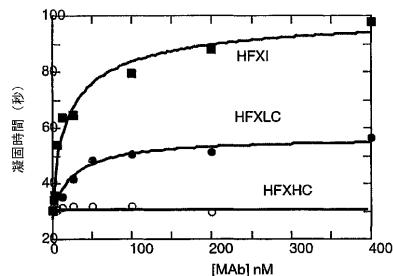


FIGURE 3

【図4】

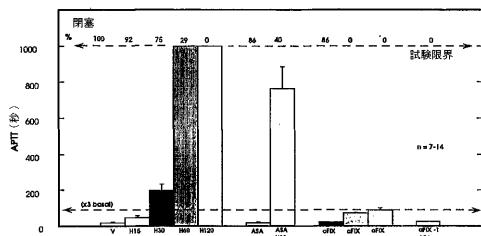


FIGURE 4

【図7】

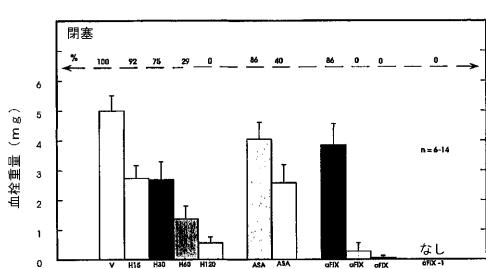


FIGURE 7

【図8】

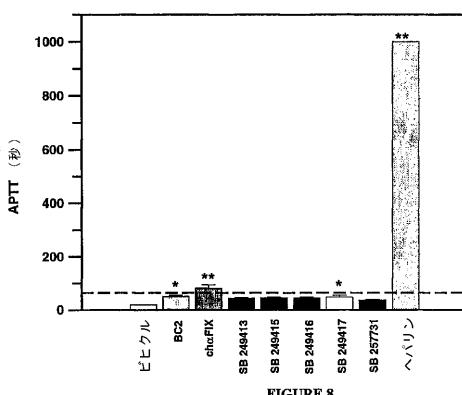


FIGURE 8

【図 9】

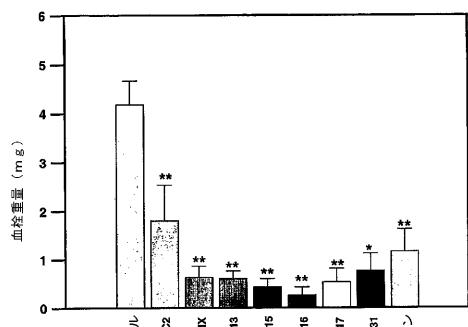


FIGURE 9

【図 10】

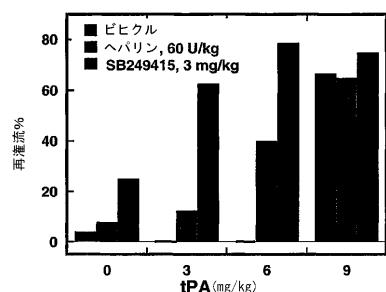


FIGURE 10

【図 11】

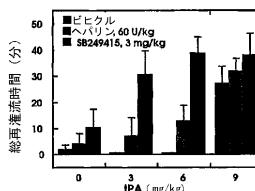


FIGURE 11

【図 12】

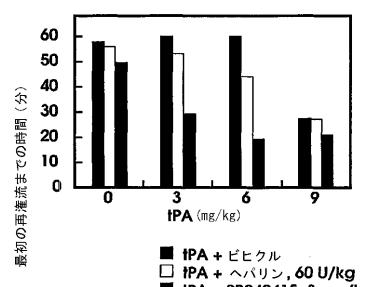


FIGURE 12

【図 13】

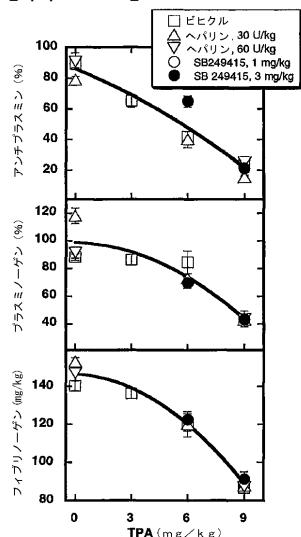
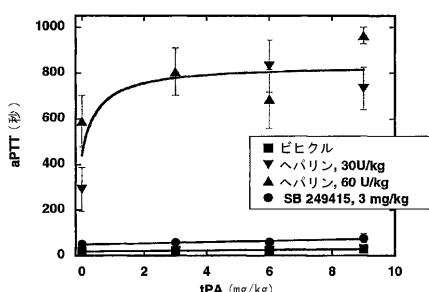
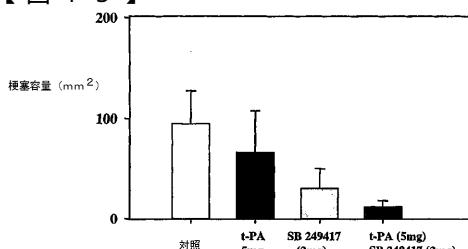


FIGURE 13

【図 14】



【図 15】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
22 November 2001 (22.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/87339 A1

(51) International Patent Classification: A61K 39/40, 19096 (US). TOOMEY, John, R. [US/US], 3022 Still Meadow Drive, Collegeville, PA 19426 (US).

(21) International Application Number: PCT/US00/27438 (74) Agents: BAUMEISTER, Kirk et al.; SmithKline Beecham Corporation, Corporate Intellectual Property, UW2220, 709 Swedeland Road, P.O. Box 1539, King of Prussia, PA 19406-0939 (US).

(22) International Filing Date: 5 October 2000 (05.10.2000)

(25) Filing Language: English (81) Designated States (national): AE, AL, AU, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CN, CZ, DZ, EE, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

(26) Publication Language: English (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Priority Data: 09/571,434 15 May 2000 (15.05.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION [US/US]; One Franklin Plaza, Philadelphia, PA 19103 (US).

(72) Inventors: and (73) Inventors/Applicants (for US only): BARONE, Frank, C. [US/US]; 2861 Engleville Road, Andohon, PA 19403 (US). BLACKBURN, Michael, N. [US/US]; 803 Camp Circle, Phoenixville, PA 19460 (US). FEUERSTEIN, Giora, Z. [US/US]; 405 Ballytore Road, Wynnewood, PA

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/87339 A1

(54) Title: ANTI-THROMBOTIC AGENTS

(57) Abstract: Monoclonal antibodies as antithrombotic agents.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

ANTITHROMBOTIC AGENTS**FIELD OF THE INVENTION**

This invention relates to monoclonal antibodies
5 (mAbs) that bind to a human coagulation factor or
cofactor and their use as inhibitors of thrombosis.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Under normal circumstances, an injury, be it minor
10 or major, to vascular endothelial cells lining a blood
vessel triggers a hemostatic response through a sequence
of events commonly referred to as the coagulation
"cascade." The cascade culminates in the conversion of
soluble fibrinogen to insoluble fibrin which, together
15 with platelets, forms a localized clot or thrombus which
prevents extravasation of blood components. Wound
healing can then occur followed by clot dissolution and
restoration of blood vessel integrity and flow.

The events which occur between injury and clot
20 formation are a carefully regulated and linked series of
reactions. In brief, a number of plasma coagulation
proteins in inactive proenzyme forms and cofactors
circulate in the blood. Active enzyme complexes are
25 assembled at an injury site and are sequentially
activated to serine proteases, with each successive
serine protease catalyzing the subsequent proenzyme to
protease activation. This enzymatic cascade results in
each step magnifying the effect of the succeeding step.
For an overview of the coagulation cascade see the first
30 chapter of "Thrombosis and Hemorrhage", J. Loscalzo and
A. Schafer, eds., Blackwell Scientific Publications,
Oxford, England (1994).

While efficient clotting limits the loss of blood
at an injury site, inappropriate formation of thrombi in
35 veins or arteries is a common cause of disability and
death. Abnormal clotting activity can result in and/or

WO 01/87339

PCT/US00/27438

from pathologies or treatments such as myocardial infarction, unstable angina, atrial fibrillation, stroke, renal damage, percutaneous transluminal coronary angioplasty, disseminated intravascular coagulation, 5 sepsis, pulmonary embolism and deep vein thrombosis. The formation of clots on foreign surfaces of artificial organs, shunts and prostheses such as artificial heart valves is also problematic.

Stroke is a leading cause of death and a common 10 cause of permanent disability. The acute focal cerebral ischemia resulting in the neurological deficits of stroke are most frequently caused by thromboembolism. Thrombi can be generated from cardiac sources and atheromas. *In situ* thrombosis can occur in the large, 15 extracerebral brain-supplying vessels. Studies suggest a finite time interval after cerebral arterial occlusion beyond which significant irreversible neuronal damage and sustained neurological deficit occurs. See Chapter 14 of *Stroke Therapy: Basic, Preclinical, and Clinical 20 Directions*, pp. 355-381, ed. L.P. Miller, Wiley-Liss, Inc. (1999).

Approved anticoagulant agents currently used in treatment of these pathologies and other thrombotic and embolic disorders include the sulfated 25 heteropolysaccharides heparin and low molecular weight (LMW) heparin. These agents are administered parenterally and can cause rapid and complete inhibition of clotting by activation of the thrombin inhibitor, antithrombin III and inactivation of all of the clotting 30 factors.

However, due to their potency, heparin and LMW heparin suffer drawbacks. Uncontrolled bleeding as a 35 result of the simple stresses of motion and accompanying contacts with physical objects or at surgical sites is the major complication and is observed in 1 to 7% of patients receiving continuous infusion and in 8 to 14%

WO 01/87339

PCT/US00/27438

of patients given intermittent bolus doses. To minimize this risk, samples are continuously drawn to enable *ex vivo* clotting times to be continuously monitored, which contributes substantially to the cost of therapy and the 5 patient's inconvenience.

Further, the therapeutic target range to achieve the desired level of efficacy without placing the patient at risk for bleeding is narrow. The therapeutic range is approximately 1 to less than 3 ug heparin/ml 10 plasma which results in activated partial thromboplastin time (aPTT) assay times of about 35 to about 100 seconds. Increasing the heparin concentration to 3 ug/ml exceeds the target range and at concentrations greater than 4 ug/ml, clotting activity is not 15 detectable. Thus, great care must be taken to keep the patient's plasma concentrations within the therapeutic range.

Another approved anticoagulant with slower and longer lasting effect is warfarin, a coumarin 20 derivative. Warfarin acts by competing with Vitamin K dependent post-translational modification of prothrombin and other Vitamin K-dependent clotting factors.

The general pattern of anticoagulant action, in 25 which blood is rendered non-clottable at concentrations only slightly higher than the therapeutic range is seen for warfarin as well as for heparin and LMW heparin.

In acute myocardial infarction (MI), the major 30 objectives of thrombolytic therapy include early and sustained reperfusion of the infarcted vessel. Present therapy for acute MI includes both a plasminogen activator, such as tissue plasminogen activator (tPA) or streptokinase and an anticoagulant such as unfractionated heparin, low molecular weight heparin or direct thrombin inhibitors or antiplatelet agents such 35 as aspirin or platelet glycoprotein IIb/IIIa blocker. See Topol, *Am Heart J*, 136, S66-S68 (1998). This

WO 01/87339

PCT/US00/27438

combination of therapies is based on the observation that clot formation and dissolution are dynamic processes and thrombin activity and generation continue after the formation of the occlusive thrombus and during 5 and after dissolution of the clot. See Granger *et al.*, *J Am Coll Cardiol*, 31, 497-505 (1998).

The optimal strategy for treatment of acute MI remains elusive and available agents and treatment protocols display both negative and positive 10 characteristics. For example, fibrin-bound thrombin is insensitive to inhibition by heparin (Becker *et al.* in Chapter 6 of "Chemistry and Biology of Serpins", Plenum Press, New York (1997)) and thrombin activity exhibits a rebound increase following cessation of heparin therapy 15 with an observed increase in reinfarction within 24 hours following discontinuation of heparin. See Watkins *et al.*, *Catheterization and Cardiovascular Diagnosis*, 44, 257-264 (1998) and Granger, *Circulation*, 91, 1929-1935 (1995). Further, antiplatelet agents may be 20 accompanied by bleeding or thrombocytopenia.

Also, numerous clinical trials have shown that high doses of thrombolytic agents lead to significant alteration in plasma hemostatic markers. See Rao *et al.*, *J Clin Invest*, 101, 10-14 (1988); Bovill *et al.*, 25 *Ann Int Med*, 115, 256-265 (1991); Neuhaus *et al.*, *J Am Coll Cardiol*, 19, 885-891 (1992). Although increasing concentrations of tPA lead to enhanced clot dissolution, the alteration in these hemostatic markers mirrors increased liabilities of thrombolytic therapy, 30 particularly the incidence of severe bleeding.

In the case of thromboembolic stroke, thrombolytic therapy is employed early (within 3 hours) following the onset of stroke symptoms to prevent irreversible damage. Thrombolytic agents currently approved for reperfusion 35 of ischemic and/or infarcted tissue include the plasminogen activators tPA, urokinase and streptokinase.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

However, thrombolytic therapy is associated with a serious bleeding liability and a major concern of thrombolytic therapy in thromboembolic stroke is that the treatment will exacerbate the ischemic injury by 5 inducing hemorrhage.

Clearly, a need exists for antithrombotic agents efficacious in controlling thrombotic disorders while maintaining hemostatic functions.

SUMMARY OF THE INVENTION

10 An aspect of the invention is a method for treating an animal post-thromboembolic induced ischemia comprising administering an anti-Factor IX antibody or antibody fragment.

15 Another aspect of the invention is a method for treating an animal post-thromboembolic induced ischemia comprising administering an anti-Factor IX antibody or antibody fragment in combination with a plasminogen activator.

20 Another aspect of the invention is a method of reducing a required dose of a thrombolytic agent in treatment of an animal post-thromboembolic induced ischemia comprising administering an anti-Factor IX antibody or antibody fragment in combination with the thrombolytic agent.

25 Yet another aspect of this invention is a method for preventing thromboembolic stroke in an animal comprising administering an anti-Factor IX antibody or antibody fragment to an animal at risk for thromboembolic stroke.

30

WO 01/87339

PCT/US00/27438

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a graph of experimental results demonstrating the titration of normal human plasma with the murine anti-Factor IX mAbs BC1 and BC2.

5 Figure 2 is a graph of experimental results demonstrating the titration of normal human plasma with the murine anti-Factor IX mAbs 9E4(2)F4 and 11G4(1)B9.

10 Figure 3 is a graph of experimental results demonstrating the titration of normal human plasma with the murine anti-Factor X mAbs HFXHC and HFXLC and the murine anti-Factor XI mAb HFXI.

15 Figure 4 is a histogram of experimental results demonstrating the effect of heparin, acetylsalicylic acid and murine Factor IX mabs on activated partial thromboplastin time (aPTT) at 60 minutes in a rat carotid thrombosis model.

20 Figure 5 is a histogram of experimental results demonstrating the effect of heparin, acetylsalicylic acid and murine Factor IX mabs on prothrombin time at 60 minutes in a rat carotid thrombosis model.

25 Figure 6 is a histogram of experimental results demonstrating the effect of heparin, acetylsalicylic acid and murine Factor IX mabs on occlusion of carotid artery flow in a rat carotid thrombosis model.

Figure 7 is a histogram of experimental results demonstrating the effect of heparin, acetylsalicylic acid and murine Factor IX mabs on thrombus weight in a rat carotid thrombosis model.

30 Figure 8 is a histogram of experimental results demonstrating the effect of heparin, the murine Factor IX mab BC2, a chimeric Factor IX mab and humanized factor IX mAbs on aPTT at 60 minutes in a rat carotid thrombosis model.

35 Figure 9 is a histogram of experimental results demonstrating the effect of heparin, the murine Factor IX mab BC2, a chimeric Factor IX mab and humanized

WO 01/87339

PCT/US00/27438

factor IX mAbs on thrombus weight in a rat carotid thrombosis model.

Figure 10 is a histogram of experimental results demonstrating the effect of anti-Factor IX mab and heparin on tPA-mediated reperfusion.

Figure 11 is a histogram of experimental results demonstrating the effect of anti-Factor IX mab and heparin on carotid vessel patency.

Figure 12 is a histogram of experimental results demonstrating the effect of anti-Factor IX mab and heparin on time to restoration of blood flow.

Figure 13 demonstrates the effect of tPA on the hemostatic parameters, fibrinogen, plasminogen and antiplasmin.

Figure 14 demonstrates the effect of tPA, heparin and anti-Factor IX mab on aPTT.

Figure 15 demonstrates the effect of tPA, SB 249417, and the combination of tPA and SB 249417 on aggregate mean infarct volume in thromboembolic stroke.

20

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

All publications, including but not limited to patents and patent applications, cited in the specification are herein incorporated by reference as though fully set forth.

The present invention provides a variety of antibodies, altered antibodies and fragments thereof directed against coagulation factors, which are characterized by self-limiting neutralizing activity.

30 Preferably, the coagulation factor is from the intrinsic or common coagulation pathway. Most preferably, the anti-coagulation factor antibodies are anti-Factor IX, anti-Factor IXa, anti-Factor X, anti-Factor Xa, anti-Factor XI, anti-Factor XIa, anti-Factor VIII, anti-Factor VIIIa, anti-Factor V, anti-Factor Va, anti-Factor VII, anti-Factor VIIa, anti-thrombin or anti-

WO 01/87339

PCT/US00/27438

prothrombin. Particularly preferred are anti-Factor IX antibodies. Exemplary anti-coagulation factor antibodies are the humanized monoclonal antibodies SB 249413, SB 249415, SB 249416, SB 249417, SB 257731 and 5 SB 257732 directed against human Factor IX, the chimeric monoclonal antibody chαFIX directed against human Factor IX, the murine monoclonal antibodies BC1, BC2, 9E4(2)F4 and 11G4(1)E9 which are directed against human Factor IX and/or Factor IXa or the murine monoclonal antibodies 10 HFXLc and HFXI which are directed against human Factors X and XI, respectively. Particularly preferred is the anti-human Factor IX monoclonal antibody SB 249417.

The antibodies of the present invention can be prepared by conventional hybridoma techniques, phage 15 display combinatorial libraries, immunoglobulin chain shuffling and humanization techniques to generate novel self-limiting neutralizing antibodies. Also included are fully human mAbs having self-limiting neutralizing activity. These products are useful in therapeutic and 20 pharmaceutical compositions for thrombotic and embolic disorders associated with myocardial infarction, unstable angina, atrial fibrillation, stroke, renal damage, pulmonary embolism, deep vein thrombosis, percutaneous transluminal coronary angioplasty, 25 disseminated intravascular coagulation, sepsis, artificial organs, shunts or prostheses.

As used herein, the term "self-limiting 30 neutralizing activity" refers to the activity of an antibody that binds to a human coagulation factor, preferably from the intrinsic and common pathways, including Factor IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIa and V/Va, VII/VIIa and thrombin/prothrombin and inhibits thrombosis in a manner such that limited modulation of coagulation is produced. "Limited modulation of 35 coagulation" is defined as an increase in clotting time, as measured by prolongation of the activated partial

WO 01/87339

PCT/US00/27438

thromboplastin time (aPTT), where plasma remains clottable with aPTT reaching a maximal value despite increasing concentrations of monoclonal antibody. This limited modulation of coagulation is in contrast to 5 plasma being rendered unclottable and exhibiting an infinite aPTT in the presence of increasing concentrations of heparin. Preferably, the maximal aPTT value of the methods of the invention are within the heparin therapeutic range. Most preferably, maximal 10 aPTT is within the range of about 35 seconds to about 100 seconds which corresponds to about 1.5 times to about 3.5 times the normal control aPTT value. In one embodiment of the invention, aPTT is prolonged without significant prolongation of prothrombin time (PT).

15 The phrase "in combination with" refers to administration of one therapeutic agent before, after or concurrent with the administration of another therapeutic agent in a single course of treatment.

"Altered antibody" refers to a protein encoded by 20 an altered immunoglobulin coding region, which may be obtained by expression in a selected host cell. Such altered antibodies are engineered antibodies (e.g., chimeric or humanized antibodies) or antibody fragments lacking all or part of an immunoglobulin constant 25 region, e.g., Fv, Fab, Fab' or F(ab')₂ and the like.

"Altered immunoglobulin coding region" refers to a 30 nucleic acid sequence encoding an altered antibody of the invention. When the altered antibody is a CDR-grafted or humanized antibody, the sequences that encode the complementarity determining regions (CDRs) from a non-human immunoglobulin are inserted into a first immunoglobulin partner comprising human variable 35 framework sequences. Optionally, the first immunoglobulin partner is operatively linked to a second immunoglobulin partner.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

"First immunoglobulin partner" refers to a nucleic acid sequence encoding a human framework or human immunoglobulin variable region in which the native (or naturally-occurring) CDR-encoding regions are replaced 5 by the CDR-encoding regions of a donor antibody. The human variable region can be an immunoglobulin heavy chain, a light chain (or both chains), an analog or functional fragments thereof. Such CDR regions, located within the variable region of antibodies 10 (immunoglobulins) can be determined by known methods in the art. For example Kabat et al. in "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987) disclose rules for locating 15 CDRs. In addition, computer programs are known which are useful for identifying CDR regions/structures.

"Second immunoglobulin partner" refers to another nucleotide sequence encoding a protein or peptide to which the first immunoglobulin partner is fused in frame 20 or by means of an optional conventional linker sequence (i.e., operatively linked). Preferably, it is an immunoglobulin gene. The second immunoglobulin partner may include a nucleic acid sequence encoding the entire constant region for the same (i.e., homologous, where 25 the first and second altered antibodies are derived from the same source) or an additional (i.e., heterologous) antibody of interest. It may be an immunoglobulin heavy chain or light chain (or both chains as part of a single polypeptide). The second immunoglobulin partner is not 30 limited to a particular immunoglobulin class or isotype. In addition, the second immunoglobulin partner may comprise part of an immunoglobulin constant region, such as found in a Fab, or F(ab)₂ (i.e., a discrete part of an appropriate human constant region or framework 35 region). Such second immunoglobulin partner may also comprise a sequence encoding an integral membrane

WO 01/87339

PCT/US00/27438

protein exposed on the outer surface of a host cell, e.g., as part of a phage display library, or a sequence encoding a protein for analytical or diagnostic detection, e.g., horseradish peroxidase, β -galactosidase, etc.

5 The terms Fv, Fc, Fd, Fab, Fab' or F(ab')₂ are used with their standard meanings. See, e.g., Harlow *et al.* in "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, (1988).

10 As used herein, an "engineered antibody" describes a type of altered antibody, *i.e.*, a full-length synthetic antibody (e.g., a chimeric or humanized antibody as opposed to an antibody fragment) in which a portion of the light and/or heavy chain variable domains 15 of a selected acceptor antibody are replaced by analogous parts from one or more donor antibodies which have specificity for the selected epitope. For example, such molecules may include antibodies characterized by a humanized heavy chain associated with an unmodified 20 light chain (or chimeric light chain), or vice versa. Engineered antibodies may also be characterized by alteration of the nucleic acid sequences encoding the acceptor antibody light and/or heavy variable domain framework regions in order to retain donor antibody 25 binding specificity. These antibodies can comprise replacement of one or more CDRs (preferably all) from the acceptor antibody with CDRs from a donor antibody described herein.

30 A "chimeric antibody" refers to a type of engineered antibody which contains a naturally-occurring variable region (light chain and heavy chains) derived from a donor antibody in association with light and heavy chain constant regions derived from an acceptor antibody.

35 A "humanized antibody" refers to a type of engineered antibody having its CDRs derived from a non-

WO 01/87339

PCT/US00/27438

human donor immunoglobulin, the remaining immunoglobulin-derived parts of the molecule being derived from one or more human immunoglobulins. In addition, framework support residues may be altered to 5 preserve binding affinity. See, e.g., Queen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 10029-10032 (1989), Hodgson *et al.*, *Bio/Technology*, 9, 421 (1991).

The term "donor antibody" refers to a monoclonal or recombinant antibody which contributes the nucleic acid 10 sequences of its variable regions, CDRs or other functional fragments or analogs thereof to a first immunoglobulin partner, so as to provide the altered immunoglobulin coding region and resulting expressed altered antibody with the antigenic specificity and 15 neutralizing activity characteristic of the donor antibody. One donor antibody suitable for use in this invention is a murine self-limiting neutralizing monoclonal antibody designated as BC2. Other suitable donor antibodies include the murine self-limiting 20 neutralizing monoclonal antibodies designated as BC1, 9E4(2)F4, 11G4(1)B9, HFXLC and HFXI.

The term "acceptor antibody" refers to monoclonal or recombinant antibodies heterologous to the donor antibody, which contributes all, or a portion, of the 25 nucleic acid sequences encoding its heavy and/or light chain framework regions and/or its heavy and/or light chain constant regions to the first immunoglobulin partner. Preferably, a human antibody is the acceptor antibody.

30 "CDRs" are defined as the complementarity determining region amino acid sequences of an antibody which are the hypervariable regions of immunoglobulin heavy and light chains. See, e.g., Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 4th 35 Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). There are three

WO 01/87339

PCT/US00/27438

heavy chain and three light chain CDRs or CDR regions in the variable portion of an immunoglobulin. Thus, "CDRs" as used herein refers to all three heavy chain CDRs, or all three light chain CDRs or both all heavy and all 5 light chain CDRs, if appropriate.

CDRs provide the majority of contact residues for the binding of the antibody to the antigen or epitope. CDRs of interest in this invention are derived from donor antibody variable heavy and light chain sequences, 10 and include analogs of the naturally occurring CDRs, which analogs also share or retain the same antigen binding specificity and/or neutralizing ability as the donor antibody from which they were derived.

By "sharing the antigen binding specificity or 15 neutralizing ability" is meant, for example, that although mAb BC2 may be characterized by a certain level of self-limiting neutralizing activity, a CDR encoded by a nucleic acid sequence of BC2 in an appropriate structural environment may have a lower, or higher 20 activity. It is expected that CDRs of BC2 in such environments will nevertheless recognize the same epitope(s) as BC2.

A "functional fragment" is a partial heavy or light 25 chain variable sequence (e.g., minor deletions at the amino or carboxy terminus of the immunoglobulin variable region) which retains the same antigen binding specificity and/or neutralizing ability as the antibody from which the fragment was derived.

An "analog" is an amino acid sequence modified by 30 at least one amino acid, wherein said modification can be chemical or a substitution or a rearrangement of a few amino acids (i.e., no more than 10), which modification permits the amino acid sequence to retain the biological characteristics, e.g., antigen 35 specificity and high affinity, of the unmodified sequence. Exemplary analogs include silent mutations

WO 01/87339

PCT/US00/27438

which can be constructed, via substitutions, to create certain endonuclease restriction sites within or surrounding CDR-encoding regions.

Analogs may also arise as allelic variations. An 5 "allelic variation or modification" is an alteration in the nucleic acid sequence encoding the amino acid or peptide sequences of the invention. Such variations or modifications may be due to degeneracy in the genetic code or may be deliberately engineered to provide 10 desired characteristics. These variations or modifications may or may not result in alterations in any encoded amino acid sequence.

The term "effector agents" refers to non-protein carrier molecules to which the altered antibodies, 15 and/or natural or synthetic light or heavy chains of the donor antibody or other fragments of the donor antibody may be associated by conventional means. Such non- protein carriers can include conventional carriers used 20 in the diagnostic field, e.g., polystyrene or other plastic beads, polysaccharides, e.g., as used in the BIAcore (Pharmacia) system, or other non-protein substances useful in the medical field and safe for administration to humans and animals. Other effector 25 agents may include a macrocycle, for chelating a heavy metal atom or radioisotopes. Such effector agents may also be useful to increase the half-life of the altered antibodies, e.g., polyethylene glycol.

For use in constructing the antibodies, altered 30 antibodies and fragments of this invention, a non-human species such as bovine, ovine, monkey, chicken, rodent (e.g., murine and rat) may be employed to generate a desirable immunoglobulin upon presentation with a human coagulation factor, preferably factor IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIIa, V/Va, VII/VIIa or 35 thrombin/prothrombin or a peptide epitope therefrom. Conventional hybridoma techniques are employed to

WO 01/87339

PCT/US00/27438

provide a hybridoma cell line secreting a non-human mAb to the respective coagulation factor. Such hybridomas are then screened for binding using Factor IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIIa, V/Va, VII/VIIa or
5 thrombin/prothrombin coated to 96-well plates, as described in the Examples section, or alternatively with biotinylated Factor IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIIa, V/Va, VII/VIIa or thrombin/prothrombin bound to a streptavidin-coated plate. Alternatively, fully human
10 mAbs can be generated by techniques known to those skilled in the art and used in this invention.

One exemplary, self-limiting neutralizing mAb of this invention is mAb BC2, a murine antibody which can be used for the development of a chimeric or humanized molecule. The BC2 mAb is characterized by a self-limiting inhibitory activity on clotting time. As measured by the aPTT assay, the effect of the BC2 mAb on clot time exhibits a maximal value of about 100 seconds. The BC2 mAb also binds Factor IXa, inhibits Factor IX to
20 IXa conversion and inhibits Factor IXa activity. Divalent metal cofactors are required for activity, with the mAb exhibiting a greater preference for Ca^{2+} over Mn^{2+} . The observed IC_{50} in the aPTT assay is approximately 50 nM. The BC2 mAb exhibits a species
25 cross-reactivity with rat and is of isotype IgG2a.

Other desirable donor antibodies are the murine mAbs, BC1, 9E4(2)F4 and 11G4(1)B9. These mAbs are characterized by a self-limiting inhibitory activity on clotting time. As measured by the aPTT assay, the
30 effect of these mAbs on clot time exhibits a maximal value of about 90 to 100 seconds for 9E4(2)F4 and about 80 seconds for 11G4(1)B9. The BC1 mAb also binds Factor IXa, inhibits Factor IXa activity but does not inhibit Factor IX to IXa conversion. A metal cofactor is not
35 required for its activity. The observed IC_{50} for BC1 in

WO 01/87339

PCT/US00/27438

the aPTT assay is approximately 35 nM. The BC1 mAb is of isotype IgG1.

Yet another desirable donor antibody characterized by a self-limiting inhibitory activity on clotting time 5 is the murine mAb HFXLC. As measured by the aPTT assay, the effect of the HFXLC mAb on clot time exhibits a maximal value of about 50 to 60 seconds. The HFXLC mAb binds Factor X light chain, and inhibits Factor X/Xa activity. The observed IC₅₀ in the aPTT assay is 10 approximately 20 nM.

Yet another desirable donor antibody characterized by a self-limiting inhibitory activity on clotting time 15 is the murine mAb, HFXI. As measured by the aPTT assay, the effect of the HFXI mAb on clot time exhibits a maximal value of about 100 seconds. The HFXLC mAb binds Factor XI and inhibits Factor XI/XIa activity. The 20 observed IC₅₀ in the aPTT assay is approximately 30 nM.

While not intending to be bound to any particular theory regarding the mechanism of action, these mAbs 25 appear to regulate coagulation by a non-competitive or allosteric mechanism whereby only partial inhibition is achieved.

This invention is not limited to the use of the BC1, BC2, 9E4(2)F4, 11G4(1)B9, HFXLC, HFXI or their 30 hypervariable (i.e., CDR) sequences. Any other appropriate high-affinity antibodies characterized by a self-limiting neutralizing activity and corresponding CDRs may be substituted therefor. Identification of the donor antibody in the following description as BC1, BC2, 35 9E4(2)F4, 11G4(1)B9, HFXLC or HFXI is made for illustration and simplicity of description only.

The present invention also includes the use of Fab fragments or F(ab')₂ fragments derived from mAbs directed against the appropriate human coagulation 35 factor or cofactor. These fragments are useful as agents having self-limiting neutralizing activity

WO 01/87339

PCT/US00/27438

against coagulation factors, preferably against Factor IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIIa, V/Va, VII/VIIa or thrombin/prothrombin. A Fab fragment contains the entire light chain and amino terminal portion of the 5 heavy chain. An F(ab')₂ fragment is the fragment formed by two Fab fragments bound by disulfide bonds. The mAbs BC1, BC2, 9E4(2)F4, 11G4(1)B9, HFXLC and HFXI and other similar high affinity antibodies, provide sources of Fab fragments and F(ab')₂ fragments which can be obtained by 10 conventional means, e.g., cleavage of the mAb with the appropriate proteolytic enzymes, papain and/or pepsin, or by recombinant methods. These Fab and F(ab')₂ fragments are useful themselves as therapeutic, 15 prophylactic or diagnostic agents, and as donors of sequences including the variable regions and CDR sequences useful in the formation of recombinant or humanized antibodies as described herein.

The Fab and F(ab')₂ fragments can be constructed via a combinatorial phage library (see, e.g., Winter et 20 al., *Ann Rev Immunol*, 12, 433-455 (1994)) or via immunoglobulin chain shuffling (see, e.g., Marks et al., 25 *Bio/Technology*, 10, 779-783 (1992), which are both hereby incorporated by reference in their entirety, wherein the Fd or v_H immunoglobulin from a selected antibody (e.g., BC2) is allowed to associate with a repertoire of light chain immunoglobulins, v_L (or v_K), to form novel Fabs. Conversely, the light chain immunoglobulin from a selected antibody may be allowed 30 to associate with a repertoire of heavy chain immunoglobulins, v_H (or Fd), to form novel Fabs. Self-limiting neutralizing Factor IX Fabs can be obtained by allowing the Fd of mAb BC2 to associate with a repertoire of light chain immunoglobulins. Hence, one is able to recover neutralizing Fabs with unique 35 sequences (nucleotide and amino acid) from the chain shuffling technique.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

The mAb BC2 or other antibodies described above may contribute sequences, such as variable heavy and/or light chain peptide sequences, framework sequences, CDR sequences, functional fragments, and analogs thereof, 5 and the nucleic acid sequences encoding them, useful in designing and obtaining various altered antibodies which are characterized by the antigen binding specificity of the donor antibody.

The nucleic acid sequences of this invention, or 10 fragments thereof, encoding the variable light chain and heavy chain peptide sequences are also useful for mutagenic introduction of specific changes within the nucleic acid sequences encoding the CDRs or framework regions, and for incorporation of the resulting modified 15 or fusion nucleic acid sequence into a plasmid for expression. For example, silent substitutions in the nucleotide sequence of the framework and CDR-encoding regions can be used to create restriction enzyme sites which facilitate insertion of mutagenized CDR and/or 20 framework regions. These CDR-encoding regions can be used in the construction of the humanized antibodies of the invention.

The nucleic and amino acid sequences of the BC2 25 heavy chain variable region are listed in SEQ ID NOS: 5 and 7. The CDR sequences from this region are listed in SEQ ID NOS: 8, 9 and 10.

The nucleic and amino acid sequences of the BC2 30 light chain variable region are listed in SEQ ID NOS: 6 and 11. The CDR sequences from this region are listed in SEQ ID NOS: 12, 13 and 14.

Taking into account the degeneracy of the genetic 35 code, various coding sequences may be constructed which encode the variable heavy and light chain amino acid sequences and CDR sequences of the invention as well as functional fragments and analogs thereof which share the antigen specificity of the donor antibody. The isolated

WO 01/87339

PCT/US00/27438

nucleic acid sequences of this invention, or fragments thereof, encoding the variable chain peptide sequences or CDRs can be used to produce altered antibodies, e.g., chimeric or humanized antibodies or other engineered 5 antibodies of this invention when operatively combined with a second immunoglobulin partner.

It should be noted that in addition to isolated nucleic acid sequences encoding portions of the altered antibody and antibodies described herein, other such 10 nucleic acid sequences are encompassed by the present invention, such as those complementary to the native CDR-encoding sequences or complementary to the modified human framework regions surrounding the CDR-encoding regions. Useful DNA sequences include those sequences 15 which hybridize under stringent hybridization conditions to the DNA sequences. See, T. Maniatis *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1982), pp. 387-389. An example of one such stringent hybridization condition is 20 hybridization at 4XSSC at 65°C, followed by a washing in 0.1XSSC at 65°C for one hour. Alternatively, an exemplary stringent hybridization condition is 50% formamide, 4XSSC at 42°C. Preferably, these hybridizing DNA sequences are at least about 18 nucleotides in 25 length, *i.e.*, about the size of a CDR.

Altered immunoglobulin molecules can encode altered antibodies which include engineered antibodies such as chimeric antibodies and humanized antibodies. A desired altered immunoglobulin coding region contains CDR- 30 encoding regions that encode peptides having the antigen specificity of a Factor IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIa, V/Va, VII/VIIa or thrombin/prothrombin antibody, preferably a high affinity antibody such as provided by the present invention, inserted into a first 35 immunoglobulin partner such as a human framework or human immunoglobulin variable region.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

Preferably, the first immunoglobulin partner is operatively linked to a second immunoglobulin partner. The second immunoglobulin partner is defined above, and may include a sequence encoding a second antibody region 5 of interest, for example an Fc region. Second immunoglobulin partners may also include sequences encoding another immunoglobulin to which the light or heavy chain constant region is fused in frame or by means of a linker sequence. Engineered antibodies 10 directed against functional fragments or analogs of coagulation factors may be designed to elicit enhanced binding with the same antibody.

The second immunoglobulin partner may also be associated with effector agents as defined above, 15 including non-protein carrier molecules, to which the second immunoglobulin partner may be operatively linked by conventional means.

Fusion or linkage between the second immunoglobulin partners, e.g., antibody sequences, and the effector 20 agent may be by any suitable means, e.g., by conventional covalent or ionic bonds, protein fusions, or hetero-bifunctional cross-linkers, e.g., carbodiimide, glutaraldehyde and the like. Such techniques are known in the art and are described in 25 conventional chemistry and biochemistry texts.

Additionally, conventional linker sequences which simply provide for a desired amount of space between the 30 second immunoglobulin partner and the effector agent may also be constructed into the altered immunoglobulin coding region. The design of such linkers is well known to those of skill in the art.

In addition, signal sequences for the molecules of the invention may be modified by techniques known to those skilled in the art to enhance expression.

35 A preferred altered antibody contains a variable heavy and/or light chain peptide or protein sequence

WO 01/87339

PCT/US00/27438

having the antigen specificity of mAb BC2, e.g., the V_H and V_L chains. Still another desirable altered antibody of this invention is characterized by the amino acid sequence containing at least one, and preferably all of 5 the CDRs of the variable region of the heavy and/or light chains of the murine antibody molecule BC2 with the remaining sequences being derived from a human source, or a functional fragment or analog thereof.

In a further embodiment, the altered antibody of 10 the invention may have attached to it an additional agent. For example, recombinant DNA technology may be used to produce an altered antibody of the invention in which the Fc fragment or CH2 CH3 domain of a complete antibody molecule has been replaced by an enzyme or 15 other detectable molecule (i.e., a polypeptide effector or reporter molecule).

The second immunoglobulin partner may also be 20 operatively linked to a non-immunoglobulin peptide, protein or fragment thereof heterologous to the CDR-containing sequence having antigen specificity to a coagulation factor, preferably to Factor IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIIfa, V/Va, VII/VIIa or 25 thrombin/prothrombin. The resulting protein may exhibit both antigen specificity and characteristics of the non-immunoglobulin upon expression. That fusion partner 30 characteristic may be, e.g., a functional characteristic such as another binding or receptor domain or a therapeutic characteristic if the fusion partner is itself a therapeutic protein or additional antigenic characteristics.

Another desirable protein of this invention may 35 comprise a complete antibody molecule, having full length heavy and light chains or any discrete fragment thereof, such as the Fab or $F(ab')_2$ fragments, a heavy chain dimer or any minimal recombinant fragments thereof such as an F_v or a single-chain antibody (SCA) or any

WO 01/87339

PCT/US00/27438

other molecule with the same specificity as the selected donor mAb, e.g., mAb BC1, BC2, 9E4(2)F4, 11G4(1)B9, HFXLC or HFXI. Such protein may be used in the form of an altered antibody or may be used in its unfused form.

- 5 Whenever the second immunoglobulin partner is derived from an antibody different from the donor antibody, e.g., any isotype or class of immunoglobulin framework or constant regions, an engineered antibody results. Engineered antibodies can comprise
- 10 immunoglobulin (Ig) constant regions and variable framework regions from one source, e.g., the acceptor antibody, and one or more (preferably all) CDRs from the donor antibody, e.g., the anti-Factor IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIIa, V/Va, VII/VIIa or
- 15 thrombin/prothrombin antibodies described herein. In addition, alterations, e.g., deletions, substitutions, or additions, of the acceptor mAb light and/or heavy variable domain framework region at the nucleic acid or amino acid levels, or the donor CDR regions may be made
- 20 in order to retain donor antibody antigen binding specificity.

Such engineered antibodies are designed to employ one (or both) of the variable heavy and/or light chains of the coagulation factor mAb (optionally modified as described) or one or more of the heavy or light chain CDRs. The engineered antibodies of the invention exhibit self-limiting neutralizing activity.

Such engineered antibodies may include a humanized antibody containing the framework regions of a selected human immunoglobulin or subtype or a chimeric antibody containing the human heavy and light chain constant regions fused to the coagulation factor antibody functional fragments. A suitable human (or other animal) acceptor antibody may be one selected from a conventional database, e.g., the KABAT® database, Los Alamos database, and Swiss Protein database, by homology

WO 01/87339

PCT/US00/27438

to the nucleotide and amino acid sequences of the donor antibody. A human antibody characterized by a homology to the framework regions of the donor antibody (on an amino acid basis) may be suitable to provide a heavy chain variable framework region for insertion of the donor CDRs. A suitable acceptor antibody capable of donating light chain variable framework regions may be selected in a similar manner. It should be noted that the acceptor antibody heavy and light chains are not required to originate from the same acceptor antibody.

10 Preferably, the heterologous framework and constant regions are selected from human immunoglobulin classes and isotypes, such as IgG (subtypes 1 through 4), IgM, IgA, and IgE. However, the acceptor antibody need not 15 comprise only human immunoglobulin protein sequences. For instance, a gene may be constructed in which a DNA sequence encoding part of a human immunoglobulin chain is fused to a DNA sequence encoding a non-immunoglobulin amino acid sequence such as a polypeptide effector or 20 reporter molecule.

A particularly preferred humanized antibody contains CDRs of BC2 inserted onto the framework regions of a selected human antibody sequence. For neutralizing humanized antibodies, one, two or preferably three CDRs 25 from the Factor IX antibody heavy chain and/or light chain variable regions are inserted into the framework regions of the selected human antibody sequence, replacing the native CDRs of the latter antibody.

Preferably, in a humanized antibody, the variable 30 domains in both human heavy and light chains have been engineered by one or more CDR replacements. It is possible to use all six CDRs, or various combinations of less than the six CDRs. Preferably all six CDRs are replaced. It is possible to replace the CDRs only in 35 the human heavy chain, using as light chain the unmodified light chain from the human acceptor antibody.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

Still alternatively, a compatible light chain may be selected from another human antibody by recourse to the conventional antibody databases. The remainder of the engineered antibody may be derived from any suitable 5 acceptor human immunoglobulin.

The engineered humanized antibody thus preferably has the structure of a natural human antibody or a fragment thereof, and possesses the combination of properties required for effective therapeutic use, e.g., 10 treatment of thrombotic and embolic diseases in man.

Most preferably, the humanized antibodies have a heavy chain amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 31, 52, or 89. Also most preferred are humanized antibodies having a light chain amino acid sequence as 15 set forth in SEQ ID NO: 44, 57, 62, 74, 78 or 99.

Particularly preferred is the humanized antibody SB 249413 where the heavy chain has the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 31 and the light chain has the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 44.

20 Also particularly preferred is the humanized antibody SB 249415 where the heavy chain has the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 52 and the light chain has the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 57.

Also particularly preferred is the humanized antibody SB 25 249416 where the heavy chain has the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 52 and the light chain has the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 62.

Also particularly preferred is the humanized antibody SB 249417 where the heavy chain has the amino acid sequence 30 as set forth in SEQ ID NO: 52 and the light chain has the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 74.

Also particularly preferred is the humanized antibody SB 35 257731 where the heavy chain has the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 52 and the light chain has the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 78.

Also particularly preferred is the humanized antibody SB

WO 01/87339

PCT/US00/27438

257732 where the heavy chain has the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 89 and the light chain has the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 99.

It will be understood by those skilled in the art that an engineered antibody may be further modified by changes in variable domain amino acids without necessarily affecting the specificity and high affinity of the donor antibody (i.e., an analog). It is anticipated that heavy and light chain amino acids may be substituted by other amino acids either in the variable domain frameworks or CDRs or both. These substitutions could be supplied by the donor antibody or consensus sequences from a particular subgroup.

In addition, the constant region may be altered to enhance or decrease selective properties of the molecules of this invention. For example, dimerization, binding to FC receptors, or the ability to bind and activate complement (see, e.g., Angal et al., *Mol Immunol*, 30, 105-108 (1993), Xu et al., *J Biol Chem*, 269, 3469-3474 (1994), Winter et al., EP 307434-B).

An altered antibody which is a chimeric antibody differs from the humanized antibodies described above by providing the entire non-human donor antibody heavy chain and light chain variable regions, including framework regions, in association with human immunoglobulin constant regions for both chains. It is anticipated that chimeric antibodies which retain additional non-human sequence relative to humanized antibodies of this invention may elicit a significant immune response in humans.

Such antibodies are useful in the prevention and treatment of thrombotic and embolic disorders, as discussed below.

Preferably, the variable light and/or heavy chain sequences and the CDRs of mAb BC2 or other suitable donor mAbs, e.g., BC1, 9E4(2)F4, 11G4(1)B9, HFXLC, HFXI,

WO 01/87339

PCT/US00/27438

and their encoding nucleic acid sequences, are utilized in the construction of altered antibodies, preferably humanized antibodies, of this invention, by the following process. The same or similar techniques may 5 also be employed to generate other embodiments of this invention.

A hybridoma producing a selected donor mAb, e.g., the murine antibody BC2, is conventionally cloned and the DNA of its heavy and light chain variable regions 10 obtained by techniques known to one of skill in the art, e.g., the techniques described in Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory (1989). The variable heavy and light regions of BC2 containing at least the 15 CDR-encoding regions and those portions of the acceptor mAb light and/or heavy variable domain framework regions required in order to retain donor mAb binding specificity, as well as the remaining immunoglobulin-derived parts of the antibody chain derived from a human 20 immunoglobulin, are obtained using polynucleotide primers and reverse transcriptase. The CDR-encoding regions are identified using a known database and by comparison to other antibodies.

A mouse/human chimeric antibody may then be 25 prepared and assayed for binding ability. Such a chimeric antibody contains the entire non-human donor antibody V_H and V_L regions, in association with human Ig constant regions for both chains.

Homologous framework regions of a heavy chain 30 variable region from a human antibody are identified using computerized databases, e.g., KABAT®, and a human antibody having homology to BC2 is selected as the acceptor antibody. The sequences of synthetic heavy chain variable regions containing the BC2 CDR-encoding 35 regions within the human antibody frameworks are designed with optional nucleotide replacements in the

WO 01/87339

PCT/US00/27438

framework regions to incorporate restriction sites. This designed sequence is then synthesized using long synthetic oligomers. Alternatively, the designed sequence can be synthesized by overlapping 5 oligonucleotides, amplified by polymerase chain reaction (PCR), and corrected for errors. A suitable light chain variable framework region can be designed in a similar manner.

A humanized antibody may be derived from the 10 chimeric antibody, or preferably, made synthetically by inserting the donor mAb CDR-encoding regions from the heavy and light chains appropriately within the selected heavy and light chain framework. Alternatively, a humanized antibody of the invention may be prepared 15 using standard mutagenesis techniques. Thus, the resulting humanized antibody contains human framework regions and donor mAb CDR-encoding regions. There may be subsequent manipulation of framework residues. The resulting humanized antibody can be expressed in 20 recombinant host cells, e.g., COS, CHO or myeloma cells. Other humanized antibodies may be prepared using this technique on other suitable Factor IX-specific or other coagulation factor-specific, self-limiting, neutralizing, high affinity, non-human antibodies.

25 A conventional expression vector or recombinant plasmid is produced by placing these coding sequences for the altered antibody in operative association with conventional regulatory control sequences capable of controlling the replication and expression in, and/or 30 secretion from, a host cell. Regulatory sequences include promoter sequences, e.g., CMV promoter, and signal sequences, which can be derived from other known antibodies. Similarly, a second expression vector can be produced having a DNA sequence which encodes a 35 complementary antibody light or heavy chain.

Preferably, this second expression vector is identical

WO 01/87339

PCT/US00/27438

to the first except with respect to the coding sequences and selectable markers, in order to ensure, as much as possible, that each polypeptide chain is functionally expressed. Alternatively, the heavy and light chain 5 coding sequences for the altered antibody may reside on a single vector.

A selected host cell is co-transfected by conventional techniques with both the first and second vectors (or simply transfected by a single vector) to 10 create the transfected host cell of the invention comprising both the recombinant or synthetic light and heavy chains. The transfected cell is then cultured by conventional techniques to produce the engineered antibody of the invention. The humanized antibody which 15 includes the association of both the recombinant heavy chain and/or light chain is screened from culture by an appropriate assay such as ELISA or RIA. Similar conventional techniques may be employed to construct other altered antibodies and molecules of this 20 invention.

Suitable vectors for the cloning and subcloning steps employed in the methods and construction of the compositions of this invention may be selected by one of skill in the art. For example, the pUC series of 25 cloning vectors, such as pUC19, which is commercially available from supply houses, such as Amersham or Pharmacia, may be used. Additionally, any vector which is capable of replicating readily, has an abundance of cloning sites and selectable genes (e.g., antibiotic 30 resistance) and is easily manipulated may be used for cloning. Thus, the selection of the cloning vector is not a limiting factor in this invention.

Similarly, the vectors employed for expression of the engineered antibodies according to this invention 35 may be selected by one of skill in the art from any conventional vector. The vectors also contain selected

WO 01/87339

PCT/US00/27438

regulatory sequences (such as CMV promoters) which direct the replication and expression of heterologous DNA sequences in selected host cells. These vectors contain the above-described DNA sequences which code for 5 the engineered antibody or altered immunoglobulin coding region. In addition, the vectors may incorporate the selected immunoglobulin sequences modified by the insertion of desirable restriction sites for ready manipulation.

10 The expression vectors may also be characterized by genes suitable for amplifying expression of the heterologous DNA sequences, e.g., the mammalian dihydrofolate reductase gene (DHFR). Other preferable vector sequences include a poly A signal sequence, such 15 as from bovine growth hormone (BGH) and the betaglobin promoter sequence (betaglopro). The expression vectors useful herein may be synthesized by techniques well known to those skilled in this art.

20 The components of such vectors, e.g., replicons, selection genes, enhancers, promoters, signal sequences and the like, may be obtained from commercial or natural sources or synthesized by known procedures for use in directing the expression and/or secretion of the product 25 of the recombinant DNA in a selected host. Other appropriate expression vectors of which numerous types are known in the art for mammalian, bacterial, insect, yeast and fungal expression may also be selected for this purpose.

25 The present invention also encompasses a cell line 30 transfected with a recombinant plasmid containing the coding sequences of the engineered antibodies or altered immunoglobulin molecules thereof. Host cells useful for the cloning and other manipulations of these cloning vectors are also conventional. However, most desirably, 35 cells from various strains of *E. coli* are used for replication of the cloning vectors and other steps in

WO 01/87339

PCT/US00/27438

the construction of altered antibodies of this invention.

Suitable host cells or cell lines for the expression of the engineered antibody or altered antibody of the invention are preferably mammalian cells such as CHO, COS, a fibroblast cell (e.g., 3T3) and myeloid cells, and more preferably a CHO or a myeloid cell. Human cells may be used, thus enabling the molecule to be modified with human glycosylation patterns. Alternatively, other eukaryotic cell lines may be employed. The selection of suitable mammalian host cells and methods for transformation, culture, amplification, screening and product production and purification are known in the art. See, e.g., Sambrook et al., *supra*.

Bacterial cells may prove useful as host cells suitable for the expression of the recombinant Fab's of the present invention (see, e.g., Plückthun, A., *Immunol Rev*, 130, 151-188 (1992)). However, due to the tendency of proteins expressed in bacterial cells to be in an unfolded or improperly folded form or in a non-glycosylated form, any recombinant Fab produced in a bacterial cell would have to be screened for retention of antigen binding ability. If the molecule expressed by the bacterial cell was produced in a properly folded form, that bacterial cell would be a desirable host. For example, various strains of *E. coli* used for expression are well-known as host cells in the field of biotechnology. Various strains of *B. subtilis*, *Streptomyces*, other bacilli and the like may also be employed.

Where desired, strains of yeast cells known to those skilled in the art are also available as host cells, as well as insect cells, e.g. *Drosophila* and *Lepidoptera* and viral expression systems. See, e.g.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

Miller et al., *Genetic Engineering*, 8, 277-298, Plenum Press (1986) and references cited therein.

The general methods by which the vectors of the invention may be constructed, the transfection methods required to produce the host cells of the invention, and culture methods necessary to produce the altered antibody of the invention from such host cells are all conventional techniques. Likewise, once produced, the altered antibodies of the invention may be purified from the cell culture contents according to standard procedures of the art, including ammonium sulfate precipitation, affinity columns, column chromatography, gel electrophoresis and the like. Such techniques are within the skill of the art and do not limit this invention.

Yet another method of expression of the humanized antibodies may utilize expression in a transgenic animal, such as described in U. S. Patent No. 4,873,316. This relates to an expression system using the animal's casein promoter which when transgenically incorporated into a mammal permits the female to produce the desired recombinant protein in its milk.

Once expressed by the desired method, the engineered antibody is then examined for *in vitro* activity by use of an appropriate assay. Presently, conventional ELISA assay formats are employed to assess qualitative and quantitative binding of the engineered antibody to Factor IX or to other appropriate coagulation factors. Additionally, other *in vitro* assays may also be used to verify neutralizing efficacy prior to subsequent human clinical studies performed to evaluate the persistence of the engineered antibody in the body despite the usual clearance mechanisms.

Following the procedures described for humanized antibodies prepared from BC2, one of skill in the art may also construct humanized antibodies from other donor

WO 01/87339

PCT/US00/27438

antibodies, variable region sequences and CDR peptides described herein. Engineered antibodies can be produced with variable region frameworks potentially recognized as "self" by recipients of the engineered antibody.

5 Minor modifications to the variable region frameworks can be implemented to effect large increases in antigen binding without appreciable increased immunogenicity for the recipient. Such engineered antibodies may effectively treat a human for coagulation factor-

10 mediated conditions. Such antibodies may also be useful in the diagnosis of such conditions.

This invention also relates to a method for inhibiting thrombosis in an animal, particularly a human, which comprises administering an effective dose 15 of an anti-coagulation factor monoclonal antibody having self-limiting neutralizing activity in combination with a plasminogen activator. Combination therapy enhances thrombolysis at sub-optimal concentrations of plasminogen activator decreasing the time to restoration 20 of blood flow and increasing the frequency and total duration of vessel reperfusion. In contrast to heparin, combination therapy does not significantly perturb normal hemostatic functions and spares fibrinogen, plasminogen and alpha-2-antiplasmin levels.

25 Accordingly, this invention also relates to a method of reducing a required dose of a thrombolytic agent in treatment of thrombosis in an animal comprising administering an anticoagulant specifically targeting a component of the intrinsic coagulation pathway in

30 combination with the thrombolytic agent.

Preferably, the coagulation factor is from the intrinsic or common coagulation pathway. Most preferably, the anti-coagulation factor monoclonal antibody is an anti-Factor IX, anti-Factor IXa, anti- 35 Factor X, anti-Factor Xa, anti-Factor XI, anti-Factor XIa, anti-Factor VIII, anti-Factor VIIIa, anti-Factor V,

WO 01/87339

PCT/US00/27438

anti-Factor Va, anti-Factor VII, anti-Factor VIIa, anti-thrombin or anti-prothrombin. The mAb can include one or more of the engineered antibodies or altered antibodies described herein or fragments thereof.

5 Preferably, the plasminogen activator is tPA, streptokinase, urokinase. Particularly preferred is tPA. Also preferred are tPA variants as described in, e.g., Tachias and Madison, *J Biol Chem*, 272, 14580-14585 (1997); Fujise et al., *Circulation*, 95, 715-722 (1997);
10 Coombs et al., *J Biol Chem*, 273, 4323-4328 (1998); Van de Werf, et al., *Am Heart J*, 137, 786-791 (1999) and streptokinase and urokinase variants, such as single-chain urokinase plasminogen activator, acylated plasminogen streptokinase activator complex,
15 staphylokinase and plasminogen activators of vampire bat origin.

Alternatively, acetylsalicylic acid can be administered in combination with the anti-coagulation factor monoclonal antibody. In some cases, combination
20 therapy lowers the therapeutically effective dose of anti-coagulation factor monoclonal antibody.

The therapeutic response induced by the use of the molecules of this invention is produced by the binding to the respective coagulation factor and the
25 subsequent self-limiting inhibition of the coagulation cascade. Thus, the molecules of the present invention, when in preparations and formulations appropriate for therapeutic use, are highly desirable for persons susceptible to or experiencing abnormal clotting
30 activity associated with, but not limited to, myocardial infarction, unstable angina, atrial fibrillation, stroke, renal damage, pulmonary embolism, deep vein thrombosis and artificial organ and prosthetic implants.
A particularly preferred use is in myocardial
35 infarction.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

Another preferred use is in treatment of post-thromboembolic induced ischemia. Accordingly, this invention also relates to a method for treating an animal post-thromboembolic induced ischemia comprising

5 administering an anti-Factor IX antibody or antibody fragment. The antibody or a fragment can be administered post-embolus, i.e., after a clot originating anywhere in the vasculature has traveled into the cerebral vasculature and lodges, blocking

10 and/or reducing blood flow and causing ischemia. The antibody or a fragment can also be administered post-stroke, i.e., after recognition on the part of an individual or an observer of impaired neurological function resulting from embolization. Further, this

15 invention relates to a method for treating an animal post-thromboembolic induced ischemia comprising administering an anti-Factor IX antibody or antibody fragment in combination with a plasminogen activator. The antibody or a fragment and plasminogen activator can

20 be administered post-embolus or post-stroke. These treatment methods result in maintenance of vascular perfusion in collateral vessels. The post-injury treatment methods of the invention mitigate the consequences of prolonged ischemia such as continuing

25 pathological thrombosis in the ischemic bed, which can result in the growth of infarcted tissue and greater neurological deficits.

Further, this invention relates to a method for reducing a required dose of a thrombolytic agent in treatment of an animal post-thromboembolic induced ischemia comprising administering an anti-Factor IX antibody in combination with the thrombolytic agent.

Another preferred use is prophylactic administration to an animal susceptible to

30 thromboembolic stroke. Thus, the invention also relates to a method for preventing thromboembolic stroke in an

WO 01/87339

PCT/US00/27438

animal comprising administering an anti-Factor IX antibody to an animal at risk for thromboembolic stroke. Those at risk for thromboembolic stroke include, but are not limited to, patients susceptible to atrial fibrillation or those undergoing surgical interventions or other pro-coagulant invasive techniques.

5 The altered antibodies, antibodies and fragments thereof of this invention may also be used in conjunction with other antibodies, particularly human 10 mAbs reactive with other markers (epitopes) responsible for the condition against which the engineered antibody of the invention is directed.

15 The therapeutic agents of this invention are believed to be desirable for treatment of abnormal clotting conditions from about 1 day to about 3 weeks, or as needed. This represents a considerable advance over the currently used anticoagulants heparin and warfarin. The dose and duration of treatment relates to 20 the relative duration of the molecules of the present invention in the human circulation, and can be adjusted by one of skill in the art depending upon the condition being treated and the general health of the patient.

25 The mode of administration of the therapeutic agents of the invention may be any suitable route which delivers the agent to the host. The altered antibodies, antibodies, engineered antibodies, and fragments thereof, plasminogen activator and pharmaceutical compositions of the invention are particularly useful for parenteral administration, i.e., subcutaneously, 30 intramuscularly, intravenously or intranasally.

35 Therapeutic agents of the invention may be prepared as pharmaceutical compositions containing an effective amount of the engineered (e.g., humanized) antibody of the invention and plasminogen activator as active ingredients in a pharmaceutically acceptable carrier. Alternatively, the pharmaceutical compositions of the

WO 01/87339

PCT/US00/27438

invention could also contain acetylsalicylic acid. In the prophylactic agent of the invention, an aqueous suspension or solution containing the engineered antibody, preferably buffered at physiological pH, in a 5 form ready for injection is preferred. The compositions for parenteral administration will commonly comprise a solution of the engineered antibody of the invention or a cocktail thereof dissolved in an pharmaceutically acceptable carrier, preferably an aqueous carrier. A 10 variety of aqueous carriers may be employed, e.g., 0.4% saline, 0.3% glycine and the like. These solutions are sterile and generally free of particulate matter. These solutions may be sterilized by conventional, well known sterilization techniques (e.g., filtration). The 15 compositions may contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions such as pH adjusting and buffering agents, etc. The concentration of the antibody of the invention in such pharmaceutical 20 formulation can vary widely, i.e., from less than about 0.5%, usually at or at least about 1% to as much as 15 or 20% by weight and will be selected primarily based on fluid volumes, viscosities, etc., according to the particular mode of administration selected.

25 Thus, a pharmaceutical composition of the invention for intramuscular injection could be prepared to contain 1 mL sterile buffered water, and between about 1 ng to about 100 mg, e.g. about 50 ng to about 30 mg or more preferably, about 5 mg to about 25 mg, of an engineered 30 antibody of the invention. Similarly, a pharmaceutical composition of the invention for intravenous infusion could be made up to contain about 250 ml of sterile Ringer's solution, and about 1 mg to about 30 mg and preferably 5 mg to about 25 mg of an engineered antibody 35 of the invention. Actual methods for preparing parenterally administrable compositions are well known

WO 01/87339

PCT/US00/27438

or will be apparent to those skilled in the art and are described in more detail in, for example, "Remington's Pharmaceutical Science", 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

5 It is preferred that the therapeutic agents of the invention, when in a pharmaceutical preparation, be present in unit dose forms. The appropriate therapeutically effective dose can be determined readily by those of skill in the art. To effectively treat a
10 thrombotic or embolic disorder in a human or other animal, one dose of approximately 0.1 mg to approximately 20 mg per kg body weight of a protein or an antibody of this invention should be administered parenterally, preferably *i.v.* or *i.m.* Such dose may, if
15 necessary, be repeated at appropriate time intervals selected as appropriate by a physician during the thrombotic response.

The antibodies, altered antibodies or fragments thereof described herein can be lyophilized for storage
20 and reconstituted in a suitable carrier prior to use. This technique has been shown to be effective with conventional immunoglobulins and art-known lyophilization and reconstitution techniques can be employed.

25 The present invention will now be described with reference to the following specific, non-limiting examples.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

Example 1Preparation and Screening of Anti-Factor IX Monoclonal Antibodies

Female Balb/C mice were injected with human factor IX purified as described in Jenny, R. et al., *Prep Biochem*, 16, 227-245 (1986). Typically, each mouse received an initial injection of 100 ug protein dissolved in 0.15 mL phosphate-buffered saline (PBS) and mixed with 0.15 mL complete Freund's adjuvant. Booster 10 immunizations of 50 ug protein in 0.15 mL PBS with 0.15 mL incomplete Freund's adjuvant were given approximately biweekly over a 2-3 month period. After the final boost, the mouse received 50 ug of Factor IX in PBS three days before spleen/myeloma cell fusions. Spleen 15 cells were isolated from an immunized mouse and fused with NS-1 myeloma cells (Kohler, G. et al., *Eur J Immunol*, 6, 292-295 (1976)) using polyethylene glycol as described by Oi, V.T. et al. in "Selected Methods in Cellular Immunology," Mishell, B.B. and Shigui, S.M., 20 eds., Freeman Press, San Francisco. Following the fusion, the cells were resuspended in RPMI 1640 media containing 10% fetal calf sera and aliquots were placed in each well of four 24-well plates containing 0.5 mL of peritoneal lavage cell-conditioned media. On the 25 following day, each well received 1.0 mL of 2×10^{-4} M hypoxanthine, 8×10^{-7} M aminopterin and 3.2×10^{-5} M thymidine in RPMI 1640 media containing 10% fetal calf sera. The cells were fed every 3-4 days by removing half of the media and replacing it with fresh media 30 containing 1×10^{-4} M hypoxanthine and 1.6×10^{-5} M thymidine.

Approximately two weeks later, 1.0 mL of hybridoma 35 medium was removed from each well and tested for anti-Factor IX antibodies using an ELISA assay as described by Jenny, R.J. et al. in *Meth Enzymol*, 222, 400-416 (1993). Briefly, factor IX was immobilized onto

WO 01/87339

PCT/US00/27438

plastic wells of 96-well microtiter plates. Hybridoma supernatants or dilutions of purified antibody were then incubated in the wells. The wells were washed and the presence of antibody-antigen complexes detected with a 5 goat anti-murine immunoglobulin second antibody conjugated to horseradish peroxidase and the chromogenic substrate *o*-dianisidine.

Wells containing anti-Factor IX antibodies were subcloned by limiting dilution and grown in 96-well 10 plates. Supernatant from the cloned hybridoma cell cultures were screened for antibody to Factor IX by the ELISA assay described above and cells from positive hybridomas were expanded, frozen, stored in liquid nitrogen and then grown as ascitic tumors in mice.

15

Example 2

Self-Limiting Effect of Anti-Coagulation Factor

Antibodies in Coagulation

The effect of increasing concentrations of anti- 20 coagulation factor antibodies on activated partial thromboplastin time (aPTT) of human plasma was determined in a fibrometer (Becton-Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Maryland) using Baxter reference procedure LIB0293-J, 3/93 revision 25 (Baxter Scientific, Edison, New Jersey).

Prior to the start of the experiment, 2 to 3 mL of 0.02 M CaCl₂ in a 5 mL tube were placed into the heating chamber of the fibrometer. Human plasma samples were either freshly drawn and kept on ice or reconstituted 30 per the manufacturer's recommendation from Hemostasis Reference Plasma (American Diagnostics, Greenwich, Connecticut).

Unfractionated heparin from porcine intestinal mucosa (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri), low 35 molecular weight heparin from porcine intestinal mucosa (Lovenox®, enoxaparin sodium, Rhone-Poulenc Rorer

WO 01/87339

PCT/US00/27438

Pharmaceuticals, Collegeville, Pennsylvania) or mAb anticoagulants were prepared as approximately 50 μ M stock solutions and serially diluted directly into the test plasma. A blank containing plasma without

5 anticoagulant was included as a reference.

Two fibroTube® fibrometer cups were filled with 100 ul test plasma or 100 ul test plasma with anticoagulant and 125 ul of actin activated cephaloplastin reagent (Actin reagent, from rabbit brain cephalin in ellagic acid, available from Baxter Scientific), respectively

10 and placed in the fibrometer wells at 37°C.

After one minute, 100 ul of actin reagent was transferred to a plasma-containing cup and the contents mixed several times with a pipette. After a 3 minute

15 incubation, 100 ul of CaCl_2 , prewarmed at 37°C, was added to the plasma-actin reagent mixture using a Automatic Pipette/Timer-trigger (Becton-Dickinson). The clotting times were noted and the results in Fig. 1 are presented as clotting times as a function of final concentrations

20 of anticoagulant in the total assay volume of 300 ul. The nominal concentration of Factor IX in the assay is 30-40 nM.

The results shown in Fig. 1 demonstrate the effect of increasing concentrations of the murine anti-Factor

25 IX mAbs BC1 and BC2 on aPTT clotting times. Both mAbs inhibit clotting by prolonging the aPTT and both mAbs

reach a final saturating effect on the aPTT. The IC_{50} values are similar at ~35 nM and ~50 nM for BC1 and BC2, respectively, but the difference in the maximum response

30 to the two antibodies is marked. Saturating concentrations of BC1 increases the aPTT by about 50% to ~40 sec. BC2, on the other hand, increases the aPTT by 3.5-fold to about 90 sec. The therapeutic target zone

35 used in anticoagulant therapy with heparin is highlighted. The results indicate that the two mAbs bracket the heparin therapeutic aPTT range.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

The properties of mAbs BC1 and BC2 are summarized in Table I. Each of the BC mAbs recognizes both the zymogen, Factor IX, as well as the active protease, Factor IXa, but only BC2 is capable of blocking both zymogen activation as well as protease activity. BC1 and BC2 were found to cross-react with Cynomolgous monkey Factor IX. Additionally, BC2 also cross-reacted with rat Factor IX.

Table I. Summary of *in vitro* Properties of Anti-Factor IX mAbs

	BC1	BC2
Binds Factor IX	yes	yes
Binds Factor IXa	yes	yes
Inhibits IX to IXa conversion	no	yes
Inhibits IXa activity in Xase complex	yes	yes
Cofactor requirement	none	divalent metals $\text{Ca}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$
$\frac{\text{aPTT}_{\text{max}}}{\text{aPTT}_{\text{normal}}} \times 100\%$	150	350
IC_{50} , nM	~35	~50
Species cross-reactivity	monkey	rat, monkey
Isotype	IgG1	IgG2a

WO 01/87339

PCT/US00/27438

The results shown in Fig. 2 demonstrate the effect of increasing concentrations of the anti-Factor IX mAbs 9E4(2)F4 and 11G4(1)B9 on aPTT clotting times. The plasma for the assay was diluted to one-half the normal 5 concentration, giving an initial aPTT of 45 seconds. Both mAbs inhibit clotting by prolonging the aPTT and both mAbs reach a final saturating effect on the aPTT. Saturating concentrations of 9E4(2)F4 and 11G4(1)B9 10 increases the aPTT to ~90 to 100 seconds for 9E4(2)F4 and to ~80 seconds for 11G4(1)B9. The results indicate that the two mAbs are at the upper end of the heparin therapeutic aPTT range.

The results shown in Fig. 3 demonstrate the effect of increasing concentrations of the anti-Factor X mAbs 15 HFXLC (vs. light chain epitope), HFXHC (vs. heavy chain epitope) and the anti-Factor XI mab HFXI on aPTT clotting times. These mAbs were obtained from Enzyme Research Laboratories (South Bend, IN). The mAbs HFXLC and HFXI inhibit clotting by prolonging the aPTT and 20 both mAbs reach a final saturating effect on the aPTT. The IC_{50} value for HFXLC is ~40 nM; saturating concentrations increase the aPTT to ~60 seconds. The IC_{50} value for HFXI is ~20 nM; saturating concentrations increase the aPTT to ~100 seconds. The results indicate 25 that HFXLC is within the heparin therapeutic aPTT range while HFXI falls at the upper end of the heparin therapeutic range. The mAb HFXHC had no effect on aPTT clotting times.

Self-limiting prolongation of the aPTT was also 30 observed with antibodies to Factor VIII, the cofactor to Factor IXa. For example, the anti-human Factor VIII antibody, SAF8C-IG, purchased from Affinity Biologicals, Inc., increased the aPTT to a maximum of about 65 sec. Half-maximal prolongation of the aPTT was achieved with 35 about 100 nM antibody.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

Example 3Efficacy of murine Factor IX mAbs in Rat Thrombus Model

In order to evaluate the efficacy of anti-Factor IX antibodies in prevention of arterial thrombosis, the rat carotid artery thrombosis model as reported by Schumacher et al. in *J Cardio Pharm*, 22, 526-533 (1993) was adapted. This model consists of segmental injury to the carotid endothelium by oxygen radicals generated by FeCl₃ solution applied on the surface of the carotid artery.

In brief, rats were anesthetized with pentobarbitone sodium, the jugular vein cannulated for intravenous injections and the left femoral artery cannulated for blood pressure and heart rate monitoring. The carotid artery was isolated by aseptic technique via a surgical incision in the neck and equipped with a magnetic flow probe for blood flow measurement. After a period of stabilization, baseline parameters were established for the following variables: carotid blood flow, arterial pressure, heart rate, activated partial thromboplastin time (aPTT) and prothrombin time (PT). Thereafter, a premeasured Whatman filter paper soaked in 50% FeCl₃ solution was placed on the carotid artery for 15 minutes for complete injury of the underlying endothelial cells. After removal of the FeCl₃ soaked paper, the experiment was followed to completion over 60 minutes. At the end of the experiment, the carotid thrombus was extracted from the carotid artery and weighed.

All agents were administered 15 minutes prior to the onset of carotid injury. The following treatments were examined and compared to the Factor IX mAb BC2.

1. Heparin: 15, 30, 60 or 120 U/kg bolus, followed by infusion of 0.5, 1, 2 or 4 U/kg/min, respectively over 60 minutes

WO 01/87339

PCT/US00/27438

2. Acetylsalicylic acid (ASA, aspirin): 5 mg/kg bolus
3. Anti-Factor IX mAb BC2: 1, 3 or 6 mg/kg bolus, followed by infusion 0.3, 1, or 2 ug/kg/min, 5 respectively over 60 minutes
4. Heparin: 30U/kg bolus + 1U/kg/min + ASA at 5 mg/kg
5. Anti-Factor IX mAb BC2: 1 mg/kg + 0.3 ug/kg/min + ASA at 5 mg/kg

10

Figs. 4 and 5 demonstrate the comparative pharmacology of the anti-coagulant/thrombotic regimens by showing the effect of heparin, ASA and Factor IX mAb BC2 on aPTT (Fig. 4) and PT (Fig. 5).

15

The key index for bleeding diathesis, aPTT, was used as the primary criterion for evaluation of efficacy versus bleeding liabilities of the anti-coagulant/thrombotic agents used in the study. The results in Fig. 4 demonstrate the dose-dependent 20 prolongation of aPTT by heparin with maximal prolongation of the clotting time, beyond the test limit, at the two higher doses. ASA alone did not significantly increase aPTT but in combination with heparin, a marked synergistic effect was observed. The 25 Factor IX mAbs had a modest effect on aPTT and even at the highest dose, the increase in clotting time did not exceed the 3-fold limit of standard anti-coagulant practiced clinically. Most notably, the low dose of Factor IX mAb BC2 in combination with ASA did not change 30 the aPTT.

35

In Fig. 5, the data indicate that PT was also significantly prolonged by heparin, at the two higher doses, and by the ASA + heparin combination, but not by any of the Factor IX mAb doses alone or in combination with ASA.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

The effect of heparin, ASA and Factor IX mAb on carotid artery occlusion is shown in Fig. 6. The results indicate that the carotid arteries of all of the vehicle-treated animals occlude in response to the 5 injury. Heparin dose dependently inhibited the occlusion of the carotid artery. At the highest dose, heparin completely prevented the occlusion of the carotid artery; at this dose however, no coagulation could be initiated. ASA alone had only a minor effect 10 on carotid occlusion. ASA in combination with heparin also failed to completely prevent carotid occlusion. Factor IX mAb completely blocked carotid occlusion at the two higher doses, which have not prolonged coagulation beyond the clinically desired target. The 15 lower dose of Factor IX mAb, that largely failed to secure patency alone, demonstrated complete inhibition of carotid occlusion when administered in combination with ASA.

The effect of heparin, ASA and Factor IX mAb on 20 thrombus weight is shown in Fig. 7. Heparin dose-dependently reduced thrombus mass in the carotid artery. However, some residual thrombus was still found in the carotid artery in spite of complete blockade of coagulation. ASA alone or in combination with heparin 25 (30 U/kg regimen) had only a partial effect on thrombus weight. Factor IX mAb dose-dependently reduced thrombus mass and the high dose virtually prevented completely thrombus formation. Moreover, the combination of the low dose anti-Factor IX mAb and ASA, a regimen that 30 completely prevented carotid occlusion without adversely affecting the coagulation indices, completely prevented thrombus formation.

The studies conducted in the rat carotid thrombosis model clearly demonstrate the efficacy of Factor IX mAb 35 in prevention of thrombosis in a highly thrombogenic arterial injury model. Most notably, the efficacy of

WO 01/87339

PCT/US00/27438

the Factor IX mAb was demonstrated within the desired therapeutic anticoagulant target defined by the aPTT. Furthermore, heparin, the current standard anticoagulant, reached efficacy comparable to Factor IX mAb only at doses that severely compromised coagulation to the extent of producing non-coagulable blood. Interestingly, the observed potentiation and synergy acquired by ASA joint treatment with heparin was also demonstrated when ASA was given with anti-Factor IX mAb. 10 However, unlike the combination of heparin and ASA which resulted in potentiation of both the anti-thrombotic and anti-coagulant effects, the combination of Factor IX mAb and ASA resulted in potentiation of the anti-thrombotic efficacy with no consistent effect on *ex vivo* blood 15 coagulation parameters. Taken together, the data show a superior antithrombotic capacity of Factor IX mAb compared to heparin, ASA or a combination of heparin and ASA.

20 **Example 4****Scanning Electron Microscopy of Rat Thrombosis Model**

Segments of rat carotid artery were collected from sham, ferric chloride only and ferric chloride + 6 mg/kg Factor IX antibody, 3/group, 15 minutes after 25 application of ferric chloride. The arteries were fixed by perfusion with formaldehyde and ligated above and below the lesioned area. Fixed arteries were dehydrated, incubated in hexamethyldisilazane and dried in a desiccator. Dried arteries were opened lengthwise, 30 placed on Scanning Electron Microscopy (SEM) stubs and sputter coated with gold.

SEM of sham arteries revealed an essentially normal endothelium with rare scattered platelets. There were a few breaks in the endothelium, probably as a result of 35 mechanical damage during surgery and the underlying basement membrane was covered by a carpet of platelets.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

No evidence of thrombus formation was observed in the sham rats.

SEM of the arteries treated with ferric chloride revealed large mural thrombi which occupied a large portion of the lumen of the vessel. The thrombi were composed of aggregated platelets, red blood cells and amorphous and fibrillar proteinaceous material. The proteinaceous material is consistent with fibrin. The endothelium of the arteries was mostly obscured by the large thrombi. Where visible, the endothelium overlying the region treated with ferric chloride was covered by numerous adherent platelets and amorphous proteinaceous material.

SEM of the arteries treated with ferric chloride from rats also treated with Factor IX antibody, revealed the lumen of the vessels to be largely free of thrombus. The endothelium overlying the region treated with ferric chloride showed extensive damage and some areas were covered by adherent platelets and platelet aggregates but there was little or no proteinaceous material.

Example 5

Anti-Factor IX mAb BC2 Heavy and Light Chain cDNA Sequence Analysis

25 Total RNA was purified by using TriReagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) according to the manufacturer's protocol. RNA was precipitated with isopropanol and dissolved in 0.5% SDS and adjusted to 0.5M NaCl. Poly A⁺ RNA was isolated 30 with Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (Dynal A.S., Lake Success, NY) according to the manufacturer's protocol. Poly A⁺ RNA was eluted from the beads and resuspended in TE buffer. Twelve aliquots of 100 ng of RNA were reverse transcribed with a RT-PCR kit per the manufacturer's 35 instructions (Boehringer Mannheim Cat. No. 1483-188) using a dT oligo for priming. For the heavy chain, PCR

WO 01/87339

PCT/US00/27438

amplifications of 6 RNA/DNA hybrids were carried out for 25 cycles using a murine IgG2a hinge primer (SEQ ID NO: 1) and a heavy chain signal sequence primer (SEQ ID NO: 2). Similarly, for the light chain, PCR amplifications of 6 RNA/DNA hybrids were carried out for 25 cycles using a murine kappa primer (SEQ ID NO: 3) and a degenerate light chain signal sequence primer (SEQ ID NO: 4). The PCR products from each of the 12 amplifications were ligated in a PCR2000 vector (TA cloning Kit, Invitrogen, Cat. No. K2000-01). Colonies of recombinant clones were randomly picked and minipreparations of plasmid DNA were prepared using an alkaline extraction procedure described by Birnboim and Doly in *Nucl. Acids Res.* 7, 1513 (1979). The isolated plasmid DNA was digested with EcoRI and analyzed on a 0.8% agarose gel. Double-stranded cDNA inserts of the appropriate size, i.e., ~700 bp for the heavy chain and ~700 bp for the light chain, were sequenced by a modification of the Sanger method. The sequence of all 12 of the heavy and light chains were compared to generate a consensus BC2 heavy chain variable region sequence (SEQ ID NO: 5) and consensus BC2 light chain variable region sequence (SEQ ID NO: 6).

Sequence analysis of the BC2 heavy chain variable region cDNA revealed a 363 nucleotide open reading frame encoding a 121 amino acid sequence (SEQ ID NO: 7). The heavy chain CDR1, 2 and 3 sequences are listed in SEQ ID NOs: 8, 9 and 10, respectively.

Sequence analysis of the BC2 light chain variable region cDNA revealed a 321 nucleotide open reading frame encoding a 107 amino acid sequence (SEQ ID NO: 11). The light chain CDR1, 2 and 3 sequences are listed in SEQ ID NOs: 12, 13 and 14, respectively.

Example 6Humanized Antibodies

Six humanized antibodies designated SB 249413, SB 249415, SB 249416, SB249417, SB 257731 and SB 257732 5 were designed to contain the murine CDRs described above in a human antibody framework.

SB 249413

SB 249413 contains the heavy chain F9HZHC 1-0 and the light chain F9HZLC 1-0. The synthetic variable 10 region humanized heavy chain F9HZHC 1-0 was designed using the first three framework regions of the heavy chain obtained from immunoglobulin RF-TS3'CL (Capra, J.D. et al., *J. Clin. Invest.* 86, 1320-1328 (1990) identified in the Kabat database as Kabpro:Hhc10w) and 15 the BC2 heavy chain CDRs described previously. No framework amino acids substitutions which might influence CDR presentation were made. Four overlapping synthetic oligonucleotides were generated (SEQ ID NOS: 15, 16, 17 and 18) which, when annealed and extended, 20 code for the amino acids representing the heavy chain variable region through and including CDR3 (SEQ ID NOS: 19 and 20). This synthetic gene was then amplified using PCR primers (SEQ ID NOS: 21 and 22) and ligated into the pCR2000 vector (TA cloning Kit, Invitrogen, 25 Cat. No. K2000-01) and isolated from a *Spe*I, *Kpn*I restriction digest. A second DNA fragment coding for the campath signal sequence including the first five amino acids of the variable region (SEQ ID NOS: 23 and 24) was made by PCR amplification of the appropriate 30 region of a construct encoding a humanized anti-Respiratory Syncitial Virus heavy chain (SEQ ID NO: 25) with two primers (SEQ ID NOS: 26 and 27) and digesting with the restriction enzymes *Eco*RI and *Spe*I. The two fragments generated were ligated into an *Eco*RI, *Kpn*I 35 digested pFHZHC2-6pCD mammalian cell expression vector which contained the remainder of a human consensus

WO 01/87339

PCT/US00/27438

framework 4 and IgG1 constant region. The vector contained a single amino acid mutation of the pFHZHC2-3pCD vector described in published International Patent Application No. WO94/05690. The final residue of framework 2 (residue 49) was mutated from Ser to Ala by digesting pFHZHC2-3pCD with *Xba*I and *Eco*R5 and inserting a linker generated from two synthetic oligonucleotides (SEQ ID NOS: 28 and 29). The sequence of the F9HZHC 1-0 insert is shown in SEQ ID NOS: 30 and 31.

10 The synthetic variable region humanized light chain F9HZLC 1-0 was designed using the framework regions of the human light chain obtained from immunoglobulin LS8'CL (Carmack *et al.*, *J. Exp. Med.* 169, 1631-1643 (1989) identified in the Kabat database as

15 Kabpro:Hkl318) and the BC2 light chain CDRs described previously. No framework amino acids substitutions which might influence CDR presentation were made. Two overlapping synthetic oligonucleotides were generated (SEQ ID NOS: 32 and 33) which, when annealed and

20 extended, code for amino acids representing the light chain variable region (SEQ ID NOS: 34 and 35). This synthetic gene was then amplified using PCR primers (SEQ ID NOS: 36 and 37) and ligated into the pCR2000 vector (TA cloning Kit, Invitrogen, Cat. No. K2000-01), and

25 isolated from a *Scal*I, *Sac*II restriction digest. A second DNA fragment coding for the campath signal sequence including the first two amino acids of the variable region (SEQ ID NOS: 38 and 39) was made by PCR amplification of the the appropriate region of a

30 construct encoding a humanized anti-Respiratory Syncitial Virus heavy chain (SEQ ID NO: 25) with the two primers (SEQ ID NOS: 26 and 40) and digesting with the restriction enzymes *Eco*RI and *Scal*I. The two fragments generated were ligated into an *Eco*RI, *Sac*II digested

35 pFHzLC1-2pCN mammalian cell expression vector which contained the remainder of a human framework 4 and kappa

WO 01/87339

PCT/US00/27438

constant region. The vector contained a single amino acid mutation of the pFHZLC1-1pCN vector described in published International Patent Application No. WO94/05690. A framework 2 residue was mutated from Ser 5 to Pro by digesting pFHZLC1-pCN with *Sma*I and *Kpn*I and inserting a linker generated from two synthetic oligonucleotides (SEQ ID NOS: 41 and 42). The sequence of the F9HZLC 1-0 insert is shown in SEQ ID NOS: 43 and 44.

10 **SB_249415**

SB 249415 contains the heavy chain F9HZHC 1-1 and the light chain F9HZLC 1-1. These heavy and light chain constructs are based on F9HZHC 1-0 and F9HZLC 1-0, respectively, however, they have framework amino acid 15 substitutions which can influence CDR presentation.

F9HZHC 1-1 has three framework amino acid substitutions which might influence CDR presentation. Two overlapping synthetic oligonucleotides were generated (SEQ ID NOS: 45 and 46), which when annealed 20 and extended, code for amino acids representing the altered portion of the heavy chain variable region altered (SEQ ID NOS: 47 and 48). This synthetic gene was then amplified using PCR primers (SEQ ID NOS: 49 and 50), ligated into the pCR2000 vector (TA cloning Kit, 25 Invitrogen, Cat. No. K2000-01) and isolated from a *Eco*NI, *Kpn*I restriction digest. This fragment was ligated into *Eco*NI, *Kpn*I digested F9HZHC1-0 (SEQ ID NO: 30) vector. The sequence of the F9HZHC 1-1 insert is shown in SEQ ID NOS: 51 and 52.

F9HZLC 1-1 has four framework amino acids 30 substitutions which can influence CDR presentation. Two synthetic oligonucleotides were generated (SEQ ID NOS: 53 and 54), which when annealed, have *Kpn*I and *Bam*HI cohesive ends, and code for amino acids representing the 35 altered portion of the light chain variable region (SEQ ID NO: 55). F9HZLC 1-0 (SEQ ID NO: 43) was digested

WO 01/87339

PCT/US00/27438

with the restriction enzymes *Kpn*I and *Bam*HI and ligated to the synthetic DNA. The sequence of the F9HZLC 1-1 insert is shown in SEQ ID NOs: 56 and 57.

SB 249416

SB 249416 contains the heavy chain F9HZHC 1-1 (described above) (SEQ ID NO: 52) and the light chain F9HZLC 1-2. The light chain construct is based on F9HZLC 1-1, however, it has one additional framework amino acid substitution which can influence CDR presentation.

Two synthetic oligonucleotides were generated (SEQ ID NOs: 58 and 59), which when annealed, have *Bam*HI and *Xba*I cohesive ends and code for amino acids representing the altered portion of the light chain variable region (SEQ ID NO: 60). F9HZLC 1-1 (SEQ ID NO: 56) vector was digested with the restriction enzymes *Bam*HI and *Xba*I and ligated to the synthetic DNA. The sequence of the F9HZLC 1-2 insert is shown in SEQ ID NOs: 61 and 62.

SB 249417

SB 249417 contains the heavy chain F9HZHC 1-1 (described above) (SEQ ID NO: 52) and the light chain F9HZLC 2-0. A F9HZLC 2-0 synthetic variable region humanized light chain was designed using the framework regions of the human light chain obtained from immunoglobulin RE1 (Palm and Hilschmann, *Z. Physiol. Chem.* 354, 1651-1654 (1973) identified in the Kabat database as Kabpro: HKL111) and the BC2 light chain CDRs described previously. Five amino acid consensus human substitutions were introduced. Six framework amino acids murine substitutions which can influence CDR presentation were made. Two overlapping synthetic oligonucleotides were generated (SEQ ID NOs: 63 and 64) which, when annealed and extended, code for amino acids representing the light chain variable region (SEQ ID NOs: 65 and 66). This synthetic gene was then amplified using PCR primers (SEQ ID NOs: 67 and 68), ligated into

WO 01/87339

PCT/US00/27438

the pCR2000 vector (TA cloning Kit, Invitrogen, Cat. No. K2000-01) and isolated from a *Scal*I, *Sac*II restriction digest. A second DNA fragment coding for the campath signal sequence including the first two amino acids of 5 the variable region (SEQ ID NO: 38) was made by PCR amplification of the the appropriate region of a construct encoding a humanized anti-Respiratory Syncitial Virus heavy chain (SEQ ID NO: 25) with two primers (SEQ ID NOS: 26 and 69) and digesting with the 10 restriction enzymes *Eco*RI and *Scal*I. A third DNA fragment encoding the remainder of a human framework 4 (SEQ ID NO: 70) and having *Sac*II and *Nar*I cohesive ends was generated by annealing two synthetic oligonucleotides (SEQ ID NOS: 71 and 72). F9HZLC 1-0 15 (SEQ ID NO: 43) was digested with the restriction enzymes *Eco*RI and *Nar*I and ligated to the three DNA fragments. The sequence of the F9HZLC 2-0 insert is shown in SEQ ID NOS: 73 and 74.

SB 257731

20 SB 257731 contains the heavy chain F9HZHC 1-1 (SEQ ID NO: 52) and the light chain F9HZLC 1-3, a single amino acid mutation of F9HZLC 1-2 (SEQ ID NO: 62). F9HZLC 1-2 was PCR amplified with two primers (SEQ ID NOS: 26 and 69) and digested with the restriction 25 enzymes *Eco*RI and *Scal*I. A 94 bp fragment (SEQ ID NOS: 75 and 76) was isolated. The fragment was ligated into *Eco*RI, *Scal*I digested F9HZLC 1-2 vector to produce the light chain construct F9HZLC 1-3. The sequence of the F9HZLC 1-3 insert is shown in SEQ ID NOS: 77 and 78.

30 **SB 257732**

SB 257732 contains the synthetic variable region humanized heavy chain F9HZHC 3-0 and light chain F9HZLC 3-0. Four overlapping synthetic oligonucleotides were generated (SEQ ID NOS: 79, 80, 81 and 82) which, when 35 annealed and extended, code for the amino acids representing the heavy chain variable region being

WO 01/87339

PCT/US00/27438

altered (SEQ ID NOS: 83 and 84). This synthetic gene was then amplified using PCR primers (SEQ ID NOS: 85 and 86), ligated into the pCR2000 vector (TA cloning Kit, Invitrogen, Cat. No. K2000-01) and isolated from a *Stu*I, 5 *Kpn*I restriction digest. The isolated fragment was ligated into *Stu*I, *Kpn*I digested F9HZHC1-1 (SEQ ID NO: 52) vector. This vector was then digested with *Eco*RI, *Spe*I to remove the signal sequence. A DNA fragment coding for the campath signal sequence (SEQ ID NO: 23) 10 including the first five amino acids of the variable region was made by PCR amplification of F9HZHC1-0 with two primers (SEQ ID NOS: 26 and 87) and digesting with the restriction enzymes *Eco*RI and *Spe*I. The fragment generated was ligated into the vector. The sequence of 15 the F9HZHC3-0 insert is shown in SEQ ID NOS: 88 and 89. Four overlapping synthetic oligonucleotides were generated (SEQ ID NOS: 90, 91, 92 and 93) which, when annealed and extended, code for amino acids representing the light chain variable region (SEQ ID NOS: 94 and 95). 20 This synthetic gene was then amplified using PCR primers (SEQ ID NOS: 96 and 97) and ligated into the pCR2000 vector (TA cloning Kit, Invitrogen, Cat. No. K2000-01), and isolated from a *Scal*I, *Nar*I restriction digest. The isolated fragment was ligated into *Scal*I, *Nar*I digested 25 F9HZLC1-3 (SEQ ID NO: 77) vector. The sequence of the F9HZLC3-0 insert is shown in SEQ ID NOS: 98 and 99. The humanized anti-Factor IX mAbs were expressed in 30 CHO cells. A DG-44 cell line adapted for suspension growth in serum-free medium was grown in 100ml of protein-free medium containing 1X nucleosides and 0.05% F68 in 250 ml disposable sterile erlenmeyer flasks (Corning) on a Innova 2100 platform shaker (New Brunswick Scientific) at 150 rpm at 37°C in a 5% CO₂, 95% air humidified incubator. These cells were passaged at 35 4 X 10³ cells/ml twice weekly. 15 ug each of the pCN-Lc-Light Chain and pCD-Hc-heavy chain vectors were

WO 01/87339

PCT/US00/27438

linearized by digestion with *Not*1, co-precipitated under sterile conditions and resuspended in 50ul of 1X TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.5). The DNA was electroporated using a Bio-Rad Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories) into the Acc-098 cells using the technique of Hensley et al. in *J. Biol. Chem.* 269, 23949-23958 (1994). 1.2 $\times 10^7$ cells were washed once in 12.5 ml of ice cold PBS_C (PBS, 272mM sucrose, 7mM sodium phosphate pH 7.4, 1mM MgCl₂), resuspended in 0.8 ml of PBS, added to 50ul of the DNA solution and incubated on ice for 15 min. The cells were pulsed at 380 V and 25 microfarads, then incubated on ice for 10 min. Cells were plated into 96 well culture plates at 5 $\times 10^5$ cells/plate in maintenance medium for 24 hr prior to selection. Cells were selected for resistance to 400ug/ml G418 (Geneticin, Life Technologies, Inc.) in maintenance medium. 24 hr prior to assay, the cells were fed with 150ul of the maintenance medium.

Conditioned medium from individual colonies was assayed using an electrochemiluminescence (ECL) detection method on an Origen analyzer (IGEN, Inc.). See Yang et al., *Biotechnology*, 12, 193-194 (1994).

All solutions necessary for the performance of the assays (assay buffer) and for the operation of the analyzer (cell cleaner) were obtained from IGEN. The antibodies (anti-human IgG (g-chain specific), Sigma Chemicals and F(ab')₂ Fragment to Human IgG (H+L), Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) were labelled with TAG-NHS-ester (IGEN, Inc.) at a 7:1 molar ratio of TAG:protein, while the Protein A (Sigma) was labelled with Biotin-LC-Sulfo-NHS-ester (IGEN, Inc.) at a 20:1 molar ratio Biotin:protein, both according to IGEN's recommendations. Streptavidin-coated magnetic beads (M-280) were obtained from Dynal.

Immunoassays were performed using the following protocol: per sample, 50ul of the Streptavidin-coated

WO 01/87339

PCT/US00/27438

beads (final concentration 600 ug/ml diluted in PBS, pH7.8, with 1.25% Tween) were mixed with 50ul Biotin-Protein A (final concentration 1ug/diluted in PBS, pH7.8, with 1.25% Tween) and incubated at room temperature for 15min with agitation, 50ul of the TAG antibodies (a mixture with a final concentration of 1.25 ug/ml F(ab'), Fragment to Human IgG (H+L) and 0.25 ug/ml Anti-Human IgG (g-chain specific) diluted in PBS, pH7.8, with 1.25% Tween) were added, the solution was then added to 50ul of conditioned medium and incubated with agitation at room temperature for 1 hr. 200ul of assay buffer was added to the reaction mix and the sample analyzed on the Origen I analyzer to measure ECL. The results indicated that approximately 20-37% of the colonies assayed secrete over 15 ng/ml of the antibody with an average expression of about 150 ng/ml.

Humanized anti-Factor IX mAbs were purified from the conditioned media using a Procep A capture step followed by ion-exchange chromatography to reduce the DNA burden. Procep A sorbent material (Bioprocessing Ltd., Durham, England) was used to prepare a column with a 1:1 diameter to height ratio. Clarified conditioned media was loaded onto the column at about 150 cm/hr. The column was washed sequentially with phosphate buffered saline (PBS), PBS containing 1 M NaCl, and finally with PBS. The bound material was recovered with 0.1 M acetic acid elution. The eluate was adjusted to pH 5.5 and was diluted (1:4) with water. The diluted solution was loaded onto an S-Sepharose column (2.5 x 13 cm) which was pre-equilibrated with 20 mM sodium acetate, pH 5.5 at 80 cm/hr. The column was washed with the acetate buffer until a steady baseline was obtained and the bound protein was eluted with 20 mM sodium phosphate, pH 7.4 at 25 cm/hr. The eluted material was filtered with a 0.4 micron membrane and stored at 4°C.

Example 7Mouse-Human Chimeric Antibody

100 ng of BC2 RNA were reverse transcribed with a RT-PCR kit per the manufacturer's instructions 5 (Boehringer Mannheim Cat. No. 1483-188) using a dT oligo for priming, and PCR amplified with synthetic *Sca*I (SEQ ID NO: 100) and *Nar*I (SEQ ID NO: 101) primers to produce the BC2 light chain variable region with *Sca*I, *Nar*I ends (SEQ ID NOS: 102 and 103). This DNA was ligated into 10 *Sca*I, *Nar*I digested F9HZHC1-3 (SEQ ID 77) and digested with *Sca*I, *Nar*I to produce a mouse-human chimeric light chain F9CHLC (SEQ ID NOS: 104 and 105).

100 ng of BC2 RNA were reverse transcribed with a RT-PCR kit per the manufacturer's instructions 15 (Boehringer Mannheim Cat. No. 1483-188) using a dT oligo for priming, and PCR amplified with synthetic *Spe*I (SEQ ID NO: 106) and *Nhe*I (SEQ ID NO: 107) primers to produce the BC2 heavy chain variable region with *Spe*I, *Nhe*I ends (SEQ ID NOS: 108 and 109). The campath signal sequence 20 was PCR amplified from the RSVHZ19 heavy chain (SEQ ID NO: 25) with *Eco*RI (SEQ ID 26) and *Spe*I (SEQ ID 87) primers. These two DNA fragments were ligated into a *Eco*RI, *Nhe*I digested IL4CHHCpcd vector described in published International Patent Application No. 25 WO95/07301, replacing the IL4 variable region with the BC2 Factor IX mouse variable region, to produce a mouse-human chimeric heavy chain F9CHHC (SEQ ID Nos: 110 and 111).

Co-transfection and purification of the mouse-human 30 chimeric antibody $\text{ch}\alpha\text{FIX}$ was accomplished as described above for the humanized constructs.

Example 8Efficacy of humanized Factor IX mAbs in Rat ThrombusModel

5 In order to evaluate the efficacy of humanized anti-Factor IX antibodies in prevention of arterial thrombosis, the rat carotid artery thrombosis model as described above in Example 3 was used. Baseline parameters were established for carotid blood flow, arterial pressure, heart rate, vessel patency and 10 activated partial thromboplastin time (aPTT). Fifteen minutes thereafter, carotid injury was effected for 10 minutes. The parameters were determined 60 minutes after onset of carotid injury. Carotid thrombus was also extracted from the carotid artery and weighed.

15 All agents were administered intravenously 15 minutes before the onset of carotid injury. The following treatments were examined and compared to the anti-Factor IX mAb BC2.

1. Vehicle
- 20 2. ch α FIX: 3 mg/kg bolus
3. SB 249413: 3 mg/kg bolus
4. SB 249415: 3 mg/kg bolus
5. SB 249416: 3 mg/kg bolus
6. SB 249417: 3 mg/kg bolus
- 25 7. SB 257731: 3 mg/kg bolus
8. Heparin: 60 units/kg bolus + 2 units/kg/min infusion

The aPTT was used as the primary criterion for 30 evaluation of efficacy versus bleeding liabilities of the anti-coagulant/thrombotic agents used in the study. The results in Fig. 8 demonstrate that the humanized Factor IX mAbs SB 249413, SB 249415, SB 249416, SB 249417 and SB 257731 had a modest effect on aPTT at 3.0 35 mg/kg which is within the clinical accepted range.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

The effect of the Factor IX mAbs on thrombus mass is shown in Fig. 9. The results indicate that all of the humanized mAbs are equally effective in reducing thrombus mass.

5 The studies conducted in the rat carotid thrombosis model clearly demonstrate the efficacy of the humanized Factor IX mAbs in prevention of thrombosis in a highly thrombogenic arterial injury model. Most notably, the efficacy of all of the humanized Factor IX mAbs was
10 demonstrated within the desired therapeutic anticoagulant target defined by the aPTT.

Example 9

Antibody Biochemical and Biophysical Properties

15 The molecular mass of SB 249417 was determined by MALDI-MS to be 148,000Da. Analytical ultracentrifugation of SB 249417 gave an identical value. In the presence of Factor IX plus Ca^{2+} , the antibodies derived from BC 2 sedimented with a mass of 248,000Da corresponding to the
20 combined mass of the mAb and two molecules of Factor IX. No evidence of higher ordered aggregates was observed in the presence or absence of Factor IX.

The kinetics of Factor IX binding to SB 249417 was assessed by BIAcore analysis with antibody bound to an
25 immobilized protein A surface. Recombinant human Factor IX (rhFIX, Genetics Institute) at 49 nM was used and measurements performed in the presence of 5 mM Ca^{2+} . The interaction was characterized by rapid association, $k_{\text{ass}} = 2.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and relatively slow off-rate, $k_{\text{diss}} = 4.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. The calculated K_d for Factor IX binding was 1.9 nM.

30 Table 1 summarizes the biophysical properties of SB 249417.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

Table 1

Summary of the Biophysical Properties of SB 249417

5	Isotype	IgG1, kappa
10	Purity by SDS-PAGE	>95% (under reducing conditions)
15	Molecular Weight	
10	Mass Spectrometry	148,000 Da
	Analytical Ultracentrifugation	148,000 Da
15	Stoichiometry of Factor IX Binding	
	Isothermal Titration Calorimetry	1.5 moles Factor IX: 1 mole mAb
20	Factor IX Binding Affinity	
	Isothermal Titration Calorimetry	Kd= 4 nM at 25°C
	Biosensor	Kd= 2 nM
25	Factor IX Binding Kinetics	
	Biosensor	$k_{ass} = 2.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $k_{diss} = 4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
25	Table 2 summarizes the factor IX binding properties of mAbs of the present invention. The calculated dissociation constants were essentially identical within experimental error.	

Table 2

Kinetics of Factor IX Binding to Anti-Factor IX mAbs

mAb	<u>k_{ass} (M⁻¹s⁻¹)</u>	<u>k_{diss} (s⁻¹)</u>	<u>calc. K_D (nM)</u>
SB 249417	2.0 x10 ⁵	4.1x10 ⁻⁴	1.9
BC2	4.8x10 ⁵	9.1x10 ⁻⁴	1.9
Chf9	2.4 x10 ⁵	3.0x10 ⁻⁴	1.3
SB 249413	6.5 x10 ⁵	2.8x10 ⁻³	3.7-5.1
SB 249415	7.5 x10 ⁵	1.8x10 ⁻⁴	1.1-2.3
SB 249416	5.2 x10 ⁵	4.1x10 ⁻⁴	0.8
SB 257731	9.2 x10 ⁵	9.9x10 ⁻⁴	1.1
SB 257732	1.1 x10 ⁶	1.2x10 ⁻³	1.5

5

The interactions between rhFIX and SB 249417, BC2 and other humanized constructs were characterized by titration microcalorimetry, which measures binding interactions in solution from the intrinsic heat of binding. Nine injections of 106 uM FIX were made into the calorimeter containing 2 uM mAb SB 249417. Binding was detected in the first 4 injections as exothermic heats. At the last 5 injections the mAb binding sites were saturated with FIX and only background heats of mixing were observed. The results indicated that the equivalence point occurred at a molar binding ratio near 2 FIX per mAb, as expected. Nonlinear least squares analysis of the data yield the binding affinity.

The rhFIX affinities of the mAbs were measured over a range of temperature from 34-44°C in 10mM HEPES, 10mM CaCl₂, 150mM NaCl, pH 7.4. These data allow the affinity at 37°C to be determined directly and the affinity at 25°C to be calculated from the van't Hoff

WO 01/87339

PCT/US00/27438

equation. The data in Table 3 indicate that the affinities of SB 249417, BC2 and its other humanized constructs are within error (a factor of 2) the same.

Table 3

5 Titration Calorimetry Results for Anti-FIX mAbs

mAb	Kd, nM at 25°C	Kd, nM at 37°C	Molar Binding Ratio FIX/mAb
BC2	10	20	1.4
SB 249413	6	12	1.9
SB 249415	3	7	1.7
SB 249417	4	12	1.5
SB 257732	4	9	1.8

The mAbs SB 249413, SB 249415, SB 249417 and SB 257732 all exhibited very similar thermal stabilities by 10 differential scanning calorimetry. Their unfolding Tms ranged from 70-75°C indicating high stability against thermally induced denaturation.

Example 10

15 **Mechanism of Antibody-Mediated Inhibition of Factor IX**
 A library of chimeric constructs composed of sequences of Factor IX spliced into the framework of the homologous protein Factor VII was constructed and used to map the epitope for the Factor IX BC2 mAb. See
 20 Cheung *et al.*, *Thromb. Res.* 80, 419-427 (1995). Binding was measured using a BiaCore 2000 surface plasmon

WO 01/87339

PCT/US00/27438

resonance device. The BC2 antibody was coupled directly to the chip using the NHS/EDC reaction. Binding was measured by 2 min of contact time at 20uL/min with 200 nM of each of the given constructs in 25 mM MOPS, pH 5.4, 0.15 M NaCl, 5 mM CaCl₂. Dissociation was monitored for 3 min using the same buffer with no protein. No binding was detected to the wild type construct in the presence of 50 mM EDTA. The data are presented in Table 4.

10

Table 4

Summary of Binding of Factor IX Constructs to BC2 Antibody

Construct	Degree of Binding
Plasma IXa	Binds
r-IX	Binds
Plasma VII	No Binding
IX LC/VII HC	Binds
IX-A/VII	Binds
VII gla/IX	No Binding
VII-A/IX	No Binding
VII gla (IX 3-11)/IX	Binds
VII gla (IX 3-6)/IX	Very Low Binding
VII gla (IX 9-11)/IX	Very Low Binding
IX K5A	Binds

15 These data indicate that the constructs containing the Factor IX light chain and Factor VII heavy chain (IX LC/VII HC); the Factor IX gla and aromatic stack domains (IX-A/VII); residues 3-11 of Factor IX gla domain within

WO 01/87339

PCT/US00/27438

the Factor VII gla domain (VII gla (IX 3-11)/IX); and Factor IX having a lysine to alanine substitution at residue 5 (IX K5A) exhibit binding to BC2. The VII gla (IX 3-11)/IX construct exhibited BC2 binding equivalent to wild type Factor IX (plasma IXa and r-IX). Thus, the BC2 antibody binds to an epitope contained within residues 3-11 of the Factor IX gla domain.

Example 11

10 **Treatment of Arterial Thrombosis with Anti-Factor IX Antibody and Tissue Plasminogen Activator**

Administration of tPA with or without adjunctive therapies, was initiated following complete occlusion of the carotid artery. Blood flow in the artery was 15 continuously monitored.

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, Raleigh, NC) weighing 300-490 gm were anesthetized with sodium pentobarbital (55 mg/kg, i.p.). The rats were placed dorsal on a heated (37°C) surgical board and an incision 20 was made in the neck; the trachea was isolated and cannulated with a PE-240, Intramedic tube. The left carotid artery and jugular vein were then isolated. A Parafilm M sheet (4 mm², American National Can) was placed under the carotid artery and an electromagnetic 25 blood flow probe (Carolina Medical) was placed on the artery to measure blood flow. A cannula (Tygon, 0.02" x 0.04", Norton Performance Plastics) was inserted into the jugular vein for drug administration. The left femoral artery was then isolated and cannulated for 30 measurement of blood pressure and collection of blood samples.

Thrombosis in the carotid artery was initiated with a 6.5 mm diameter circular patch of glass micro-filter paper saturated with FeCl₃ solution (50%) placed on the 35 carotid artery downstream from the flow probe for 10 minutes as described in Example 3. In this well-

WO 01/87339

PCT/US00/27438

characterized model, thrombus formation is usually complete within 15 min.

The anti-Factor IX antibody, SB 249415 was administered as a bolus in combination with tPA (Genentech, South San Francisco, CA), while heparin (Elkins-Sinn Inc., Cherry Hill, NJ) was administered as a bolus followed by infusion. All drug infusions continued to the end of the experimental period - 60 minutes from the time of vessel occlusion. Blood samples, 1 mL, were collected for aPTT and PT assay at 0, 30 and 60 min (end of study) from the femoral artery into 3.8% citrate solution and centrifuged. aPTT and prothrombin time (PT) were monitored by a fibrometer (BB1L, Baxter Dade or MLA Electra 800 Automatic Coagulation Timer) with standard procedures. At the end of the experiment, the thrombus was extracted from the carotid artery and weighed.

All data are presented as mean group values \pm SEM for the indicated number of rats in each group. ANOVA and Bonferroni tests for multiple comparisons were used for between group analyses and a $p < 0.05$ accepted as significance.

Formation of an occlusive thrombus occurs approximately 15 min after initiation of arterial injury by application of the $FeCl_3$ treated patch to the rat carotid artery. As shown in Fig. 10, with tPA alone, reperfusion of the occluded vessel was only observed following administration of a dose of 9 mg/kg tPA with 67% of the treated vessels exhibiting regain of blood flow during the 60 min protocol. At this dose of tPA inclusion of 60 U/kg heparin or 3 mg/kg anti-Factor IX antibody, SB 249415, did not result in a further increase in the incidence of reperfusion suggesting that in the $FeCl_3$ injury model about 30% of the thrombi are refractory to lysis.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

The results in Fig. 10 indicate that, at lower doses of tPA, the incidence of reperfusion is significantly dependent upon which anticoagulant was co-administered with the thrombolytic. When 60 U/kg heparin was administered the percentage of vessels showing reperfusion decreased dramatically with only 12.5% and 40% reperfusion observed with 3 and 6 mg/kg tPA, respectively. Co-administration of 3 mg/kg SB 249415 with the tPA, however, achieved greater than 60% reperfusion with 3 mg/kg tPA and 79% reperfusion with the 6 mg/kg tPA dose. Thus, the anti-Factor IX antibody significantly shifts the thrombolytic dose response curve allowing reperfusion with lower doses of thrombolytic agent.

15 Thrombolysis and clot formation are dynamic processes and periods of patency followed by re-occlusion were sometimes observed. Since carotid blood flow was monitored continuously during the 60 min experimental protocol, it was also possible to quantitate 20 the total time of carotid patency. As shown in Fig. 11, the total period of vessel patency is substantially increased by combination of 3 mg/kg anti-Factor IX antibody plus tPA. This is particularly evident at the lowest and the intermediate doses of tPA, 3 and 6 mg/kg, 25 respectively. At a combined dose of 3 mg/kg SB 249415 plus 3 mg/kg tPA, the total patency time was 30.6 ± 9.2 min compared to 7.1 ± 7.1 min for the combination of 60 U/kg heparin plus 3 mg/kg tPA. Patency time was zero with 3 mg/kg tPA alone. With a dose of 6 mg/kg tPA, co- 30 administration with heparin increases patency time only slightly to 12.9 ± 6.0 min whereas the tPA-SB 249415 combination achieves maximal patency time of 38.7 ± 8.4 min. Only at the highest dose of tPA (9 mg/kg) does the heparin combination approach the patency achieved with 35 SB 249415, 31.9 ± 4.8 min and 38.0 ± 8.4 min, respectively.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

Rapid restoration of blood flow following arterial infarct is critical to minimizing damage to the ischemic tissue. The results in Fig. 12 indicate that the combination of anti-factor IX antibody with tPA resulted in decreased time to reperfusion compared to tPA alone or heparin plus tPA and that this is achieved with lower doses of tPA. When thrombolysis was effected with 3 mg/kg SB 249415 plus 3 mg/kg tPA the time to thrombolysis was 29.4 ± 9.2 min. With 3 mg/kg tPA, alone, no reperfusion was observed. With 60 U/kg heparin plus 3 mg/kg tPA the time to thrombolysis was 52.8 ± 7.1 min. At higher doses of tPA, 6 and 9 mg/kg, the antibody plus tPA treatment regimen achieved initial thrombolysis in 19.4 ± 6.3 and 20.8 ± 8.7 min, respectively. In the absence of added anticoagulant, the time to thrombolysis was 60 min (i.e., the limit of the experimental protocol) and 27.5 ± 6.4 min for doses of 6 and 9 mg/kg, respectively. With addition of 60 U/kg heparin, the corresponding times to thrombolysis were 44.0 ± 7.1 and 27.0 ± 4.9 min. Thus, earlier reperfusion was always achieved with SB 249415 than with heparin or with tPA alone.

Example 12

25 **Effect of Anti-Factor IX Antibody on Hemostatic Function**
The impact of anti-factor IX or heparin as adjunctive agents on the maintenance of hemostatic function was determined by monitoring levels of fibrinogen, plasminogen and alpha-2-antiplasmin at the 30 end of the treatment period in rats treated with tPA alone, tPA plus heparin and tPA plus SB 249415 and the results were compared to vehicle treated animals. As shown in Fig. 13, increasing doses of tPA resulted in decreased levels of each of the hemostatic markers 35 measured. Alpha-2-antiplasmin levels dropped from about 90% in animals not treated with tPA to about 20% as the

WO 01/87339

PCT/US00/27438

dose of tPA was increased to 9 mg/kg. Plasminogen levels dropped from an average of about 100% without tPA treatment to about 40% in the 9 mg/kg treatment group. Likewise, fibrinogen levels dropped from about 150 mg/dL to about 90 mg/dL in the high-dose tPA group. Interestingly, the selection of the adjunctive agent does not appear to significantly effect any of these markers. At each tPA dose, similar levels of alpha-2-antiplasmin, plasminogen and fibrinogen were observed in animals given vehicle, 30 or 60 U/kg heparin or 1 or 3 mg/kg SB 249415; the observed decrease in the hemostatic markers is only a function of dose of the thrombolytic agent, tPA, and these decreases, especially in the case of fibrinogen, appear to be particularly large with tPA doses greater than 6 mg/kg, i.e., in the 9 mg/kg high-dose group.

The effects of the different treatment regimens on the standard aPTT coagulation assay aPTT was also monitored (Fig. 14). With increasing doses of tPA the aPTT increased from 19.3s ± 0.6s to 30.0s ±1.6s for vehicle and 9 mg/kg tPA, respectively. Administration of 3 mg/kg SB 249415 produced a limited increase in the aPTT of control animals to 49.6 s ± 6.4 s. When SB 249415 was co-administered with tPA the observed increase was slightly larger and was dependent upon the dose of tPA. Combination of SB 249415 with 3 mg/kg tPA produced an aPTT of 58.3 s ±5.2 s whereas combination of SB 249415 with the 9 mg/kg dose of tPA increased the aPTT to 77.3 s ± 19.7 s. Administration of either the 30 U/kg or 60 U/kg dose of heparin resulted in large increases in the aPTT. Without tPA the aPTT ranged from about 300 s to 600 s for 30 and 60 U/kg doses, respectively. In tPA treated animals the aPTT was about 800 s.

The elevation of the aPTT obtained with heparin, particularly when coupled with the perturbation of

WO 01/87339

PCT/US00/27438

hemostatic parameters due to the need for high doses of tPA to achieve effective reperfusion, is likely to contribute to bleeding liabilities. Conversely, SB 249415 does not cause major elevation of the aPTT and 5 enables the use of lower doses of tPA providing significant advantage in thrombolytic therapy in myocardial infarction and stroke.

Example 13

10 **SB 249417 Enhances the Lytic Potential of Tissue**
 plasminogen Activator in Stroke

The rat thromboembolic stroke model utilized in these studies was essentially as described by Busch et al. in *Brain Research*, 778, 16-24 (1997). The three 15 principal steps of the model are preparation of emboli, preparation of the rat followed by embolization, and pharmacologic intervention.

Whole blood was withdrawn from a donor rat into a 20 citrated vacutainer tube. The citrated blood (500ul) was promptly added to a test tube containing 1 unit of human thrombin and 5ul of 1M CaCl₂ for a final CaCl₂ concentration of 10 mM. Within 5-10 seconds, a small 25 portion of this cocktail was drawn into an ~15cm length of PE50 catheter and allowed to clot at room temperature for 1 hour. At the end of the period, the tubular clot was extruded from the catheter into a saline-filled petri dish and cut into 1.5 mm length sections. Twelve 30 of these sections (clots) were transferred to a solution of saline containing 0.04mg/ml rat albumin and were drawn back into a PE50 catheter in a volume of ~60ul. The clots which were lined up head to tail in the catheter for embolization into the rat.

Male Sprague Dawley rats weighing 350-400g were 35 surgically prepared to receive a subcutaneous dose of atropine (0.5mg/kg) and were then anesthetized with 5% isoflurane followed by a maintenance dose of 2%. The

WO 01/87339

PCT/US00/27438

body temperature was kept between 37-38°C. Under aseptic conditions, a saggital midline incision was made in the cervical area, exposing the right common carotid artery (CCA), right internal carotid artery (ICA), right external carotid artery (ECA), and the pterygopalatine artery. The pterygopalatine artery was tied off. A length of the ECA was isolated then tied off and cut. The CCA and ICA were clamped and the PE50 catheter containing the emboli was inserted into the ECA stump and advanced to the bifurcation. The ICA clamp was removed and the emboli were slowly infused into the ICA while simultaneously unclamping the CCA. Infusion of either vehicle (saline), SB 249417 (2.0mg/kg) and/or t-PA (5.0mg/kg) was begun intravenously through a caudal vein 5 minutes post-embolization. SB 249417 was infused as a single bolus dose, whereas the t-PA dose of 5mg/kg was infused as a 10% bolus followed by the remaining 90% over 30 minutes. The surgical incision was closed and the rat was allowed to recover.

Twenty four hours post-embolization, rats were anesthetized and killed. The brain was removed and seven transverse cerebral sections were taken every 2mm from the frontal cerebral pole. The sections were incubated in 1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride for 20 minutes followed by formalin fixation. The stained cerebral sections were photographed and analyzed using an image analysis system (Optimus Inc., Bothell, Wash). The area of infarction in mm² was calculated by tracing the infarction on the computer screen by a blinded operator. The aggregate mean infarct for each treatment is shown in Fig. 15 (control (n=20), tPA (n=7) and SB 249417 (n=6)). Dosing rats post-embolus with tPA (5.0mg/kg) caused a reduction of ~33% in the resultant mean infarct volume. Administration of SB 249417 alone caused an ~70% reduction in the resulting infarct volumes. The combination of tPA (5.0mg/kg) and SB

WO 01/87339

PCT/US00/27438

249417 (2.0mg/kg) provided further protection, resulting in a reduction of ~88% in mean infarct volumes (P = 0.126). Infarcts in this model occurred with a similar frequency in the striatum and neocortex. Based upon the 5 location of the infarcted tissue, the most frequent site of occlusion appeared to be the middle cerebral artery (MCA). Although less frequent, the evidence suggested that the choroidal, anterior and posterior cerebral arteries were occasionally occluded as well. When 10 viewed by coronal section (data not shown), the majority of infarct volume reduction occurring on treatment was within the central MCA perfusion territory. The distribution of infarcted tissue did not change appreciably after the treatments.

15 The results indicate that an anti-Factor IX antibody such as SB 249417 when administered post-embolus can reduce the formation of infarcted brain tissue when used as a monotherapy or as an adjunct to a thrombolytic agent such as tPA. Anti-Factor IX 20 antibodies such as SB 249417 are expected to have clinical utility in the treatment of thromboembolic stroke either alone or as an adjunct to thrombolytic agents. Combination therapy would allow for a reduction in the amount of thrombolytic agent and a subsequent 25 reduction in the risk of promoting hemorrhagic stroke.

30 The present invention may be embodied in other specific forms without departing from the spirit or essential attributes thereof, and, accordingly, reference should be made to the appended claims, rather than to the foregoing specification, as indicating the scope of the invention.

CLAIMS

1. A method for treating an animal post-thromboembolic induced ischemia comprising administering an anti-Factor IX antibody or antibody fragment.
2. The method of claim 1 wherein the anti-Factor IX antibody or antibody fragment is administered post-embolus.
3. The method of claim 1 wherein the anti-Factor IX antibody or antibody fragment is administered post-stroke.
4. The method of claim 1 wherein the anti-Factor IX antibody or antibody fragment has the identifying characteristics of SB 249413, SB 249415, SB 249416, SB 249417, SB 257731 or SB 257732.
5. The method of claim 4 wherein the anti-Factor IX antibody or antibody fragment has the identifying characteristics of SB 249417.
6. A method for treating an animal post-thromboembolic induced ischemia comprising administering SB 249417.
7. A method for treating an animal post-thromboembolic induced ischemia comprising administering an anti-Factor IX antibody or antibody fragment in combination with a plasminogen activator.
8. The method of claim 7 wherein the anti-Factor IX antibody or antibody fragment and plasminogen activator are administered post-embolus.
9. The method of claim 7 wherein the anti-Factor IX antibody or antibody fragment and plasminogen activator are administered post-stroke.
10. The method of claim 7 wherein the anti-Factor IX antibody or antibody fragment has the identifying characteristics of SB 249413, SB 249415, SB 249416, SB 249417, SB 257731 or SB 257732.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

11. The method of claim 10 wherein the anti-Factor IX antibody or antibody fragment has the identifying characteristics of SB 249417.
12. The method of claim 7 wherein the thrombolytic agent is tPA, urokinase, streptokinase or variants thereof.
13. The method of claim 12 wherein the thrombolytic agent is tPA.
14. A method for treating an animal post-thromboembolic induced ischemia comprising administering SB 249417 in combination with tPA.
15. A method for reducing a required dose of a thrombolytic agent in treatment of an animal post-thromboembolic induced ischemia comprising administering an anti-Factor IX antibody or antibody fragment in combination with the thrombolytic agent.
16. The method of claim 15 wherein the anti-Factor IX antibody or antibody fragment has the identifying characteristics of SB 249413, SB 249415, SB 249416, SB 249417, SB 257731 or SB 257732.
17. The method of claim 16 wherein the anti-Factor IX antibody or antibody fragment has the identifying characteristics of SB 249417.
18. The method of claim 15 wherein the thrombolytic agent is tPA, urokinase, streptokinase or variants thereof.
19. The method of claim 18 wherein the thrombolytic agent is tPA.
20. A method for preventing thromboembolic stroke in an animal comprising administering an anti-Factor IX antibody or antibody fragment to an animal at risk for thromboembolic stroke.
21. The method of claim 20 wherein the anti-Factor IX antibody or antibody fragment has the identifying characteristics of SB 249413, SB 249415, SB 249416, SB 249417, SB 257731 or SB 257732.

WO 01/87339

PCT/US00/27438

22. The method of claim 20 wherein the anti-Factor IX antibody or antibody fragment has the identifying characteristics of SB 249417.

23. A method of preventing thromboembolic stroke in an animal comprising administering SB 249417 to an animal at risk for thromboembolic stroke.

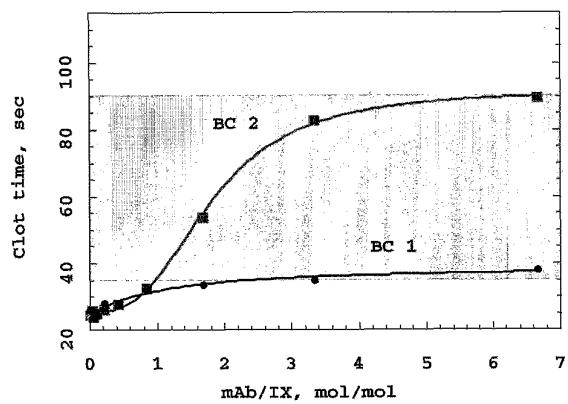


FIGURE 1

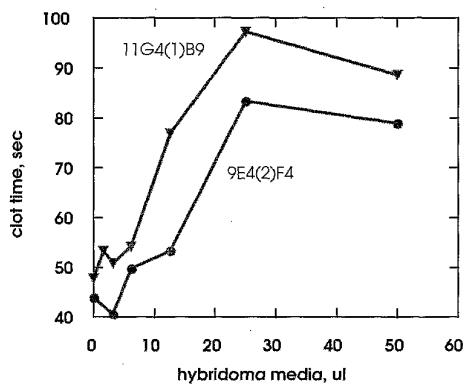


FIGURE 2

3/15

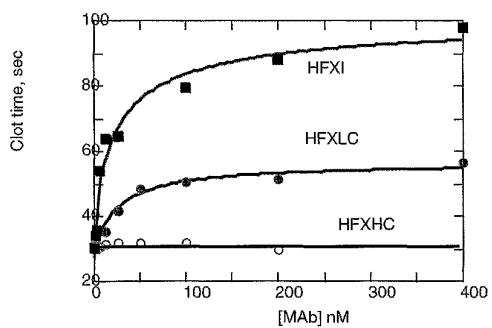


FIGURE 3

4/15

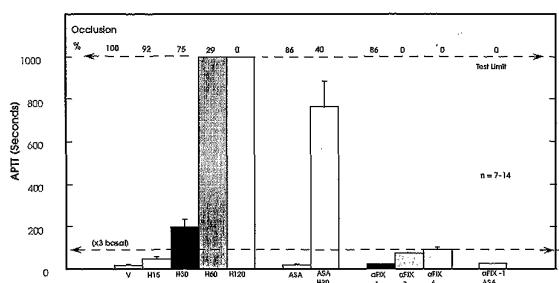


FIGURE 4

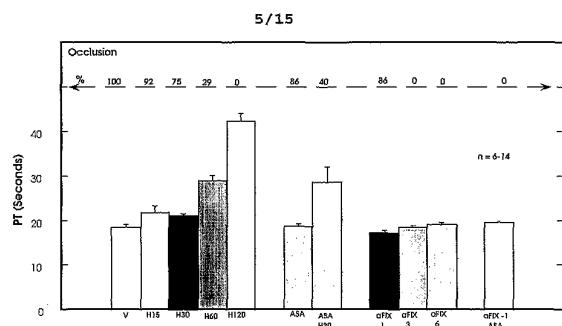


FIGURE 5

WO 01/87339

PCT/US00/27438

6/15

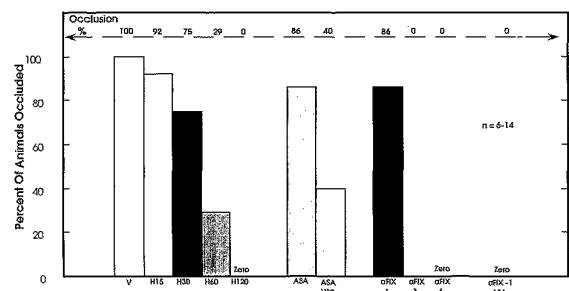


FIGURE 6

7/15

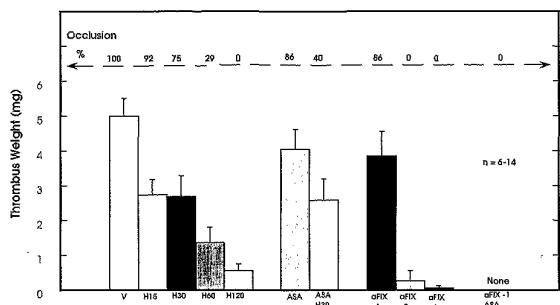


FIGURE 7

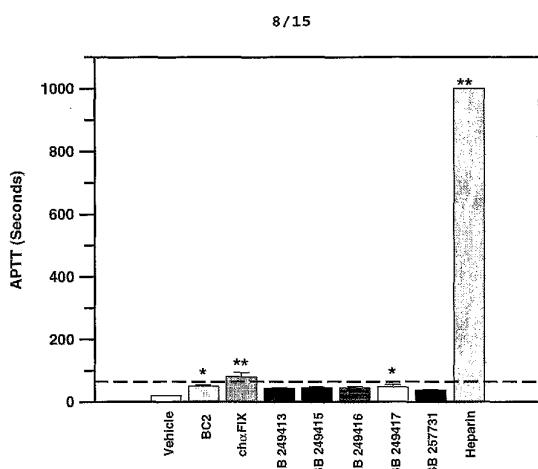


FIGURE 8

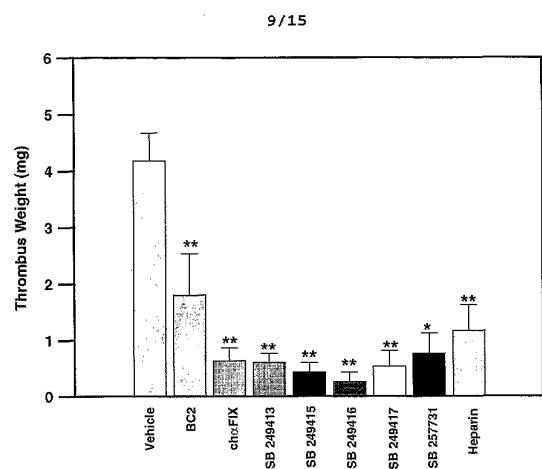


FIGURE 9

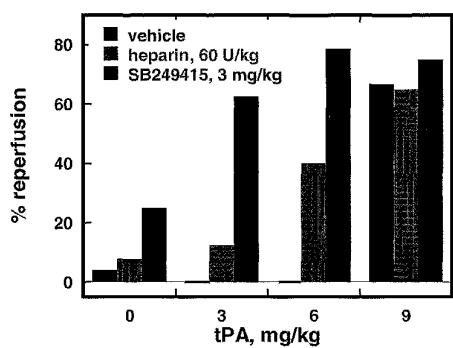


FIGURE 10

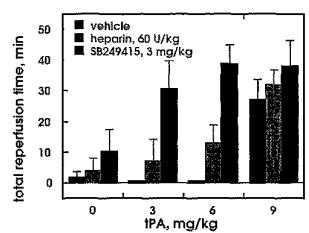


FIGURE 11

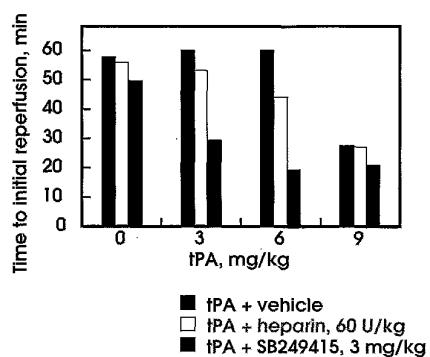


FIGURE 12

WO 01/87339

PCT/US00/27438

13/15

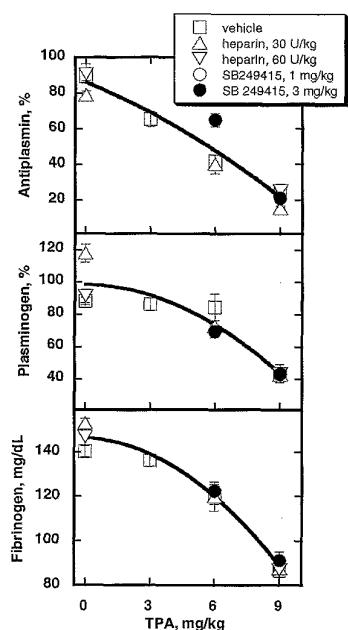
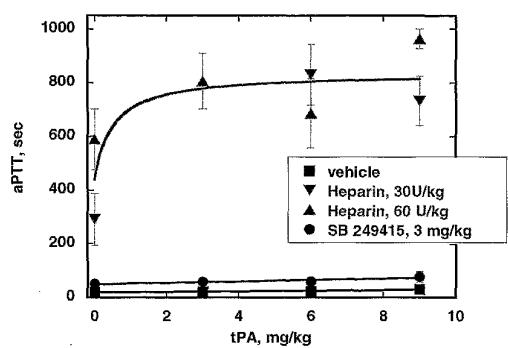
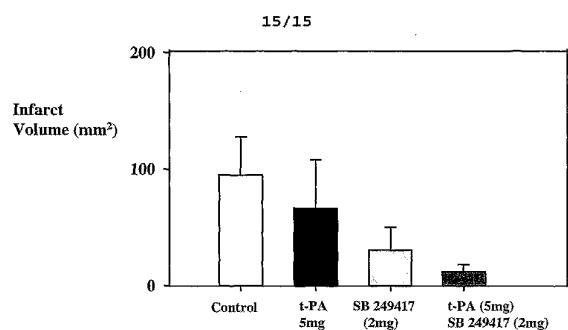


FIGURE 13



WO 01/87339

PCT/US00/27438



WO 01/87339

PCT/US00/27438

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION

- (i) APPLICANT: Blackburn, Michael
Feuerstein, Giora
Barone, Frank C.
Toomey, John R.
- (ii) TITLE OF INVENTION: ANTICOAGULANT AGENTS USEFUL IN
TREATMENT OF THROMBOSIS
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 111
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
(A) ADDRESSEE: Smithkline Beecham Corporation
(B) STREET: 709 Swedenland Road
(C) CITY: King of Prussia
(D) STATE: PA
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 19406
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Diskette
(B) COMPUTER: IBM Compatible
(C) OPERATING SYSTEM: DOS
(D) SOFTWARE: FastSEQ Version 1.5
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: unknown
(B) FILING DATE: herewith
(C) CLASSIFICATION:
- (vii) PRIOR APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: 09/571,434
(B) FILING DATE: 15-MAY-2000

- (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
(A) NAME: Baumeister, Kirk
(B) REGISTRATION NUMBER: 33,833
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: P50438-2

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
(A) TELEPHONE: 610-270-5096
(B) TELEFAX: 610-270-5090
(C) TELEX:

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

CATCCTAGAG TCACCGAGGA

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 21 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

AGCTGCCCAA AGTGCCCCAAG C

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

2/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 36 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

CTAACACTCA TTCCTGTTGA AGCTCTTGAC AATGGG

36

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 21 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

GATTTTCARG TGCAGATTT C

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 363 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

3/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

CAGATCCAGT TGGTGCAGTC TGGACCTGAG CTGAAGAACG CTGGAGAGAC AGTCAGATC	60
TCCTGCAAGG CTTCTGGTA CACCTTCACA AACTATGAA TGAACTGGT GAAGCAGGCT	120
CCAGGAAAGG GTTAACTG GATGGCTGG ATAAACACCA GAAATGGAAA GTCACATAT	180
GTGATGACT TCAGGGACG GTTGGCTTC TCITTTGGAAA GCTCTGGCAG CACIGCCAT	240
TTGAGATCG ACAACCTCAA AGATGAGGAC ACGGCTACAT ATTCTCTGTAC AAGAGAAGGG	300
ATATGGATG GTTACTTCCC TTCTTACTTAC TGGGGCCAAG GGACTCTGGT CACTGTCCT	360
GCA	363

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 321 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(iii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

CAAMTTGTTCTCTCCCCAGTC TCCAGCAATC CTGTCCTGCAT CTCCAGGGGA GAAGGGTCACA	60
ATGACTTGCA GGGCCAGCTC AAGTGTAAAT TACATGCACT GGTAACCCAGCA GAAGCCAGGA	120
TCCCTCCCCA AACCCCTGGAT TTAATGCCACA TCCAAACCTGG CTTCTGGAGAT CCTCTGCTCGC	180
TTCAGTGGCA GTGGGTCTGG GACCTCTTAC TCTCTCACAA TCAGCAGAGT GGAGGCTGAA	240
GATGCTGCCA CTTATTACTG CCAGCACTGG AGTATTAACC CACGGACGTT CGGTGGAGGC	300
ACCAAGCTGG AAATCAAACG G	321

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 121 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: internal
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

```

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Pro Gly Glu
 1          5          10          15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20         25          30
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35         40          45
Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe
 50         55          60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Asn
 65         70          75          80
Leu Gln Ile Asp Asn Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85         90          95
Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly
100        105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 5 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: internal
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

Asn Tyr Gly Met Asn

WO 01/87339

PCT/US00/27438

1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 17 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15
Gly

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 12 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

Glu Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 107 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE: internal
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 10 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE: internal
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 7 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(iii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 9 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(iii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 104 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

CAACTAGTGC AATCTGGGTC TGAGTTGAAG AAGCCTGGGG CCTCAGTGAA GGTTTCCCTGC 60
AAGGCCTCTG GATACACCTT CACTAACTAT GGAATGAACG GGGT 104

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 108 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

TTGAAGTCAT CAACATATGT TGACATTCGA TTTCTGGTGT TTATCCATCC CATCCACTCG 60
AGCCCTTGTC CAGGGGCCTG TCGCACCCAG TTCAATTCCAT AGTTAGTG 108

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 107 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

GTCAACATAT GTTGATGACT TCAAGGGCGG GTTTGTCCTTC CCTCTGTCAG CACGGCATAT	60
CTACAGATCA GCAGCCTAAA GGCTGACGAC ACTGCAGTGT ATTACTG	107

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 91 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

GGTACCCCTGG CCCCAGTAAG TAAAAGGGAA GTAACCATCC ATATTCCCTT CTCTCGCACA	60
GTAATACACT GCAGTGTGCGT CAGCCTTAG G	91

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 337 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:
 (ix) FEATURE:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

- (A) NAME/KEY: Coding Sequence
- (B) LOCATION: 2...337
- (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

A CTA GTG CAA TCT GGG TCT GAG TTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG	49
Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys	
1 5 10 15	
GTG TCC TGC AAG GCC TCT GGA TAC ACC TTC ACT AAC TAT GGA ATG AAC	97
Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn	
20 25 30	
TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTC GAG TGG ATG GGA TGG ATA	145
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile	
35 40 45	
AAC ACC AGA AAT GGA AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC AAG GGG CGG	193
Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe Lys Gly Arg	
50 55 60	
TTT GTC TTC TCC TTG GAC ACC TCT GTC AGC ACG GCA TAT CTA CAG ATC	241
Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile	
65 70 75 80	
AGC AGC CTA AAG GCT GAC GAC ACT GCA GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAA	289
Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu	
85 90 95	
GGG AAT ATG GAT GGT TAC TTC CCT TTT ACT TAC TGG GGC CAG GGT ACC	337
Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
100 105 110	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 112 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

WO 01/87339

PCT/US00/27438

- (ii) MOLECULE TYPE: protein
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: internal
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

```

Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
 1          5          10          15
Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
 20         25         30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile
 35         40         45
Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe Lys Gly Arg
 50         55         60
Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile
 65         70         75         80
Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu
 85         90         95
Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100        105        110

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 33 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

GCTACTAGTG CAATCTGGGT CTGAGTTGAA GCC

33

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 30 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

TGGGTACCCCT GGCCCCAGTA AGTAAAAAGGG

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 97 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Coding Sequence
 - (B) LOCATION: 27...95
 - (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

GAATTCTGAG CACACAGGAC CTCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe
1 5

53

WO 01/87339

PCT/US00/27438

TTG GTA GCA ACA GCA GGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTA GT 97
Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu
10 15 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 23 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Gln Val Gln Leu
20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:25:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 110 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:25:

GGAGACGCCA TCGAATTCTG ACCACACAGG ACCTCACCAT GGGATGGAGC TGTATCATCC	60
TCTCTTGGT AGCAACAGCT ACAGGTCTCC ACTCCCAAGGT CCAACTGAG	110

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:26:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:

GGAGACGCCA TCGAATTCTG A

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:27:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 30 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:27:

GATTGCACTA GTTGGACCTG GGAGTGGACA

30

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:28:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 77 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:28:

CTAGAGTGGG TCGCAGAGAT CTCTGATGGT GGTAGTTACA CCTACTATCC AGACACTGTG	60
ACGGGCGGT TCACGAT	77

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:29:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 73 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:29:

ATCGTGAACC GGCCCGTCAC AGTGTCTGGA TAGTAGGTGT AACTACCACC ATCAGAGATC	60
TCTCGGACCC ACT	73

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:30:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 363 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single

16/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence

(B) LOCATION: 1...363

(D) OTHER INFORMATION: F9HZHC 1-0

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:30:

CAG GTG CAA CTA GTG CAA TCT GGG TCT GAG TTG AAG AAG CCT GGG GCC	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCC TCT GGA TAC ACC TTC ACT AAC TAT	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	
20 25 30	
GGA ATG AAC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTC GAG TGG ATG	144
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
GGA TGG ATA AAC ACC AGA AAT GGA AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC	192
Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe	
50 55 60	
AAG GGA CGG TTT GTC TTC TTG GAC ACC TCT GTC AGC ACG GCA TAT	240
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
CTA CAG ATC AGC AGC CTA AAG GCT GAC GAC ACT GCA GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
GCG AGA GAA GGG AAT ATG GAT GGT TAC TTC CCT TTT ACT TAC TGG GGC	336
Ala Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly	
100 105 110	

WO 01/87339

PCT/US00/27438

CAG GGT ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

363

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:31:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 121 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(iii) MOLECULE TYPE: protein
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:31:

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:32:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 165 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

18/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:32:

AGTACTGACA CAGTCTCCAG CCACCCCTGTC	TTTGTCCTCCA GGGGAAAGAG CCACCCCTCTC	60
CTGCAGGGCC AGCTCAAGTG TAAATTACAT GCACCTGGTAC	CAACAGAGAC CTGGCCAGGC	120
TCCCAGGCTC CTCATCTATG CCACTAGTAA CCTGGCTTCT	GGCAT	165

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:33:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 146 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:33:

CGCGGGGTTA ATACTCCACT GCTGACAGATA AATAACCGCA AAATCTTCAG GCTCTAGACT	60
GCTGATGCG AGAGGTGAAAT CTGTCCTCCAGA CCCGGATCCA CTGAACTTGG CTGGGATGCC	120
AGAAGCCAGG TTACTAGTGG CATAGA	146

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:34:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 280 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:
 (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence
 (B) LOCATION: 2...280
 (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:34:

A	GTA	CTG	ACA	CAG	TCT	CCA	GCC	ACC	CTG	TCT	TTG	TCT	CCA	GGG	GAA	AGA	49
Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg		
1																15	
GCC	ACC	CTC	TCC	TGC	AGG	GCC	AGC	TCA	AGT	GTA	AAT	TAC	ATG	CAC	TGG	97	
Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Asn	Tyr	Met	His	Trp		
20																30	
TAC	CAA	CAG	AGA	CCT	GGC	CAG	GCT	CCC	AGG	CTC	CTC	ATC	TAT	GCC	ACT	145	
Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Ile	Tyr	Ala	Thr			
35																45	
AGT	AAC	CTG	GCT	TCT	GGC	ATC	CCA	GCC	AGG	TTC	AGT	GGA	TCC	GGG	TCT	193	
Ser	Asn	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser			
50																60	
GGG	ACA	GAT	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	AGC	AGT	CTA	GAG	CCT	GAA	GAT	TTT	241	
Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe		
65																75	
																80	
GGG	GTT	TAT	TAC	TGT	CAG	CAG	TGG	AGT	ATT	AAC	CCG	CGG				280	
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ile	Asn	Pro	Arg					
85																90	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:35:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 93 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

20/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: internal
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:35:

```

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
 1      5      10      15
Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His Trp
 20      25      30
Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Thr
 35      40      45
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 50      55      60
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe
 65      70      75      80
Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg
 85      90

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:36:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 27 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:36:

TCGAGTACTG ACACAGTCTC CAGCCAC

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:37:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 27 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single

21/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:37:

GACCGCGGGT TAATACTCCA CTGCTGA

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:38:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 94 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence
(B) LOCATION: 27...92
(D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:38:

GAATTCTGAG CACACAGGAC CTCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe
1 5TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC GAG ATA GTA CT 94
Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Glu Ile Val
10 15 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:39:

22/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 22 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE: internal
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:39:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Glu Ile Val
20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:40:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 30 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:40:

GACTGTGTCA GTACTATCTC GGAGTGGACA

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:41:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 55 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

23/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:41:

GGGCAGCCCTC CTAAGTTGCT CATTACTGG GCGTCGACTA GGGAAATCTGG GGTAC 55

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:42:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 51 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:42:

CCCAGATTCC CTAGTCGACG CCCACTAAAT GAGCAACTTA GGAGGCTGCC C 51

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:43:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 321 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(ix) FEATURE:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

- (A) NAME/KEY: Coding Sequence
- (B) LOCATION: 1...321
- (D) OTHER INFORMATION: F9HZLC1~0

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:43:

GAA ATA GTA CTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG	48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AAT TAC ATG	96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met	
20 25 30	
CAC TGG TAC CAA CAG AGA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT	144
His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr	
35 40 45	
GCC ACT AGT AAC CTG GCT TCT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGA TCC	192
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser	
50 55 60	
GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTA GAG CCT GAA	240
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu	
65 70 75 80	
GAT TTT GCG GTT TAT TAC TGT CAG CAG TGG AGT ATT AAC CCG CGG ACG	288
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr	
85 90 95	
TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA	321
Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg	
100 105	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:44:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 107 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: protein

WO 01/87339

PCT/US00/27438

- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: internal
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:44:

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1          5          10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
 20         25          30
His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35         40          45
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50         55          60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65         70          75          80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr
 85         90          95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100        105

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:45:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 134 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:45:

```

CCTGGACAAG GGCTCAAGTG GATGGGATGG ATAAACACCA GAAATGGAAA GTCAACATAT      60
GTTGAGTGACT TCAAGGGACG GTTTGTCCTTC TCTCTAGACT CCTCTGTCAG CACGGCATAT      120
CTACAGATCA GCAG                                134

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:46:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 134 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:46:

GGTACCCCTGG	CCCCAGTAAG	TAAAAGGGAA	GTAACCATCC	ATATTCCCTT	CTCTCGTACA	60
GTATAACACT	GCAGTGCTGT	CAGCCTTTAG	GCTGCTGATC	TGTAGATATG	CGGTGCTGAC	120
AGAGGAGTCT	AGAG					134

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:47:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 225 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:
 (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence
 (B) LOCATION: 1...225
 (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:47:

CCT	GGA	CAA	GGG	CTC	AAG	TGG	ATG	GGA	TGG	ATA	AAC	ACC	AGA	AAT	GGA	48
Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Lys	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Arg	Asn	Gly	
1				5			10			15						

WO 01/87339

PCT/US00/27438

AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GTC TTC TCT CTA	96	
Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu		
20	25	30
GAC TCC TCT GTC AGC ACG GCA TAT CTA CAG ATC AGC AGC CTA AAG GCT	144	
Asp Ser Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala		
35	40	45
GAC GAC ACT GCA GTG TAT TAC TGT ACG AGA GAA GGG AAT ATG GAT GGT	192	
Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly		
50	55	60
TAC TTC CCT TTT ACT TAC TGG GGC CAG GGT ACC	225	
Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
65	70	75

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:48:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 75 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:48:

Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly			
1	5	10	15
Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu			
20	25	30	
Asp Ser Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala			
35	40	45	
Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly			
50	55	60	
Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
65	70	75	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:49:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 27 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:49:

TTTCCCTGGAC AAGGGCTCAA GTGGGATG

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:50:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 24 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:50:

TTTGGTACCC TGGCCCCAGT AAGT

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:51:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 363 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

29/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
- (ix) FEATURE:
- (A) NAME/KEY: Coding Sequence
- (B) LOCATION: 1...363
- (D) OTHER INFORMATION: F9HZHC 1-1

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:51:

CAG GTG CAA CTA GTG CAA TCT GGG TCT GAG TTG AAG AAG CCT GGG GCC	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCC TCT GGA TAC ACC TTC ACT AAC TAT	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	
20 25 30	
GGA ATG AAC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTC AAG TGG ATG	144
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met	
35 40 45	
GGA TGG ATA AAC ACC AGA AAT GGA AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC	192
Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe	
50 55 60	
AAG GGA CGG TTT GTC TTC TCT CTA GAC TCC TCT GTC AGC ACG GCA TAT	240
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Ser Ser Val Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
CTA CAG ATC AGC CTA AAG GCT GAC GAC ACT GCA GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
ACG AGA GAA GGG AAT ATG GAT GGT TAC TTC CCT TTT ACT TAC TAC TGG GGC	336
Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly	
100 105 110	
CAG GGT ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA	363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

30/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:52:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 121 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE: internal
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:52:

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Ser Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:53:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 82 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:53:

CAACAGAGAC CTGGCCAGGC TCCCAAGCCC TGGATCTATG CCACGAGTAA CCTGGCTAGC	60
GGCGTCCAG CCAGGGTCAAG TG	82

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:54:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 90 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:54:

GATCCACTGA ACCTGGCTGG GACGCCGCTA GCCAGGTTAC TCGTGGCATA GATCCAGGGC	60
TTGGGAGCCT GCCCAGGTCT CTGTTGGTAC	90

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:55:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 27 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:55:

Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr	Ala	Thr	Ser
1				5				10				15			
Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser					
			20					25							

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:56:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 321 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) PERTINENCE: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding S

(B) LOCATION: 1...321

(D) OTHER INFORMATION: F8HZLG 1-1

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:56:

GAA ATA GTA CTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTC TCT TTG TCT CCA GGG 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AAT TAC AIG 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
 20 25 30

CAC TGG TAC CAA CAG AGA CCT GGC CAG GCT CCC AAG CCC TGG ATC TAT 144
 His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

```

GCC ACG AGT AAC CTG GCT AGC GGC GTC CCA GCC AGG TTC AGT GGA TCC 192
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
      50           55           60

```

WO 01/87339

PCT/US00/27438

GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTA GAG CCT GAA 240
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

GAT TTT GCG GTT TAT TAC TGT CAG CAG TGG AGT ATT AAC CCG CGG ACG 288
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr
 85 90 95

TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA 321
 Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:57:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 107 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:57:

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:58:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 41 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:58:

GATCCGGGTC TGGGACAGAT TACACTCTCA CGATATCCAG T

41

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:59:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 41 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:59:

CTAGACTGGA TATCGTGAGA GTGTAATCTG TCCCAGACCC G

41

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:60:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

35/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:60:

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:61:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 321 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence

(B) LOCATION: 1...321

(D) OTHER INFORMATION: P9HZLC 1-2

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:61:

GAA ATA GTA CTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

GAA AGA GCC ACC CTC TCC TSC AGG GCC AGC TCA ACT GTA AAT TAC ATG 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
 20 25 30

CAC TGG TAC CAA CAG AGA CCT GGC CAG GCT CCC AAG CCC TGG ATC TAT 144
 His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

WO 01/87339

PCT/US00/27438

GCC ACG AGT AAC CTG GCT AGC GGC GTC CCA GCC AGG TTC AGT GGA TCC	192
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser	
50	55
55	60
GGG TCT GGG ACA GAT TAC ACT CTC ACG ATA TCC AGT CTA GAG CCT GAA	240
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu	
65	70
75	80
GAT TTT GCG GTT TAT TAC TGT CAG CAG TGG AGT ATT AAC CCG CGG ACG	288
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr	
85	90
95	
TTC GCC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA	321
Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg	
100	105

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:62:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 107 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:62:

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met			
20	25	30	
His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr			
35	40	45	
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser			
50	55	60	
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu			
65	70	75	80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr			
85	90	95	

37/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:63:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 165 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:63:

AGTACTCACCA CAGAGCCCAA GCAGCCTGAG CGCCAGCGTG GGTGACAGAG TGACCAC	60
CTGCAAGGGCC AGCTCACTG TAAATTACAT GCACCTGGTAC CAGCAGAAGC CAGGTAAGGC	120
TCCAAGCCT TGGATCTACG CCACTAGTAA CCTGGCTTCT GGTGT	165

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:64:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 161 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:64:

CCGGGGGTTA ATACTCCACT GCTGGCAGTA GTAGGGGGG ATATCCTCTG GCTGGAGGCT	60
GCTGATGGTG AAGGTGTAGT CTGTACCGCT ACCGGATCCG CTGAATCTGC TTGGCACACC	120
AGAAGCCAGG TTACTAGTGG CCGAGATCCA AGGCTTTGGA G	161

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:65:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 280 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
- (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence

(B) LOCATION: 2...280

(D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:65:

A	GTA	CTC	ACC	CAG	AGC	CCA	AGC	AGC	CTG	AGC	GCC	AGC	GTG	GGT	GAC	AGA	49
Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg		
1	5				10			15									
GTG	ACC	ATC	ACC	TCC	AGG	GCC	AGC	TCA	AGT	GTA	ATT	TAC	ATG	CAC	TGG	97	
Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Asn	Tyr	Met	His	Trp		
20	25			30													
TAC	CAG	CAG	AAG	CCA	GGT	AAG	GCT	CCA	AAG	CCT	TGG	ATC	TAC	GCC	ACT	145	
Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr	Ala	Thr		
35		40		45													
AGT	AAC	CTG	GCT	TCT	GGT	GTG	CCA	AGC	AGA	TTC	AGC	GGA	TCC	GGT	AGC	193	
Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser		
50		55		60													
GGT	ACA	GAC	TAC	ACC	TTC	ACC	ATC	AGC	AGC	CTC	CAG	CCA	GAG	GAT	ATC	241	
Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile		
65		70		75			80										
GCC	ACC	TAC	TAC	TGC	CAG	CAG	TGG	AGT	ATT	AAC	CCG	CGG				280	
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ile	Asn	Pro	Arg					
85		90															

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:66:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 93 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE: internal
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:66:

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1 5 10 15
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His Trp
20 25 30
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr
35 40 45
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile
65 70 75 80
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg
85 90

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:67:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 27 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:67:

TTTAGTACTC ACCCAGAGCC CAAGCAG

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:68:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 27 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:68:

TTCGGCGGGT TAATACTCCA CTGGCTGG

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:69:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 33 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:69:

CTCGAGGAGT ACTATCTGGG AGTGGACACC TGT

33

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:70:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 17 amino acids

41/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(iii) MOLECULE TYPE: peptide
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:70:

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
1 5 10 15
Ala

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:71:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 48 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(iii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:71:

GGACGTTCGG CCAAGGGACC AAGGTGGAAA TCAAACGGAC TGTGGCGG 48

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:72:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 52 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(iii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO

42/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:72:

CGCCGCCACA GTCCGTTTGA TTTCCACCTT GGTCCCTTGG CCGAACGTCC GC 52

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:73:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 321 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence

(B) LOCATION: 1...321

(D) OTHER INFORMATION: F9HZLC 2-0

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:73:

CAG ATA GTA CTC ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG GGT 48

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AAT TAC ATG 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG CCT TGG ATC TAC 144
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45GCC ACT AGT AAC CTG GCT TCT GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGA TCC 192
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

WO 01/87339

PCT/US00/27438

50	55	60	
GGT AGC GGT ACA GAC TAC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG			240
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu			
65	70	75	80
GAT ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAG CAG TGG AGT ATT AAC CCG CGG ACG			288
Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr			
85	90	95	
TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG			321
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
100	105		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:74:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 107 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:74:

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Asp Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met			
20	25	30	
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr			
35	40	45	
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser			
50	55	60	
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu			
65	70	75	80
Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr			
85	90	95	
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
100	105		

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:75:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 94 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence

(B) LOCATION: 27...94

(D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:75:

GAATTCTGAG CACACAGGAC CTCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC	53
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe	
1	5
TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC CAG ATA GTA CT	94
Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Ile Val Leu	
10	15
	20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:76:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 23 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:76:

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly
1				5				10				15			
Val	His	Ser	Gln	Ile	Val	Leu									
				20											

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:77:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 401 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence

(B) LOCATION: 27...401

(D) OTHER INFORMATION: F9HZLC 1-3

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:77:

GAATTCTGAG	CACACAGGAC	CTCACCC	ATG	GGA	TGG	AGC	TGT	ATC	ATC	CTC	TTC	53				
			1		5											
TTG	GTA	GCA	ACA	GCT	ACA	GGT	GTC	CAC	TCC	CAG	ATA	GTA	CTG	ACA	CAG	101
Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	Val	His	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	
10	15			20						25						
TCT	CCA	GCC	ACC	CTG	TCT	TTG	TCT	CCA	GGG	GAA	AGA	GCC	ACC	CTC	TCC	149
Ser	Pro	Ala	Thr	Ileu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	
30	35					40										
TGC	AGG	GCC	AGC	TCA	AGT	GTA	AAT	TAC	ATG	CAC	TGG	TAC	CAA	CAG	AGA	197

WO 01/87339

PCT/US00/27438

Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Arg			
45	50	55	
CCT GCC CAG GCT CCC AAG CCC TGG ATC TAT GCC ACG AGT AAC CTC GCT			245
Pro Gly Gln Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala			
60	65	70	
AGC GGC GTC CCA GCC AGG TTC AGT GGA TCC GGG TCT GGG ACA GAT TAC			293
Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr			
75	80	85	
ACT CTC ACG ATA TCC AGT CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCG GTT TAT TAC			341
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr			
90	95	100	105
TGT CAG CAG TGG AGT ATT AAC CCG CGG ACG TTC GGC GGA GGG ACC AAG			389
Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys			
110	115	120	
GTG GAG ATC AAA			401
Val Glu Ile Lys			
125			

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:78:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 125 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:78:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly				
1	5	10	15	
Val His Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu				
20	25	30		
Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val				

47/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

35	40	45
Asn Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Lys Pro		
50	55	60
Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe		
65	70	75
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu		
85	90	95
Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn		
100	105	110
Pro Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
115	120	125

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:79:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 81 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:79:

AGGCCCTCTGG ATACACCTTC ACTAACTATG GAATGAACTG GGTGCGACAG CCCCTGGAC	60
AAGGGCTCGA GTGGATGGGA T	81

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:80:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 99 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:80:

TGTCTAGAGA GAAGACAAAC CGTCCCTTGA AGTCATCAAC ATATGTTGAC TTTCCATTTC	60
TGGTGTATAT CCATCCATC CACTCGAGCC CTTGTCCAG	99

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:81:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 87 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:81:

GGTTTGTCTT CTCTCTAGAC ACCTCTGTCA GCACGGCATA TCTACAGATC AGCAGCCTAA	60
AGGCTGAGGA CACTGAGTG TATTTCT	87

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:82:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 86 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:82:

GATACCCCTGG CCCCAGTAAG TAAAAGGGAA GTAACCATCC ATATTCCCTT CTCTCGTACA	60
GAAATACACT GCAGTGCTT CAGCCT	86

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:83:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 278 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(iii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence

(B) LOCATION: 3...278

(D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:83:

AG GCC TCT GGA TAC ACC TTC ACT AAC TAT GGA ATG AAC TGG GTG CGA	47
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg	
1 5 10 15	

CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTC GAG TGG ATG GGA TGG ATA AAC ACC AGA	95
Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Arg	
20 25 30	

AAT GGA AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GTC TTC	143
Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Val Phe	
35 40 45	

TCT CTA GAC ACC TCT GTC AGC ACG GCA TAT CTA CAG ATC AGC AGC CTA	191
Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu	
50 55 60	

AAG GCT GAG GAC ACT GCA GTG TAT TTC TGT ACG AGA GAA GGG AAT ATG	239
Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Glu Gly Asn Met	
65 70 75	

GAT GGT TAC TTC CCT TTT ACT TAC TGG GGC CAG GGT ACC	278
Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	

50/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

80 85 90

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:84:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 92 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(iii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:84:

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln
1 5 10 15
Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn
20 25 30
Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser
35 40 45
Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys
50 55 60
Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp
65 70 75 80
Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
85 90

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:85:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 30 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(iii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:85:

AGGCCTCTGG ATACACCTTC ACTAACTATG

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:85:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:86:

GGTACCCCTGG CCCCAGTAAG TAAAAG

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:86:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 37 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:87:

CCAGACTCGA CTAGTTGGAT CTGGGAGTGG ACACCTG

37

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:87:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

52/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(A) LENGTH: 446 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:
 (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Coding Sequence
 (B) LOCATION: 27...446
 (D) OTHER INFORMATION: F9HZHC 3-0

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:88:

GAATTCTGAG CACACAGGAC CTCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC	53		
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe			
1	5		
TTG GTA GCA ACA GCA GGT GTC CAC TCC CAG ATC CAA CTA GTG CAA	101		
Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln			
10	15	20	25
TCT GGG TCT GAG TTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC	149		
Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys			
30	35	40	
AAG GCC TCT GGA TAC ACC TTC ACT AAC TAT GGA ATG AAC TGG GTG CGA	197		
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg			
45	50	55	
CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTC GAG TGG ATG GGA TGG ATA AAC ACC AGA	245		
Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Arg			
60	65	70	
AAT GGA AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GTC TTC	293		
Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Val Phe			
75	80	85	
TCT CTA GAC ACC TCT GTC AGC ACG GCA TAT CTA CAG ATC AGC AGC CTA	341		

53/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	
90																105
AAG GCT GAG GAC ACT GCA GTG TAT TTC TGT ACG AGA GAA GGG AAT ATG															389	
Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Thr	Arg	Glu	Gly	Asn	Met	
110																120
GAT GGT TAC TTC CCT TTT ACT TAC TGG GGC CAG GGT ACC CTG GTC ACC															437	
Asp	Gly	Tyr	Phe	Pro	Phe	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
125																135
GTC TCC TCT															446	
Val	Ser	Ser														
140																

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:89:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 140 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:89:

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	
1																15
Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys																
																20
																25
																30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe																
																35
																40
																45
Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu																
																50
																55
																60
Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn GLY Lys Ser Thr Tyr Val																
																65
																70
																75
Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser																
																85
																90
																95
Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val																

WO 01/87339

PCT/US00/27438

100	105	110
Tyr Phe Cys Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly	Tyr Phe Pro Phe Thr	
115	120	125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
130	135	140

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:90:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 90 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:90:

AGTACTGACA CAGTCTCCAT CCTCCCTGTC TGCACTCTGTT GGGGACAGAG TCACCAC	60
TTGCAGGGCC AGCTCAAGTG TAAATTACAT	90

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:91:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 108 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:91:

CTTGATGGGA CGCCGCTAGC CAGGTACTC GTGGCATAGA TCCAGGGCTT GGGAGCTTTG	60
CCAGGTTCT GTGGTACCA GTGCACTAA TTTACACTTG AGCTGGCC	108

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:92:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 108 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:92:

TAACCTGGCT AGCGCCGTCC CATCAAGGTT CAGTGGATCC GGGTCTGGGA CAGATTACAC	60
TCTCACGATA TCCAGTCTAC AACCTGAGA TTTTGCGACT TATTACTG	108

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:93:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 102 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:93:

GGCGCCGCGCA CAGTCGTTT GATCTCCAGC TTGGTCCCTC CGCGGAACGT CGCGGGTTA	60
ATACTCCACT GCTGACAGTA ATAAGTCGCA AAATCTTCAG GT	102

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:94:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 330 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:
 (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence
 (B) LOCATION: 2...328
 (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:94:

A	GTA	CTG	ACA	CAG	TCT	CCA	TCC	CTG	TCT	GCA	TCT	GTT	GGG	GAC	AGA	49
Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	
1	5	10						15								
GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	AGG	GCC	AGC	TCA	AGT	GTA	AAT	TAC	ATG	CAC	TGG	97
Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Val	Asn	Tyr	Met	His	Trp		
20	25	30														
TAC	CAA	CAG	AAA	CCT	GGC	AAA	GCT	CCC	AAG	CCC	TGG	ATC	TAT	GCC	ACG	145
Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr	Ala	Thr	
35	40	45														
AGT	AAC	CTG	GCT	AGC	GTC	CCA	TCA	AGG	TTC	AGT	GGA	TCC	GGG	TCT	193	
Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Pro	Phe	Ser	Gly	Ser		
50	55	60														
GGG	ACA	GAT	TAC	ACT	CTC	ACG	ATA	TCC	AGT	CTA	CAA	CCT	GAA	GAT	TTT	241
Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	
65	70	75														
GCG	ACT	TAT	TAC	TGT	CAG	CAG	TGG	ACT	ATT	AAC	CCG	GGG	ACG	TTC	GCC	289
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ile	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	
85	90	95														
GGA	GGG	ACC	AAG	CTG	GAG	ATC	AAA	CGA	ACT	GTG	GCG	GCG	CC		330	
Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala				
100																

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:95:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 109 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:95:

```

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 1           5           10           15
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His Trp
 20          25          30
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr
 35          40          45
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 50          55          60
Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe
 65          70          75          80
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr Phe Gly
 85          90          95
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100         105

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:96:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 26 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:96:

CAAGTACTGA CACAGTCTCC ATCCCTC

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:97:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:97:

AGGGCGCCGC CACAGTTCGT TTGATC

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:98:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 412 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence

(B) LOCATION: 27...412

(D) OTHER INFORMATION: F9HZLC 3-0

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:98:

GAATTCTGAG CACACAGGAC CTCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTG	53
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe	
1 5	
TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC CAG ATA GTA CTG ACA CAG	101
Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln	
10 15 20 25	
TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTT GGG GAC AGA GTC ACC ATC ACT	149
Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr	
30 35 40	
TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AAT TAC ATG CAC TGG TAC CAA CAG AAA	197
Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys	
45 50 55	
CCT GGC AAA GCT CCC AAG CCC TGG ATC TAT GCC ACG AGT AAC CTG GCT	245
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala	
60 65 70	
AGC GGC GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGA TCC GGG TCT GGG ACA GAT TAC	293
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr	
75 80 85	
ACT CTC ACG ATA TCC AGT CTA CAA CCT GAA GAT TTT GCG ACT DAT TAC	341
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr	
90 95 100 105	
TGT CAG CAG TGG AGT ATT AAC CCG CGG ACG TTC GGC GGA GGG ACC AAG	389
Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys	
110 115 120	
CTG GAG ATC AAA CGA ACT GTG GC	412
Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Val	
125	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:99:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 129 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: protein
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: internal
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:99:

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1      5      10      15
Val His Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 20      25      30
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val
 35      40      45
Asn Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
 50      55      60
Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 65      70      75      80
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 85      90      95
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn
100      105      110
Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
115      120      125
Val

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:100:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:100:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

CAAAATAGTAC TCTCCCCAGTC TCCAGC

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:101:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 41 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:101:

GGATAAGCTT GGCGCCGCAA CAGTCGGTTT GATTTCCAGC T

41

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:102:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 335 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTISENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE:
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence
(B) LOCATION: 1...335
(D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:102:

CAG ATA GTA CTC TCC CAG TCT CCA GCA ATC CTG TCT GCA TCT CCA GGG
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

48

62/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

1	5	10	15													
GAG	AAG	GTC	ACA	ATG	ACT	TGC	AGG	GCC	AGC	TCA	AGT	GTA	AAT	TAC	ATG	96
Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Asn	Tyr	Met	
20				25											30	
CAC	TGG	TAC	CAG	AAG	CCA	GGG	TCC	TCC	CCC	AAA	CCC	TGG	ATT	TAT	144	
His																
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr		
35				40											45	
GCC	ACA	TCC	AAC	CTG	GCT	TCT	GGA	GTC	CCT	GCT	CGC	TTC	AGT	GGC	AGT	192
Ala																
Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser		
50				55											60	
GGG	TCT	GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC	ACA	ATC	AGC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAA	240
Gly																
Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu		
65				70				75							80	
GAT	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAG	CAG	TGG	AGT	ATT	AAC	CCA	CGG	ACG	288
Asp																
Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ile	Asn	Pro	Arg	Thr		
85				90				95								
TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA	CGG	ACT	GTT	GCG	GCG	CC	335
Phe																
Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro		
100				105				110								

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:103:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 112 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:103:

Gln	Ile	Val	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly
1				5			10								15

63/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:104:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 318 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence

(B) LOCATION: 1...318

(D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:104:

CAG ATA GTC CTC TCC CAG TCT CCA GCA ATC CTG TCT GCA TCT CCA GGG 48
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

GAG AAG GTC ACA ATG ACT TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AAT TAC ATG 96
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
 20 25 30

CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AAA CCC TGG ATT TAT 144

WO 01/87339

PCT/US00/27438

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr			
35	40	45	
GCC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT			192
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser			
50	55	60	
GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA			240
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu			
65	70	75	80
GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT ATT AAC CCA CGG ACG			288
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr			
85	90	95	
TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA			318
Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:105:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 106 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:105:

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met			
20	25	30	
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr			
35	40	45	
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser			
50	55	60	
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu			

65/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

65	70	75	80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr			
85	90	95	
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100		105	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:106:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 30 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:106:

CAGATCCAAC TAGTGCAGTC TGGACCTGAG

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:107:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTISENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE:
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:107:

TTAAGCTTGC TAGCTGCAGA GACAGTGACC AG

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:108:

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 369 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE:

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence

(B) LOCATION: 1...369

(D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:108:

CAG ATC CAA CTA GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG	48
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Pro Gly Glu	
1 5 10 15	
ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAC ACC TTC ACA AAC TAT	96
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	
20 25 30	
GGA ATG AAC TGG GTG AAG CAG GCT CCA GGA AAG GGT TTA AAG TGG ATG	144
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met	
35 40 45	
GGC TGG ATA AAC ACC AGA AAT GGA AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC	192
Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe	
50 55 60	
AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA AGC TCT GCC AGC ACT GCC AAT	240
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Asn	
65 70 75 80	
TTG CAG ATC GAC AAC CTC AAA GAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC TGT	288
Leu Gln Ile Asp Asn Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys	
85 90 95	

WO 01/87339

PCT/US00/27438

ACA AGA GAA GGG AAT ATG GAT GGT TAC TTC CCT TTT ACT TAC TGG GGC 336
 Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly
 100 105 110

CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA GCT AGC 369
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser
 115 120

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:109:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 123 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:109:

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Asn
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asp Asn Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser
 115 120

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:110:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

68/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

(A) LENGTH: 363 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(iii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTISENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE:
 (vi) ORIGINAL SOURCE:
 (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Coding Sequence
 (B) LOCATION: 1...363
 (D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:110:

CAG ATC CAA CTA GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG	48
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu	
1 5 10 15	
ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAC ACC TTC ACA AAC TAT	96
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	
20 25 30	
GGA ATG AAC TGG GTG AAG CAG CCT CCA GGA AAG GGT TTA AAG TGG ATG	144
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met	
35 40 45	
GGC TGG ATA AAC ACC AGA AAT GGA AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC	192
Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe	
50 55 60	
AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA AGC TCT GCC AGC ACT GCC AAT	240
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Asn	
65 70 75 80	
TTG CAG ATC GAC AAC CTC AAA GAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC TGT	288
Leu Gln Ile Asp Asn Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys	
85 90 95	
ACA AGA GAA GGG AAT ATG GAT GGT TAC TTC CCT TTT ACT TAC TGG GGC	336

69/70

WO 01/87339

PCT/US00/27438

Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly
 100 105 110

CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA 363
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:111:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 121 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:111:

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Asn
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asp Asn Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/27438
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 39/40, 39/42, 39/395 US CL : 424/130.1, 133.1, 141.1, 145.1, 146.1 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) U.S. : 424/130.1, 133.1, 141.1, 145.1, 146.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y	REFINO et al. A Human Antibody that Binds to the gamma-carboxyglutamic Acid Domain of Factor IX is a Potent Antithrombotic In Vivo. Thrombosis and Haemostasis. September 1999, Vol. 82, No. 3, pages 1188-1195 see entire document.	1-6, 20-23 ----- 7-19
X - Y	FEUERSTEIN et al. Antithrombotic Efficacy of a Novel Murine Antihuman Factor IX Antibody in Rats. Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. October 1999, Vol. 19, No. 10, pages 2554-2562, see entire document.	1-6, 20-23 ----- 7-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date which may cast doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "D" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 09 FEBRUARY 2001		Date of mailing of the international search report 03 APR 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer  PATRICIA A. DUFFY Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/27438
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KESSLER, C. M. The Pharmacology of Aspirin, Heparin, Coumarin, and Thrombolytic Agents, Implications for Therapeutic Use in Cardiopulmonary Disease. <i>Chest</i> . April 1991, Vol. 99, No. 4, pages 97S-112S, see entire document.	7-19

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
International application No. PCT/US00/27438	
<p>B. FIELDS SEARCHED Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used): STN-USPATFULL, MEDLINE, BIOSYS, CAB ABSTRACTS, EMBASE, JAPIO. search terms: Factor IX, antibody, immunoglobulin, thrombosis, PT, PTT, stroke, ischaemia, clot, plasminogen activator</p>	

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1998)★

フロントページの続き

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

(72)発明者 フランク・シー・バローン

アメリカ合衆国 19403 ペンシルベニア州 オーデュボン、イーグルビル・ロード 2861 番

(72)発明者 マイケル・エヌ・ブラックバーン

アメリカ合衆国 19460 ペンシルベニア州 フェニックスビル、キャンプ・サークル 803 番

(72)発明者 ジオラ・ゼット・フューアースタイン

アメリカ合衆国 19096 ペンシルベニア州 ウィンウッド、バリートア・ロード 405 番

(72)発明者 ジョン・アール・トゥーメイ

アメリカ合衆国 19426 ペンシルベニア州 カレッジビル、スタイル・メドー・ドライブ 3022 番

F ターム(参考) 4C084 AA02 DC05 DC21 NA14 ZA541

4C085 AA14 BB11 BB41 BB43 CC02 CC22