

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7478149号  
(P7478149)

(45)発行日 令和6年5月2日(2024.5.2)

(24)登録日 令和6年4月23日(2024.4.23)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 0 7 K 16/36 (2006.01)	C 0 7 K 16/36	Z N A
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
請求項の数 28 (全84頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-529785(P2021-529785)	(73)特許権者	513239243
(86)(22)出願日	令和1年11月27日(2019.11.27)		オレゴン ヘルス アンド サイエンス コ ニバーシティー
(65)公表番号	特表2022-513437(P2022-513437 A)		アメリカ合衆国 オレゴン 9 7 2 3 9 , ポートランド, エスダブリュー パンク ロフト ストリート 0 6 9 0
(43)公表日	令和4年2月8日(2022.2.8)	(73)特許権者	519095500
(86)国際出願番号	PCT/US2019/063729		アロノラ・インコーポレイテッド
(87)国際公開番号	WO2020/113084		アメリカ合衆国、9 7 2 3 9 ・オレゴン 、ポートランド、サウスウエスト・マカ ダム・アベニュー・4 6 4 0、スイート ・2 0 0 エー
(87)国際公開日	令和2年6月4日(2020.6.4)	(74)代理人	100078282
審査請求日	令和4年9月20日(2022.9.20)		弁理士 山本 秀策
(31)優先権主張番号	62/772,235	(74)代理人	100113413
(32)優先日	平成30年11月28日(2018.11.28)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 治療用第X I I 因子抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

可変重鎖(VH)ドメインおよび可変軽鎖(VL)ドメインを含む、血液タンパク質第X I I 因子(FXII)に結合するヒト化モノクローナル抗体、またはその抗原結合性断片であって、

前記VHドメインが、配列番号8のアミノ酸配列を含み、

前記VLドメインが、配列番号10のアミノ酸配列を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 2】

前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号7を含み、前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号9を含む、請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

F a b 断片、F a b ' 断片、F ( a b )<sub>2</sub>'断片、単鎖可変断片(s c F v)またはジスルフィド安定化可変断片(d s F v)である、請求項1に記載の抗原結合性断片。

【請求項 4】

請求項1から3のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片と異種タンパク質とを含む融合タンパク質。

【請求項 5】

請求項1から3のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片と検出可能な標識とを含む抗体コンジュゲート。

## 【請求項 6】

前記検出可能な標識が、フルオロフォア、酵素または放射性同位体を含む、請求項 5 に記載の抗体コンジュゲート。

## 【請求項 7】

薬学的に許容される担体と請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片とを含む組成物。

## 【請求項 8】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片をコードする核酸分子。

## 【請求項 9】

配列番号 1 1 および配列番号 1 2 のヌクレオチド配列を含む、請求項 8 に記載の核酸分子。

10

## 【請求項 10】

プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 8 または 9 に記載の核酸分子。

## 【請求項 11】

請求項 8 から 10 のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクター。

## 【請求項 12】

請求項 8 から 10 のいずれか一項に記載の核酸分子または請求項 11 に記載のベクターを含む単離された細胞。

## 【請求項 13】

試料中の F X I I を検出するための方法であって、前記試料を請求項 1 から 3 のいずれかに記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片と接触させるステップ、および前記抗体の前記試料への結合を検出し、それによって、前記試料中の F X I I を検出するステップを含む方法。

20

## 【請求項 14】

前記モノクローナル抗体または抗原結合性断片が、直接標識される、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記モノクローナル抗体または抗原結合性断片を二次抗体と接触させるステップ、および前記二次抗体の前記モノクローナル抗体または抗原結合性断片への結合を検出し、それによって、前記試料中の F X I I を検出するステップをさらに含む、請求項 13 に記載の方法。

30

## 【請求項 16】

F X I I を含む試料中の F X I I の活性化および/または活性を阻害する *in vitro* 方法であって、前記試料を請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片と接触させるステップを含む方法。

## 【請求項 17】

前記試料が血液試料を含む、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 18】

対象における F X I I の活性化および/または活性を阻害するための組成物であって、前記組成物は、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片を含む組成物。

40

## 【請求項 19】

対象における F X I I の活性化および/または活性化 F X I I ( F X I I a ) の活性が関与する病的凝固亢進を処置するための組成物であって、前記組成物は、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片を含む組成物。

## 【請求項 20】

対象における F X I I の活性化および/または F X I I a の活性が関与する血栓症を阻止するための組成物であって、前記組成物は、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗

50

体または抗原結合性断片を含む組成物。

【請求項 2 1】

前記対象が、細菌感染症、真菌感染症、ウイルス感染症、寄生虫感染症、虚血性臓器疾患、微小血管血栓症、大血管血栓症、血栓塞栓症、播種性血管内凝固症候群、重症全身性炎症反応症候群、F X I I a 活性が関与するアレルギー反応もしくは炎症反応、急性呼吸窮迫症候群、がん、羊水塞栓症、外傷、移植拒絶反応、鎌状赤血球症、自己免疫疾患を患っているもしくは発症するリスクがある、または医療デバイス移植を受けている、請求項 1 8 から 2 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記虚血性臓器疾患が、心筋梗塞または虚血性脳卒中である、請求項 2 1 に記載の組成物。 10

【請求項 2 3】

前記がんが、非転移性固形腫瘍がん、転移性固形腫瘍がんまたは白血病である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記医療デバイス移植が、カテーテル、心臓弁、ステントまたはグラフトの移植である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記組成物が、第 2 の抗凝固療法、または抗血栓もしくは血栓溶解療法と組み合わせて前記対象に投与されることを特徴とする、請求項 1 8 から 2 4 のいずれか一項に記載の組成物。 20

【請求項 2 6】

前記組成物が、非経口投与により投与されることを特徴とする、請求項 1 8 から 2 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記モノクローナル抗体または抗原結合性断片が、約 0 . 1 m g / k g から約 2 g / k g の用量で投与されることを特徴とする、請求項 1 8 から 2 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片、請求項 4 に記載の融合タンパク質、請求項 5 もしくは請求項 6 に記載の抗体コンジュゲート、請求項 7 に記載の組成物、請求項 8 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 1 1 に記載のベクター、請求項 1 2 に記載の単離された細胞、またはそれらの任意の組合せを含むキット。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体が参照によって本明細書に組み入れられている、2 0 1 8 年 1 1 月 2 8 日に提出した米国仮出願第 6 2 / 7 7 2 , 2 3 5 号の利益を請求するものである。 40

【0 0 0 2】

分野

本開示は、血液タンパク質第 X I I 因子 ( F X I I ) に特異的な強力な治療用抗体、ならびに血栓症の処置および止血の管理を含む、医療処置の方法におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

カテーテル、ステント、グラフト、フィルターおよび体外臓器支援システム ( E C O S ) を含む、血液接触医療デバイスは、抗凝固薬の投与による医学的血栓予防を用いても、既存の抗凝固薬が有害な出血副作用のためにそれらの最大有効用量で投与されないため、 50

デバイス関連血栓塞栓症を引き起こすことが多い (Lavery et al., *Adv Drug Deliv Rev* 2017; 112:2-11)。開存性を維持するために、灌流されるデバイスは、出血の発生率および/または重症度を増加させることもある、予防的抗凝固を必要とする。FXII阻害を含む、血液の接触活性化の阻害は、治療的抗凝固の安全な代替手法として提案されている (PCT公開番号WO2013/013423; Gruberand Hanson, *Blood* 2003; 102:953-955; Yau et al., *Blood* 2014; 123:2102-2107; Tillmanand Gailani, *Semin Thromb Hemost* 2018; 44:60-69)。体外式膜型人工肺 (ECMO) は、呼吸不全の短期管理に使用されるが、その恩恵は、抗凝固関連出血により低減される (Oliver, *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2009; 13:154-175; Murphy et al., *Transfus Med Rev* 2015; 29:90-101; Barbaro et al., *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191:894-901)。ECOSシステム、例えば、ECMO、心肺バイパス、左室補助人工心臓 (LVAD)、全置換型人工心臓 (TAH)、または血液透析は、接触および血小板活性化を促進するいくつかの成分を有する (Sniecinskiand Chandler, *Anesth Analg* 2011; 113:1319-1333)。

#### 【0004】

*in vivo*でのFXII、血漿カリクレイン (PK) または高分子量キニノーゲン (HK) 以外の凝固因子 (coagulation factors) の活性化は、トロンビン生成をもたらし、そしてその後の血小板活性化およびフィブリン形成をもたらして、止血を支援する (Smith et al., *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2015; 50:326-336)。しかし、血管内腔内での病的血液凝固にFXII、PKおよびHKが関与することもあり、そのような病的血液凝固は、血管閉塞性血栓症/血栓塞栓症を引き起こすこともある。血栓症の薬理的処置または血栓予防は、トロンビンまたは第Xa因子などの肝要な止血性血漿タンパク質を阻害するため出血を引き起こすこともある、ヘパリンなどの抗血栓薬で果たされる (Abraham et al., *BMJ* 2015; 350:h1857; Ruff et al., *Lancet* 2014; 383:955-962)。したがって、これらの薬物は、用量制限抗止血毒性のため十分な有効性に達するまで投与することができず、血栓性血管閉塞は、依然として先進国での主な死亡原因である。抗血栓薬の安全性の問題に対処するために、接触活性化の阻害は現行の抗血栓療法よりも安全な代替法になると提案された (PCT公開番号WO2013/013423; Gruberand Hanson, *Blood* 2003; 102:953-955)。産学両方において抗凝固の安全性を改善するための接触活性化複合成分の阻害剤を開発するために進められている取り組みは、増加の一途を辿っている (Tillman et al., *Blood Rev* 2018; 32:433-448)。

#### 【0005】

血漿接触活性化複合体は、病的血栓形成を促進する。この形成には、様々な生体分子および人工材料を含む負荷電表面への血液の曝露後に活性化される、FXI、血漿プレカリクレイン (PK)、および補因子高分子量キニノーゲン (HK) が関与する (Schmaier, *Thromb Res* 2014; 133:S41-S44; Schmaier, *J Thromb Haemost* 2016; 14:28-39; Tillman and Gailani, *Semin Thromb Hemost* 2018; 44:60-69)。FXIIは、 $30 \sim 40 \mu\text{g/ml}$  ( $375 \sim 500 \text{ nM}$ ) の血漿濃度を有する (Hansonand Tucker, Chapter 11.2.6 - Blood Coagulation and Blood-Materials Interactions. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, et al., editor(s). *Biomaterials Science* (Third Edition). Academic Press; 2013. p. 551-557)。Arg 353の後ろでのFXII、80 kDa単鎖チモーゲン、の表面触媒切断は、プロテアーゼ - FXIIaを生じさせる。Arg 334の後ろでの - FXIIaの切断は、FXIIa触媒ドメインを含有する - FXIIaを生じさせる。 - FXIIaは、FXIを活性化してFXIaにし、最終的にトロンビン (FIIa) 生成およびFXIIの相互活性化に至る。相伴って、 - FXIIaは、チモーゲンPKを活性化して - カリクレインにし、この - カリクレインがさらなるFXIIを - FXIIaに変換する。 - FXIIaは、補体系の成分を活性化し、カリクレイン - キニン系の一部として補因子HKを切断してブラジキニンを遊離させ、その結果、NOの生成、ならびに補体および他の系、例えばレニン - アンジオテンシン系の活性化に至る (Ivanov et al., *Curr Opin Hematol* 2017; 24:411-418

10

20

30

40

50

)。こうして、接触活性化は、血栓形成促進、血管調節および炎症誘発プロセスを開始する (Renne, *Semin Immunopathol* 2012; 34:31-41)。

【0006】

接触活性化は、活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) 凝固アッセイにおけるトロンビン形成を推進するため、接触タンパク質を欠いている哺乳動物からの血漿および血液は、長い aPTT を有する (Turi and Peerschke, *Am J Clin Pathol* 1986; 85:43-49)。遺伝性 FXI 欠損は、ヒトにおいて軽度の出血性障害 (血友病 C) を引き起こすことがあるが、FXII、PK または HK の欠損は、無症候性である (Tagariello et al., *Blood Transfus* 2017; 15:557-561; Kitchens, *J Thromb Haemost* 2005; 3:2607-2611; Renne et al., *Blood* 2012; 120:4296-4303)。重要なこととして、止血において果たす役割は小さいまたは無いのだが、これらのタンパク質は、一部の実験動物モデルでは血栓症の一因となるようである (Renne et al., *J Exp Med* 2005; 202:271-281; Kleinschnitz et al., *J Exp Med* 2006; 203:513-518; Crosby et al., *Arter Thromb Vasc Biol* 2013; 33:1670-1678)。抗 FXIIa 抗体 3F7 を使用する FXIIa 阻害は、静脈血が動物の静脈から抽出され、ローラーポンプを使用してデバイスを通して送り出されるウサギ ECMO モデルにおいて、実験的傷害誘発出血の見掛けの増加を伴うことなく膜型人工肺カートリッジ内のフィブリン沈着を低減させた (Kenne and Renne, *Drug Discov Today* 2014; 19:1459-1464; Larsson et al., *Sci Transl Med* 2014; 6:222ra17; Worm et al., *Ann Transl Med* 2015; 3:247)。

10

【先行技術文献】

20

【特許文献】

【0007】

【文献】国際公開第 2013/013423 号

【非特許文献】

【0008】

【文献】Lavery et al., *Adv Drug Deliv Rev* 2017; 112:2-11

【文献】Gruber and Hanson, *Blood* 2003; 102:953-955

【文献】Yau et al., *Blood* 2014; 123:2102-2107

【文献】Tillman and Gailani, *Semin Thromb Hemost* 2018; 44:60-69

【文献】Oliver, *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2009; 13:154-175

30

【文献】Murphy et al., *Transfus Med Rev* 2015; 29:90-101

【文献】Barbaro et al., *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191:894-901

【文献】Sniecinski and Chandler, *Anesth Analg* 2011; 113:1319-1333

【文献】Smith et al., *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2015; 50:326-336

【文献】Abraham et al., *BMJ* 2015; 350:h1857

【文献】Ruff et al., *Lancet* 2014; 383:955-962

【文献】Tillman et al., *Blood Rev* 2018; 32:433-448

【文献】Schmaier, *Thromb Res* 2014; 133:S41-S44

【文献】Schmaier, *J Thromb Haemost* 2016; 14:28-39

【文献】Hanson and Tucker, Chapter 11.2.6 - Blood Coagulation and Blood-Materials Interactions. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, et al., editor(s). *Biomaterials Science* (Third Edition). Academic Press; 2013. p.551-557

40

【文献】Ivanov et al., *Curr Opin Hematol* 2017; 24:411-418

【文献】Renne, *Semin Immunopathol* 2012; 34:31-41

【文献】Turi and Peerschke, *Am J Clin Pathol* 1986; 85:43-49

【文献】Tagariello et al., *Blood Transfus* 2017; 15:557-561

【文献】Kitchens, *J Thromb Haemost* 2005; 3:2607-2611

【文献】Renne et al., *Blood* 2012; 120:4296-4303

【文献】Renne et al., *J Exp Med* 2005; 202:271-281

【文献】Kleinschnitz et al., *J Exp Med* 2006; 203:513-518

50

【文献】Crosby et al., Arter Thromb Vasc Biol 2013; 33:1670-1678

【文献】Kenne and Renne, Drug Discov Today 2014; 19:1459-1464

【文献】Larsson et al., Sci Transl Med 2014; 6:222ra17

【文献】Worm et al., Ann Transl Med 2015; 3:247

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

血液タンパク質第XIII因子(FXIII)に結合する、例えば特異的に結合するモノクローナル抗体が記載される。モノクローナル抗体(その抗原結合性断片を含む)は、ヒトFXIIIと免疫複合体を形成し、FXIII活性を阻害することができ、抗炎症および抗血栓効果をもたらす。

10

【0010】

FXIIIの触媒ドメインに結合して触媒活性を遮断するモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片が、本明細書で提供される。モノクローナル抗体または抗原結合性断片は、可変重鎖(VH)ドメインおよび可変軽鎖(VL)ドメインを含む。一部の実施形態では、モノクローナル抗体または抗原結合性断片のVHドメインは、配列番号2の相補性決定領域(CDR)配列を含む、および/またはモノクローナル抗体または抗原結合性断片のVLドメインは、配列番号4のCDR配列を含む。

【0011】

本明細書に記載のFXIII特異的モノクローナル抗体またはその抗原結合性断片を含む、融合タンパク質、抗体コンジュゲートおよび組成物も提供される。

20

【0012】

開示されるモノクローナル抗体または抗原結合性断片をコードする、核酸分子およびベクターが、さらに提供される。本明細書で開示される核酸分子またはベクターを含む単離された細胞も提供される。

【0013】

本明細書で開示されるモノクローナル抗体または抗原結合性断片と試料を接触させ、抗体の試料への結合を検出することにより、試料中のFXIIIを検出する方法も提供される。

【0014】

試料を本明細書で開示されるFXIII特異的抗体または抗原結合性断片と接触させることにより、FXIIIを含む試料中のFXIIIの活性化および/または活性(例えば、FXIIIaの活性)を阻害する、*in vitro*方法も提供される。

30

【0015】

本明細書で開示される抗体または抗原結合性断片の有効量を対象に投与することにより、対象におけるFXIIIの活性化および/または活性を阻害する方法、対象におけるFXIIIの活性化および/または活性が関与する病的凝固亢進を処置する方法、ならびに対象におけるFXIIIの活性化および/または活性が関与する血栓症もしくは炎症を阻害する方法も提供される。一部の例では、方法は、活性化FXIII(FXIIIa)の活性を阻害するステップを含む。

【0016】

開示されるモノクローナル抗体、抗原結合性断片、融合タンパク質、抗体コンジュゲート、組成物、核酸分子、ベクターまたは単離された細胞を含むキットが、本開示によりさらに提供される。

40

【0017】

本開示の上述のおよび他の目的、特徴および利点は、添付の図面を参照して進む後続の詳細な説明からより明らかになる。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目1)

可変重鎖(VH)ドメインおよび可変軽鎖(VL)ドメインを含む、血液タンパク質第XIII因子(FXIII)に結合するモノクローナル抗体、またはその抗原結合性断片であ

50

って、

前記VHドメインが、配列番号2の相補性決定領域1(CDR1)、CDR2およびCDR3配列を含み、

前記VLドメインが、配列番号4のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

(項目2)

前記CDR配列が、IMGT、カバットまたはチョチア番号付けスキームを使用して決定される、項目1に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片。

(項目3)

前記VHドメインCDR1、CDR2およびCDR3配列が、配列番号2の残基26～34、52～58および97～104をそれぞれ含み、ならびに/または

10

前記VLドメインCDR1、CDR2およびCDR3配列が、配列番号4の残基27～31、49～51および88～96をそれぞれ含む、項目1または項目2に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片。

(項目4)

前記VHドメインが、配列番号2のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含み、前記VHドメインのアミノ酸配列が、配列番号2、配列番号8、配列番号14もしくは配列番号16と少なくとも90%同一であり、ならびに/または

前記VLドメインが、配列番号4のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含み、前記VLドメインのアミノ酸配列が、配列番号4、配列番号10、配列番号18もしくは配列番号20と少なくとも90%同一である、項目1から3のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片。

20

(項目5)

前記VHドメインのアミノ酸配列が、配列番号2、配列番号8、配列番号14もしくは配列番号16を含み、および/または

前記VLドメインのアミノ酸配列が、配列番号4、配列番号10、配列番号18もしくは配列番号20を含む、項目1から4のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片。

(項目6)

前記VHドメインのアミノ酸配列が、配列番号8を含み、前記VLドメインのアミノ酸配列が、配列番号10を含む、項目5に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片。

30

(項目7)

重鎖および軽鎖を含み、

前記重鎖が、配列番号2のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含み、前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号1、配列番号7、配列番号13もしくは配列番号15と少なくとも90%同一であり、ならびに/または

前記軽鎖が、配列番号4のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含み、前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号3、配列番号9、配列番号17もしくは配列番号19と少なくとも90%同一である、項目1から5のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

(項目8)

40

前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号1、配列番号7、配列番号13もしくは配列番号15を含み、および/または

前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号3、配列番号9、配列番号17もしくは配列番号19を含む、項目7に記載のモノクローナル抗体。

(項目9)

前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号7を含み、前記軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号9を含む、項目7に記載のモノクローナル抗体。

(項目10)

Fab断片、Fab'断片、F(ab)<sub>2</sub>'断片、単鎖可変断片(scFv)またはジスルフィド安定化可変断片(dsFv)である、項目1から6のいずれか一項に記載の抗原結

50

合性断片。

(項目 1 1)

ヒト化抗体または抗原結合性断片である、項目 1 から 1 0 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片。

(項目 1 2)

項目 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片と異種タンパク質とを含む融合タンパク質。

(項目 1 3)

項目 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片と検出可能な標識とを含む抗体コンジュゲート。

(項目 1 4)

前記検出可能な標識が、フルオロフォア、酵素または放射性同位体を含む、項目 1 3 に記載の抗体コンジュゲート。

(項目 1 5)

薬学的に許容される担体と項目 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片とを含む組成物。

(項目 1 6)

項目 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片をコードする核酸分子。

(項目 1 7)

配列番号 5、配列番号 6、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3 および / または配列番号 2 4 のヌクレオチド配列を含む、項目 1 6 に記載の核酸分子。

(項目 1 8)

配列番号 1 1、配列番号 1 2 または両方のヌクレオチド配列を含む、項目 1 7 に記載の核酸分子。

(項目 1 9)

プロモーターに作動可能に連結されている、項目 1 6 から 1 8 のいずれか一項に記載の核酸分子。

(項目 2 0)

項目 1 6 から 1 9 のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクター。

(項目 2 1)

項目 1 6 から 1 9 のいずれか一項に記載の核酸分子または項目 2 0 に記載のベクターを含む単離された細胞。

(項目 2 2)

試料中の F X I I を検出するための方法であって、前記試料を項目 1 から 1 1 のいずれかに記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片と接触させるステップ、および

前記抗体の前記試料への結合を検出し、それによって、前記試料中の F X I I を検出するステップ

を含む方法。

(項目 2 3)

前記モノクローナル抗体または抗原結合性断片が、直接標識される、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記モノクローナル抗体または抗原結合性断片を二次抗体と接触させるステップ、および

前記二次抗体の前記モノクローナル抗体または抗原結合性断片への結合を検出し、それによって、前記試料中の F X I I を検出するステップ

をさらに含む、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 5)

F X I I を含む試料中の F X I I の活性化および / または活性を阻害する *in vitro*

10

20

30

40

50

o方法であって、前記試料を項目1から11のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片と接触させるステップを含む方法。

(項目26)

前記試料が血液試料を含む、項目25に記載の方法。

(項目27)

対象におけるFXIIIの活性化および/または活性を阻害する方法であって、項目1から11のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法。

(項目28)

対象におけるFXIIIの活性化および/または活性化FXIII(FXIIIa)の活性が関与する病的凝固亢進を処置する方法であって、項目1から11のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法。

10

(項目29)

対象におけるFXIIIの活性化および/またはFXIIIaの活性が関与する血栓症を阻止する方法であって、項目1から11のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法。

(項目30)

前記対象が、細菌感染症、真菌感染症、ウイルス感染症、寄生虫感染症、虚血性臓器疾患、微小血管血栓症、大血管血栓症、血栓塞栓症、播種性血管内凝固症候群、重症全身性炎症反応症候群、FXIIIa活性が関与するアレルギー反応もしくは炎症反応、急性呼吸窮迫症候群、がん、羊水塞栓症、外傷、移植拒絶反応、鎌状赤血球症、自己免疫疾患を患っているもしくは発症するリスクがある、または医療デバイス移植を受けている、項目27から29のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目31)

前記虚血性臓器疾患が、心筋梗塞または虚血性脳卒中である、項目30に記載の方法。

(項目32)

前記がんが、非転移性固形腫瘍がん、転移性固形腫瘍がんまたは白血病である、項目30に記載の方法。

(項目33)

前記医療デバイス移植が、カテーテル、心臓弁、ステントまたはグラフトの移植である、項目30に記載の方法。

30

(項目34)

第2の抗凝固療法、または抗血栓もしくは血栓溶解療法の有効量を、前記対象に投与するステップをさらに含む、項目27から33のいずれか一項に記載の方法。

(項目35)

前記モノクローナル抗体または抗原結合性断片が、非経口投与により投与される、項目27から34のいずれか一項に記載の方法。

(項目36)

前記モノクローナル抗体または抗原結合性断片が、約0.1mg/kgから約2g/kgの用量で投与される、項目27から35のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目37)

項目1~11のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗原結合性断片、項目12に記載の融合タンパク質、項目13もしくは項目14に記載の抗体コンジュゲート、項目15に記載の組成物、項目16~19のいずれか一項に記載の核酸分子、項目20に記載のベクター、項目21に記載の単離された細胞、またはそれらの任意の組合せを含むキット。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1A-1C】図1A-1C：血漿凝固に対する抗第XIII因子抗体5C12の効果。合成脂質試薬を使用する標準的な活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)アッセ

50

イを行った。(図1A~1B) aPTTアッセイを行う前に漸増濃度の5C12( )および対照非阻害抗FXII抗体( )を5分間、ヒト(図1A)またはヒヒ(図1B)乏血小板血漿とインキュベートした。データは、2~6の凝固時間の平均である。(図1C)公知FXIIインヒビターであるトウモロコシトリプシンインヒビター(CTI)( )による用量依存性aPTT延長が、5C12( )によるFXIIの阻害後のaPTT延長と比較されている。

#### 【0019】

【図2A-2F】図2A-2F：血漿凝固に対するFXII濃度の効果。異なる種からの正常乏血小板血漿をFXII欠乏ヒト血漿に段階希釈し、0.006~100%FXIIである乏血小板血漿を得た。血漿をaPTT測定前に5分間、緩衝液のみ( )または20μg/mlの5C12( )とインキュベートした。次の種を5C12とその種のFXIIとの交差反応性について試験した：ヒト(図2A)、ヒヒ(図2B)、カニクイザル(図2C)、アカゲザル(図2D)、マウス(図2E)およびラット(図2F)。曲線の右シフトは、5C12と試験した種との交差反応性を示す。

10

#### 【0020】

【図3A-3C】図3A-3C：5C12の種特異性。(図3A)SDS-PAGEクロマトグラフィーによりサイズ分画された異なる種(各線上に示されている)からの乏血小板血漿のウェスタンブロット。種は、アルファベット順に、次のものを含む：アフリカミドリザル、ヒヒ、ビーグル犬、ネコ、ウシ、ニワトリ、カニクイザル、イヌ、ゾウ、オオアライクイ、ウマ、ヒト、FXIIが欠損しているヒト、ラマ、マーモセット、ブタ、ウサギ、アライグマ、ラット、アカカンガルー、アカゲザルおよびトラ。ヒト血漿およびFXIIが欠乏しているヒト血漿を、それぞれ陽性および陰性対照として全てのゲルで使用した。抗体5C12は、SDS-PAGEゲル上で還元状態の組換えおよび血漿由来FXIIの両方を認識するが、還元状態の組換えおよび血漿FXIIをどちらも認識しない(図3B)。5C12は、アルファ型(FXIIの軽鎖と重鎖の両方を含む)およびベータ型(軽鎖、および重鎖の非ペプチド断片のみを含む)の活性化FXII(FXIIa)も認識する(図3C)。全てのウェスタンブロットについての一次抗体は、マウス5C12であり、二次抗体は、ヤギ抗マウスポリクローナルであった。

20

#### 【0021】

【図4A-4E】図4A-4E：5C12がFXII活性化およびFXIIa活性を阻害する。(図4A~4B)5C12または対照非阻害FXII抗体をFXIIと10分間、室温(RT)でブレインキュベートし、次いで、高分子量キノーゲン(HK)およびブレカリクレイン(PK)を含む短鎖ポリリン酸塩(図4A)または長鎖ポリリン酸塩(図4B)の溶液に添加した。最終濃度は、50nM FXII、10μMポリリン酸塩、12.5nM PKおよび12.5nM HKであり、抗体濃度は様々(0~100nM)であった。試料を37で60分間インキュベートした。次いで、ダイズトリプシンインヒビター(50μg/ml)によりPKを阻害し、ポリリン酸塩をポリブレン(6μg/ml)により中和し、発色性基質であるSpectrozyme FXIIa(最終濃度0.5mM)の添加によりFXIIaを測定した。(図4C)5C12または対照抗体(0~80nM)をFXII(40nM)と10分間、室温でブレインキュベートした。次いで、デキストラン硫酸を各試料に最終濃度1μg/mlで添加し、試料を20分間、37でインキュベートした。発色性基質であるSpectrozyme FXIIa(最終濃度0.5mM)の添加によりFXIIaを測定した。(図4D)5C12または対照抗体(0~40nM)をFXIIa(20nM)と10分間ブレインキュベートした。次いで、発色性基質であるSpectrozyme FXIIa(最終濃度0.5mM)の添加によりFXIIa活性を測定した。記号は、( )5C12、( )対照抗体である。(図4E)ヒトFXII(100nM)を、0、15、30および60分間、37で、100nM 5C12の存在または非存在下で5nMヒトカリクレインおよび10μg/mlのデキストラン硫酸とインキュベートした。40μg/mlのCTIを各試料に添加してFXIIaの活性を遮断した。試料を還元条件下でSDS-PAGEにより分離し、

30

40

50

P V D F 膜に転写し、抗 F X I I 抗体で免疫プロットした。E C L ( G E H e a l t h c a r e 、 P i s c a t a w a y 、 N J 、 U S A ) を使用してタンパク質を検出した。

【 0 0 2 2 】

【図 5 A - 5 D】図 5 A - 5 H : *in vivo*での 5 C 1 2 抗体活性の経時変化。単一のヒヒ ( P a p i o a n u b i s ) に 1 m g / k g 5 C 1 2 の 6 用量を 4 0 分間隔で静脈内注射することにより、合わせて 6 m g / k g の用量を与えた。示されている時点で血液試料を 1 / 1 0 の体積の 3 . 2 % クエン酸ナトリウムに採取し、乏血小板血漿を処理した。全血球数の測定のために第 2 の血液試料を E D T A - K 2 被覆管に採取した。血漿凝固の測定は、a P T T ( 図 5 A )、プロトロンビン時間 ( P T ) ( 図 5 B )、および活性化凝固時間 ( A C T ) ( 図 5 C ) を使用して行った。トロンビン - アンチトロンビン時間 ( T A T ) ( 図 5 D ) は、E n z y g n o s t T A T m i c r o E L I S A キット ( S i e m e n s H e a l t h c a r e D i a g n o s t i c s P r o d u c t s G m b H ) を使用して測定した。血液試料を採取した全ての日に全血球計算 ( C B C ) を行った。血小板数 ( 図 5 E )、ヘマトクリット ( 図 5 F )、白血球数 ( 図 5 G ) および赤血球数 ( 図 5 H ) を示す。全ての測定値は、ヒヒについて正常範囲内に留まる。これらのパラメーターの正常範囲は、各パネルに点線で示されている。

10

【図 5 E - 5 H】図 5 A - 5 H : *in vivo*での 5 C 1 2 抗体活性の経時変化。単一のヒヒ ( P a p i o a n u b i s ) に 1 m g / k g 5 C 1 2 の 6 用量を 4 0 分間隔で静脈内注射することにより、合わせて 6 m g / k g の用量を与えた。示されている時点で血液試料を 1 / 1 0 の体積の 3 . 2 % クエン酸ナトリウムに採取し、乏血小板血漿を処理した。全血球数の測定のために第 2 の血液試料を E D T A - K 2 被覆管に採取した。血漿凝固の測定は、a P T T ( 図 5 A )、プロトロンビン時間 ( P T ) ( 図 5 B )、および活性化凝固時間 ( A C T ) ( 図 5 C ) を使用して行った。トロンビン - アンチトロンビン時間 ( T A T ) ( 図 5 D ) は、E n z y g n o s t T A T m i c r o E L I S A キット ( S i e m e n s H e a l t h c a r e D i a g n o s t i c s P r o d u c t s G m b H ) を使用して測定した。血液試料を採取した全ての日に全血球計算 ( C B C ) を行った。血小板数 ( 図 5 E )、ヘマトクリット ( 図 5 F )、白血球数 ( 図 5 G ) および赤血球数 ( 図 5 H ) を示す。全ての測定値は、ヒヒについて正常範囲内に留まる。これらのパラメーターの正常範囲は、各パネルに点線で示されている。

20

【 0 0 2 3 】

【図 6 A - 6 E】図 6 A - 6 E : 表面で開始される血栓形成のヒヒモデル。( 図 6 A ) 乳児用体外式膜型人工肺 ( b a b y e x t r a c o r p o r e a l m e m b r a n e o x y g e n a t o r ) ( E C M O 、 C a p r i o x B a b y R X 0 5 、 T e r u m o C o r p o r a t i o n ) を若年のオスのヒヒ ( P a p i o A n u b i s ) の慢性 A V シャントに挿入し、G E - B r i v o N M 6 1 5 核磁気イメージングシステムの中央に配置した。E C M O デバイスを通る血流をデジタルクランプにより 1 0 0 m l / 分の流速に調節し、実験を 6 0 分間実行した。 $^{111}\text{In}$  を使用して血小板に標識して、E C M O デバイス内の血小板沈着のリアルタイムモニタリングを可能にした。対照研究 ( ) を除いて、各実験の前に処置を施した。実験の 1 5 分前にヘパリン ( ) を 2 0 U / k g のボラス *i . v .* 注射として投与した。5 C 1 2 ( )、5 m g / k g *i . v .* ボラスを実験の 3 0 分前に投与した。5 C 1 2 とヘパリンとの組合せ研究 ( ) を最初の 5 C 1 2 投与の 4 8 時間後に行い、第 2 の「トップオフ」用量の 2 m g / k g の 5 C 1 2、および新たな用量の 2 0 U / k g のヘパリンを投与した。図 6 B は、研究の後半 ( 3 0 ~ 6 0 分目 ) の血小板沈着速度 ( 1 分あたり 1 0 億個の血小板が沈着 ) を表示する。図 6 C ~ 6 D は、E C M O デバイス内で形成された血栓の最終血小板数およびフィブリン含量をそれぞれ表示し、図 6 E は、これら 2 つのパラメーター間の相関を示す。

30

40

【 0 0 2 4 】

【図 7 A - 7 C】図 7 A - 7 C : E C M O シャント研究中の血漿凝固測定値。血液試料を E C M O 血栓形成研究の開始 ( 白色バー ) および終了 ( 黒色バー ) 時に、1 / 1 0 体積の 3 . 2 % クエン酸ナトリウムに採取した。A C T ( 図 7 B ) を白血球で直接測定した。a

50

P T T ( 図 7 A ) および P T ( 図 7 C ) の測定は、乏血小板血漿を使用して行った。

【 0 0 2 5 】

【 図 8 A - 8 B 】 図 8 A - 8 B : E C M O シャント研究の終了時の血栓症マーカーの測定値。測定した血栓症マーカーは、E n z y g n o s t T A T m i c r o E L I S A キット ( S i e m e n s H e a l t h c a r e D i a g n o s t i c s P r o d u c t s G m b H ) を使用してトロンピン - アンチトロンピン ( T A T ) ( 図 8 A ) 、 および H u m a n C X C L 4 / P F 4 D u o S e t E L I S A キット ( B i o - T e c h n e C o r p o r a t i o n , M i n n e a p o l i s , M N ) を使用して血小板第 4 因子 ( 図 8 B ) であった。示されているデータは、各研究の終了時に取った測定値である。研究の前に取ったベースライン測定値は、互いに差がなく、各パネルの左側に示されている。

10

【 0 0 2 6 】

【 図 9 A - 9 C 】 図 9 A - 9 C : A V シャント研究中の止血の評価。各シャント血栓形成研究中、研究が始まったの 15 分の時点で 2 回の止血測定を行った。出血時間 ( 図 9 A ) は、標準テンプレート皮膚出血時間試験 ( S u r g i c u t t ( 登録商標 ) 、 I n t e r n a t i o n a l T e c h n i d y n e C o r p , P i s c a t a w a y , N J ) を使用して測定し、手動ストップウォッチを使用して記録した。創傷から出てくる血液滴を、W h a t m a n プロットティング用濾紙を使用して 30 秒ごとに採取した ( 図 9 B ) 。このプロットティング用濾紙と、全血中のヘモグロビン濃度の決定を可能にする定量的比色分析用化学薬品である D r a b k i n 試薬 ( S i g m a ) とを使用して、出血体積を評価した。プロットティング用濾紙上の乾燥した血液試料を、完全に溶解するまで、2 . 5 m L D r a b k i n 試薬に浸漬した。吸光度を 5 4 0 n m で測定し、被験動物の血液を使用した標準曲線と比較した。出血速度を出血体積の時間に対する比として計算した ( 図 9 C ) 。各データ点は、単一の測定値を表す。

20

【 0 0 2 7 】

【 図 1 0 A - 1 0 F 】 図 1 0 A - 1 0 F : スパイクしたヒト血液試料における凝固の評価。ボランティア 6 名から血液試料を 1 / 1 0 の体積の 3 . 2 % クエン酸ナトリウムに採取した。 ( 図 1 0 A ) 乏血小板血漿を生成し、ビヒクル ( ) または 4 0 μ g / m l の 5 C 1 2 ( ) のどちらかをスパイクし、a P T T の測定前に 5 分間インキュベートした。 ( 図 1 0 B ) 全血にビヒクル ( ) または 4 0 μ g / m l の 5 C 1 2 ( ) のどちらかをスパイクし、15 分間インキュベートした後、遠心分離して乏血小板血漿および a P T T の測定値を得た。 ( 図 1 0 C ~ 1 0 F ) R O T E M ( 登録商標 ) デルタ全血分析計 ( T e m S y s t e m s , I n c . R e s e a r c h T r i a n g l e P a r k , N C ) を使用してトロンボエラストメトリーを測定した。全血にビヒクル ( ) または 4 0 μ g / m l の 5 C 1 2 ( ) のどちらかをスパイクし、5 分間インキュベートした。特殊 R O T E M ( 登録商標 ) キュベット中で、2 0 μ l の 2 0 0 m M C a C l 2 および 3 0 0 μ l の血液を混合し、R O T E M ( 登録商標 ) デルタ分析計の自動ピペッティングシステムおよび時間調整を使用して測定を開始した。示されているパラメーターは、 ( 図 1 0 C ) 凝固時間 ( C T ) 、血餅が形成し始めるまでの時間 ; ( 図 1 0 D ) 血餅形成時間 ( C F T ) 、血餅の開始と血餅が 2 0 m m の硬度に達する時間との間の時間 ; ( 図 1 0 E ) 最大血餅硬度 ( M C F ) 、血餅の最大強度 ; および ( 図 1 0 F ) アルファ角度、血餅形成の最大速度までの時間の測定値である。

30

40

【 0 0 2 8 】

【 図 1 1 】 図 1 1 : ヒト化およびキメラ抗体についての E L I S A 曲線フィッティング。ヒト F X I I に対するヒト化抗体、キメラ親抗体およびヒト F c アイソタイプ対照抗体各々についての結合データが、片対数目盛でプロットされて示されている。試料を 2 連で実行し、各データ点は、2 連の平均 ± S E M を表す。

【 0 0 2 9 】

【 図 1 2 】 図 1 2 : 濃度 - 応答 a P T T 曲線に対するヒト化抗体の効果。9 つ全てのヒト化抗体が、濃度依存的に a P T T を延長した。抗体の可能な最高の最終濃度は、ストック

50

濃度に依存し、75または100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のどちらかであった。各試料を2連で実行し、各データ点は、2連の平均  $\pm$  SEMを表す。

【0030】

【図13】図13：FXIIa活性に対するヒト化抗体の効果。全てのヒト化抗体（10 nM）は、FXIIa（20 nM）活性を阻害した。各試料を2連で実行した。FXIIa活性（対照）により生じた $V_{\text{max}}$ を100%に設定し、各抗体を対照と比較した。示されているデータは、2連の平均  $\pm$  SEMである。

【0031】

【図14A - 14B】図14A - 14B：ヒトおよびヒヒ血漿からのaPTTに関するAB053（5C12）とAB054との比較。ヒト（黒塗りの丸）およびヒヒ（白抜きの丸）血漿からのaPTTに関するAB053（図14A）とヒト化AB054（図14B）の比較。データは、1～5回の実験の平均  $\pm$  SEMを表す。

10

【0032】

【図15A - 15C】図15A - 15C：膜型人工肺灌流実験中のaPTT、ACTおよびPT測定。aPTT（図15A）、ACT（図15B）およびPT（図15C）を含む凝固パラメーターを、各処置群について灌流の開始（0分）および灌流の終了（60分）時に評価した。ヘパリンを投与する場合、測定は、ヘパリン投与前（ヘパリン前）に行った。データが平均  $\pm$  SEMとして表示されている。

【0033】

【図16A】図16A - 16C：膜型人工肺灌流実験中の一次止血測定。出血時間（図16A）、出血体積（図16B）および出血速度（図16C）に対するAB054の効果、灌流開始のおおよそ15分後に評価した。各灌流実験中に2回の測定を行った。平均が黒線で示されている。

20

【図16B - 16C】図16A - 16C：膜型人工肺灌流実験中の一次止血測定。出血時間（図16A）、出血体積（図16B）および出血速度（図16C）に対するAB054の効果、灌流開始のおおよそ15分後に評価した。各灌流実験中に2回の測定を行った。平均が黒線で示されている。

【0034】

【図17A - 17B】図17A - 17B：膜型人工肺内への血小板集積。60分灌流実験中に膜型人工肺内へのリアルタイム血小板集積を測定した。（図17A）人工肺をガンマカメラの上に配置し、放出される放射活性を5分枠で記録した。（図17B）血栓が成長している場合の実験後半（30～60分）の1分あたりの平均沈着速度。データが平均  $\pm$  SEMとして表示されている。

30

【0035】

【図18A - 18B】図18A - 18B：膜型人工肺内への最終血小板およびフィブリンの測定。（図18A）60分の膜型人工肺灌流後の最終的な血小板沈着を、すすいで食塩水を充填したデバイスで測定した。（図18B）ヨウ素125標識フィブリン含量を、インジウム-111の放射活性が自然崩壊した後に測定した。データが平均  $\pm$  SEMとして表示されている。

【0036】

【図19】図19：実験のタイムライン。72の血栓形成実験を単一のヒヒにおいて7週間の期間にわたって行った。各研究日に、1つのコラーゲン被覆および直列に接続された1つの組織因子被覆グラフトを利用して、2回の灌流実験（すなわち、各日に4つのグラフトの実験）を行った。ヒヒに各週1用量のAB054（9 mg/kg）を投与し（矢印）、当日ならびに翌日および翌々日に実験を実行した。実験日および処置群が縦線で示されている。AB054の最終投与の後、投与後1週間および2週間の時点で実験を行った。食塩水対照は、第1週目に、および抗体クリアランス後の第7週目に行った。全ての群についてN = 6。

40

【0037】

【図20A - 20D】図20A - 20D：グラフト灌流実験中のaPTTおよびACT測

50

定。a P T T ( 図 2 0 A 、 2 0 B ) および A C T ( 図 2 0 C 、 2 0 D ) を含む凝固パラメーターを、各処置群について灌流の開始 ( 0 分 ) および灌流の終了 ( 6 0 分 ) 時に測定した。データを、時間 ( 図 2 0 A 、 2 0 C ) または処置群 ( 図 2 0 B 、 2 0 D ) により分類した。全ての群について  $N = 6$ 。データが平均  $\pm$  S E M として表示されている。\*\*\* 食塩水に対して  $p < 0.001$ 。

【 0 0 3 8 】

【 図 2 1 A - 2 1 B 】 図 2 1 A - 2 1 B : グラフト灌流実験中の P T 測定。P T を使用する止血評価を、各処置群について灌流の開始 ( 0 分 ) および灌流の終了 ( 6 0 分 ) 時に測定した。データを、時間 ( 図 2 1 A ) または処置群 ( 図 2 1 B ) により分類した。全ての群について  $N = 6$ 。データが平均  $\pm$  S E M として表示されている。

10

【 0 0 3 9 】

【 図 2 2 】 図 2 2 : グラフト灌流実験中の出血測定。出血時間に対する A B 0 5 4 の効果を、灌流開始のおおよそ 1 5 分後に評価した。各灌流実験中に 1 回の測定を行った。平均  $\pm$  S E M を用いて散布図としてデータが示されている。

【 0 0 4 0 】

【 図 2 3 A - 2 3 D 】 図 2 3 A - 2 3 D : コラーゲン被覆グラフト内への血小板集積。6 0 分灌流実験中のコラーゲン被覆グラフト内へのリアルタイム血小板集積。( 図 2 3 A ) グラフト自体の中のグラフト血栓。( 図 2 3 B ) グラフトから遠位のテール血栓。( 図 2 3 C ) 合算したグラフトおよびテール内への総血小板集積。各群について  $N = 6$ 。( 図 2 3 D ) 合算した A B 0 5 4 投与後の全ての実験の総血小板集積 ( A B 0 5 4 後について  $N = 30$  )。データが平均  $\pm$  S E M として表示されている。統計分析を完全血栓 ( 図 2 3 C および 2 3 D ) についてのみ行った ; 食塩水に対して \*\*\*  $p < 0.001$ 。

20

【 0 0 4 1 】

【 図 2 4 A - 2 4 D 】 図 2 4 A - 2 4 D : 組織因子被覆グラフト内への血小板集積。6 0 分灌流実験中の組織因子被覆グラフト内へのリアルタイム血小板集積。( 図 2 4 A ) グラフト自体の中のグラフト血栓。( 図 2 4 B ) グラフトから遠位のテール血栓。( 図 2 4 C ) 合算したグラフトおよびテール内への総血小板集積。各群について  $N = 6$ 。( 図 2 4 D ) 合算した A B 0 5 4 投与後の全ての実験の総血小板集積 ( A B 0 5 4 後について  $N = 30$  )。データが平均  $\pm$  S E M として表示されている。

【 0 0 4 2 】

【 図 2 5 A - 2 5 F 】 図 2 5 A - 2 5 F : コラーゲン被覆グラフト内への最終血小板集積およびコラーゲン被覆グラフト内のフィブリン含量の測定。6 0 分の灌流後のコラーゲン被覆グラフトおよび遠位テール内への最終的な血小板沈着を、すすいで食塩水を充填したシャントループにおいて測定した ( 図 2 5 A ~ 2 5 C )。 $^{111}I n$  の放射活性が自然崩壊した後に  $^{125}I$  標識フィブリン含量を測定した ( 図 2 5 D ~ 2 5 F )。データが平均  $\pm$  S E M として表されている ; 食塩水に対して、\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 。

30

【 0 0 4 3 】

【 図 2 6 A - 2 6 F 】 図 2 6 A - 2 6 F : 組織因子被覆グラフト内への最終血小板集積および組織因子被覆グラフト内のフィブリン含量の測定。6 0 分の灌流後の組織因子被覆グラフトおよび遠位テール内への最終的な血小板沈着を、すすいで食塩水を充填したシャントループにおいて測定した ( 図 2 6 A ~ 2 6 C )。 $^{111}I n$  の放射活性が自然崩壊した後に  $^{125}I$  標識フィブリン含量を測定した ( 図 2 6 D ~ 2 6 F )。データが平均  $\pm$  S E M として表示されている。

40

【 0 0 4 4 】

【 図 2 7 A - 2 7 E 】 図 2 7 A - 2 7 E : 全血球計算。全血球数を、各処置群について灌流の開始 ( 0 分 ) および灌流の終了 ( 6 0 分 ) 時に測定した。測定したパラメーターは、血小板数 ( 図 2 7 A )、ヘマトクリット ( 図 2 7 B )、白血球数 ( 図 2 7 C )、赤血球数 ( 図 2 7 D )、および平均血小板体積 ( 図 2 7 E ) を含んだ。活発な血栓形成中に白血球数は、増加し、血小板は減少するが、他のパラメーターは、変化しないままである。A B

50

054の反復投与は、ヒヒの全血球数数に影響を与えなかった。データが平均±SEMとして表示されている。

【発明を実施するための形態】

【0045】

配列表

添付の配列表に記載されている核酸配列およびアミノ酸配列は、アメリカ合衆国特許法施行規則1.822に規定のヌクレオチド塩基についての標準文字略号およびアミノ酸についての3文字コードを使用して示されている。各核酸配列の1本の鎖のみが示されているが、相補鎖が、表示される鎖へのいずれの言及にも含まれると理解される。配列表は、2019年11月1日に作成して43.2KBのASCIIテキストファイルとして提出

10

配列番号1は、5C12重鎖のアミノ酸配列である。

配列番号2は、5C12VHドメインのアミノ酸配列である。

配列番号3は、5C12軽鎖のアミノ酸配列である。

配列番号4は、5C12VLドメインのアミノ酸配列である。

配列番号5は、5C12重鎖のcDNA配列である。

配列番号6は、5C12軽鎖のcDNA配列である。

配列番号7は、ヒト化HC1重鎖のアミノ酸配列である。

配列番号8は、ヒト化HC1VHドメインのアミノ酸配列である。

配列番号9は、ヒト化LC1軽鎖のアミノ酸配列である。

20

配列番号10は、ヒト化LC1VLドメインのアミノ酸配列である。

配列番号11は、ヒト化HC1重鎖のcDNA配列である。

配列番号12は、ヒト化LC1軽鎖のcDNA配列である。

配列番号13は、ヒト化HC2重鎖のアミノ酸配列である。

配列番号14は、HC2VHドメインのアミノ酸配列である。

配列番号15は、ヒト化HC3重鎖のアミノ酸配列である。

配列番号16は、HC3VHドメインのアミノ酸配列である。

配列番号17は、ヒト化LC2軽鎖のアミノ酸配列である。

配列番号18は、LC2VLドメインのアミノ酸配列である。

配列番号19は、ヒト化LC3軽鎖のアミノ酸配列である。

30

配列番号20は、LC3VLドメインのアミノ酸配列である。

配列番号21は、ヒト化HC2重鎖のcDNA配列である。

配列番号22は、ヒト化LC2軽鎖のcDNA配列である。

配列番号23は、ヒト化HC3重鎖のcDNA配列である。

配列番号24は、ヒト化LC3軽鎖のcDNA配列である。

【0046】

詳細な説明

I. 略号

ACT 活性化凝固時間

aPTT 活性化部分トロンボプラスチン時間

40

AV 動静脈

bpm 1分あたり10億

BT 出血時間

CBC 全血球計算(数)

CTI トウモロコシトリプシンインヒビター

ECMO 体外式膜型人工肺

ECS 体外臓器支援システム

FXII 血液タンパク質第XII因子

FXIIa 活性化FXII

HK 高分子量キノーゲン

50

i . v . 静脈内

M A b モノクローナル抗体

P F 4 血小板第4因子

P K プレカリクレイン

P T プロトロンビン時間

T A T トロンビン - アンチトロンビン複合体

【0047】

II . 用語および方法

別段の断り書きがない限り、専門用語は、従来の用法に従って使用される。分子生物学における一般用語の定義は、Benjamin Lewin, Genes X, published by Jones & Bartlett Publishers, 2009 ; および Meyers et al. (eds.), The Encyclopedia of Cell Biology and Molecular Medicine, published by Wiley-VCH in 16 volumes, 2008 ; および他の同様の参考文献において見つけることができる。

10

【0048】

本開示の様々な実施形態の概説を容易にするために、特定の用語についての以下の説明が提供される。

【0049】

投与：選択された経路による対象への組成物の導入。例えば、選択された経路が静脈内である場合、組成物は、組成物を対象の静脈に導入することにより投与される。

【0050】

抗体：抗原のエピトープを認識し、結合する（例えば、特異的に認識し、特異的に結合する）少なくとも1つの可変領域を含むポリペプチドリガンド。哺乳動物免疫グロブリン分子は、重（H）鎖および軽（L）鎖で構成されており、これらの各々は、可変重鎖（V<sub>H</sub>）領域および可変軽鎖（V<sub>L</sub>）領域とそれぞれ呼ばれる、可変領域を有する。一緒に、V<sub>H</sub>領域およびV<sub>L</sub>領域は、抗体により認識される抗原の結合を担当する。抗体分子の機能活性を決定する哺乳動物免疫グロブリンの5つの主要な重鎖クラス（またはアイソタイプ）：IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEがある。哺乳動物には見られない抗体アイソタイプとしては、IgX、IgY、IgWおよびIgNARが挙げられる。IgYは、鳥類および爬虫類により産生される一次抗体であり、機能的には哺乳動物IgGおよびIgEに類似している。IgWおよびIgNAR抗体は、軟骨魚類により産生され、その一方で、IgX抗体は、両生類に見られる。

20

30

【0051】

抗体可変領域は、「フレームワーク」領域と、「相補性決定領域」または「CDR」としても公知の超可変領域とを含有する。CDRは、抗原のエピトープへの結合を主に担当する。抗体のフレームワーク領域は、三次元空間でCDRを配置するのにおよび整列させるのに役立つ。所与のCDRのアミノ酸配列境界は、いくつかの周知番号付けスキームのいずれかを使用して容易に決定することができ、そのようなスキームには、Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991 ; 「カバット」番号付けスキーム)、Chothia et al. (Chothia and Lesk, J Mol Biol 196:901-917, 1987; Chothia et al., Nature 342:877, 1989を参照されたい); ならびにAl-Lazikani et al., (JMB 273,927-948, 1997 ; 「チョチア」番号付けスキーム)、およびImmunogenetics (IMGT) データベース (Lefranc, Nucleic Acids Res 29:207-9, 2001を参照されたい : 「IMGT」番号付けスキーム) により記載されたものが含まれる。カバットおよびIMGTデータベースは、オンラインで維持されている。

40

【0052】

「単ドメイン抗体」は、さらなる抗体ドメインの非存在下で抗原、または抗原のエピトープを特異的に結合することができる単ドメイン（可変ドメイン）を有する抗体を指す。単ドメイン抗体は、例えば、V<sub>H</sub>ドメイン抗体、V<sub>NAR</sub>抗体、ラクダ化V<sub>HH</sub>抗体、およびV<sub>L</sub>ドメイン抗体を含む。V<sub>NAR</sub>抗体は、軟骨魚類、例えば、コモリザメ、オオ

50

セ科のサメ、ツノザメ科のサメおよびイヌザメにより産生される。ラクダ科動物V<sub>H</sub>H抗体は、軽鎖を天然に欠いている重鎖抗体を産生するいくつかの種、例えば、ラクダ、ラマ、アルパカ、ヒトコブラクダおよびグアナコなどにより産生される。

【0053】

「モノクローナル抗体」は、リンパ球の単クローンにより産生される抗体、または単一抗体のコード配列がトランスフェクトされた細胞により産生される抗体である。モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法により産生される。モノクローナル抗体は、ヒト化モノクローナル抗体を含む。

【0054】

「キメラ抗体」は、ヒトなどの1つの種からのフレームワーク残基と、別の種からのCDR（抗原結合を一般に付与する）とを有する。

10

【0055】

「ヒト化」抗体は、ヒトフレームワーク領域と、非ヒト（例えば、マウス、ウサギ、ラット、サメまたは合成）免疫グロブリンからの1つまたは複数のCDRとを含む、免疫グロブリンである。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは、「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは、「アクセプター」と呼ばれる。一実施形態では、全てのCDRは、ヒト化免疫グロブリンにおけるドナー免疫グロブリンからのものである。定常領域は、存在する必要はないが、存在する場合、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、例えば、少なくとも約85～90%、例えば約95%またはそれより高度に同一でなければならない。したがって、恐らくCDRを除いて、ヒト化免疫グロブリンの全ての部分は、天然ヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。ヒト化抗体は、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化または他のモノクローナル抗体は、抗原結合にも他の免疫グロブリン機能にも実質的に影響を与えない、さらなる保存的アミノ酸置換を有することができる。

20

【0056】

抗凝固薬：血液の凝固を防止または阻害する化合物（例えば、薬学的作用物質または分子）。薬学的抗凝固薬は、血栓性障害、例えば、深部静脈血栓症、肺塞栓症、心筋梗塞および脳卒中を処置するために使用することができる。

【0057】

抗原結合性断片：モノクローナル抗体が生じた抗原に特異的に結合するその能力を保持する、モノクローナル抗体の部分。抗原結合性断片は、Fab断片、Fab'断片、F(ab)<sub>2</sub>断片、単鎖Fvタンパク質（scFv）およびジスルフィド安定化Fvタンパク質を含むが、これらに限定されない。

30

【0058】

抗血栓薬：血栓の形成を防止または阻害する任意の化合物（例えば、薬学的作用物質または分子）。抗血栓剤は、抗凝固薬（血小板が凝塊形成する能力を制限する）、抗血小板薬（血小板の遊走および凝集を制限する）および血栓溶解薬（血餅が形成された後、血餅を溶解する）を含む。

【0059】

結合親和性：抗原に対する抗体の親和性。一実施形態では、親和性は、Frankel et al., Mol. Immunol., 16:101-106, 1979により記載されたスキッチャード法の改良版により計算される。別の実施形態では、結合親和性は、抗原/抗体解離速度により測定される。別の実施形態では、高い結合親和性が競合ラジオイムノアッセイにより測定される。別の実施形態では、結合親和性は、ELISAにより測定される。別の実施形態では、抗体親和性は、フローサイトメトリーにより測定される。抗原（例えば、FXII）に「特異的に結合する」抗体は、高い親和性で抗原に結合するが他の無関係の抗原には有意に結合しない抗体である。

40

【0060】

凝固：液相からゲル相への血液または血漿の変換をもたらす、フィブリンモノマーの重合プロセス。液体の血液の凝固は、in vitroで、血管内で、または露出したおよ

50

び損傷した組織表面で起こり得る。in vitroでの血液凝固は、フィブリノーゲン含量の低減およびフィブリンの対応する増加を除いて、非凝固血に見られるものと本質的に同じ相対比率で細胞成分および他の血液成分を維持するゲル状血液をもたらす。

【0061】

相補性決定領域(CDR)：抗体の結合親和性および特異性を規定する、超可変アミノ酸配列の領域。

【0062】

補体系：感染性生物の溶解、炎症の活性化、オプソニン作用、および免疫クリアランスにおいて大きな役割を果たす、免疫系(特に、自然免疫系)の一部。

【0063】

コンジュゲート：エフェクター分子(例えば、検出可能な標識)または二次タンパク質(例えば、二次抗体)に共有結合で連結されている抗体または抗体断片(例えば、抗原結合性断片)。エフェクター分子は、例えば、薬物、毒素、治療剤、検出可能な標識、タンパク質、核酸、脂質、ナノ粒子、または炭水化物であり得る。抗体コンジュゲートは、「イムノコンジュゲート」と呼ばれることが多い。

【0064】

保存的バリエーション：「保存的」アミノ酸置換は、FXIIに対する抗体などのタンパク質の親和性に実質的に影響を与えず、そのような親和性を実質的に減少させない、置換である。例えば、FXIIに特異的に結合するモノクローナル抗体は、多くても約1つ、多くても約2つ、多くても約5つ、多くても約10または多くても約15の保存的置換しか含まず、FXIIに特異的に結合する。用語「保存的バリエーション」は、抗体がFXIIに特異的に結合することを条件に、未置換親アミノ酸の代わりに置換アミノ酸を使用することも含む。非保存的置換は、FXIIに対する活性または結合を低減させるものである。

【0065】

機能的に類似したアミノ酸をもたらす保存的のアミノ酸置換表は、当業者に周知である。以下の6群は、互いに保存的置換であるとみなされるアミノ酸の例である：

- 1) アラニン(A)、セリン(S)、トレオニン(T)；
- 2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；
- 3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q)；
- 4) アルギニン(R)、リシン(K)；
- 5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)；および
- 6) フェニルアラニン(F)；チロシン(Y)、トリプトファン(W)。

【0066】

接触すること：直接物理的に会合している配置；固体形態と液体形態の両方を含む。

【0067】

検出可能な標識：抗体またはタンパク質などの別の分子に、その分子の検出を容易にするために、直接または間接的にコンジュゲートされる、検出可能な化合物または組成物。検出可能な標識の特定の非限定的な例としては、蛍光タグ、酵素的連結、および放射性同位体が挙げられる。一例では、「標識抗体」は、抗体内への別の分子の組込みを指す。例えば、標識は、検出可能なマーカー、例えば、放射標識アミノ酸の組込み、またはマークを付けたアビジンにより検出することができるビオチン化部分のポリペプチド(例えば、光学的方法もしくは比色法により検出することができる蛍光マーカーまたは酵素的活性を含有するストレプトアビジン)への結合である。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する様々な方法が、当技術分野において公知であり、使用され得る。ポリペプチド用の標識の例としては、次のものが挙げられるが、これらに限定されない：放射性同位体もしくは放射性核種(例えば、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{19}\text{F}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ および $^{125}\text{I}$ )、蛍光標識(例えば、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミン、ランタニドリン光体)、酵素的標識(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)、化学発光マーカー、ビオチン

10

20

30

40

50

化された基、二次レポーターにより認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）、または磁性作用物質、例えばガドリニウムキレート剤。一部の実施形態では、標識は、潜在的立体障害を低減させるために様々な長さのスペーサーアームにより結合される。

#### 【0068】

エピトープ：抗原決定基。これらは、抗原性である（特異的免疫応答を惹起する）分子上の特定の化学基またはペプチド配列である。抗体は、FXIIなどの、ポリペプチド上の特定の抗原エピトープに特異的に結合する。

#### 【0069】

第XII因子（FXIIまたはfXII）：細胞により自然に発現され、血漿中に存在する、ハーゲマン因子としても公知のヒト凝固第XII因子の任意のバリエーション、アイソフォームおよび/または種ホモログ。FXIIは、血液凝固の開始、線維素溶解、ならびにブラジキニンおよびアンジオテンシンの生成に関与する、血漿糖タンパク質である。プレカリクレインは、FXIIにより切断されてカリクレインを形成し、次いで、このカリクレインがFXIIを切断して -FXIIaを形成し、次いでこの -FXIIaがトリプシンにより切断されて -FXIIaを形成する。 -FXIIaは、ジスルフィド結合により連結されている、末端にNH<sub>2</sub>を有する重鎖（凝固第XIIa因子重鎖）および末端にCOOHを有する軽鎖（凝固XIIa因子軽鎖）で構成されている。 -FXIIaは、FXIを活性化してFXIaにする。 -FXIIaはまた、FVII中のArg-|-Ile結合の選択的切断を駆動してFVIIaを形成する。 -FXIIaは、ジスルフィド結合により連結されている2本の鎖と、COOHを末端に有する軽鎖（凝固FXIIa軽鎖）に対応する軽鎖（ -FXIIa部分2）とノナペプチド（ -FXIIa部分1）とで構成されている。FXIIは、ヒスチジンリッチ糖タンパク質（HRG）と相互作用する。亜鉛イオンの存在下で増強され、ヘパリン結合により阻害されるこの相互作用は、fXII自己活性化、および接触により開始される凝固を阻害する。

#### 【0070】

FXIIの欠陥は、ハーゲマン因子欠損症としても公知のFXII欠損症（FA12D）の原因である。この形質は、in vitro血液凝固の無症候性の異常である。その診断は、凝固アッセイにおいてこの因子の低い血漿活性を見つけることに基づく。この低い血漿活性は、通常は、手術前の血液検査によって偶然に発見される。FXII欠損症は、交差反応物質（CRM）陰性群（陰性FXII抗原検出）およびCRM陽性群（陽性FXII抗原検出）の2つのカテゴリーに分けられる。

#### 【0071】

フレームワーク領域：CDR間に介在するアミノ酸配列。フレームワーク領域は、可変軽鎖および可変重鎖フレームワーク領域を含む。フレームワーク領域は、抗原結合のために適切な配向でCDRを保持するのに役立つ。

#### 【0072】

融合タンパク質：2つの異なる（異種）タンパク質の部分を少なくとも含むタンパク質。

#### 【0073】

止血：出血を停止させる生理的プロセス。止血剤は、出血性障害または出血エピソードにより引き起こされる異常な出血などの、異常な出血を防止、処置または改善するものである。止血の障害としては、例えば、血小板障害、例えば特発性血小板減少性紫斑病、および凝固の障害、例えば血友病が挙げられる。止血は、流体状態の血管区画内に血液を維持するための、血管と血小板と凝固因子と凝固インヒビターと線維素溶解タンパク質との複雑な相互作用を指すこともある。止血系の目的は、出血と血栓形成との間のバランスを取るにより血管内の完全性を保つことである。本明細書で使用される場合、「止血を促進すること」は、対象における止血に寄与するまたは止血を改善するプロセスを指す。例えば、止血を促進する薬剤は、異常な出血を、例えば、出血をより迅速に停止させることにより、または失血の量を低減させることにより、低減させる薬剤であり得る。

#### 【0074】

10

20

30

40

50

異種（の）：別個の遺伝源または種に由来すること。

【 0 0 7 5 】

出血傾向の増加：組織傷害後の発現が、突発性である、過剰である、および/または遅延する、出血。

【 0 0 7 6 】

炎症：病原体、損傷細胞または刺激物質などの、有害な刺激に対する体組織の生体防御応答の一部。この防御応答には、免疫細胞、血管および分子メディエーターが関与する。炎症の機能は、細胞傷害の一次的原因を消失させ、最初の損傷によってまたは炎症プロセスによって損傷した壊死細胞を取り除くこと、次いで、組織修復経路を刺激することを助けることである。

10

【 0 0 7 7 】

阻害量または阻害用量：特定の分子の活性の阻害または特定の分子の活性化の阻害を達成するのに十分な特異的物質の量。例えば、阻害量または阻害用量は、対象または試料（例えば、血漿または血清試料）における F X I I の活性化の阻害および/または活性を阻害するために必要な量であり得る。一部の実施形態では、F X I I に特異的なモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片の阻害量は、F X I I の活性を少なくとも 5 0 % 阻害するのに必要な量である。一部の例では、阻害剤量は、F X I I の活性化を 9 0 ~ 1 0 0 % 阻害するのに必要な量である。

【 0 0 7 8 】

虚血性臓器疾患：閉塞性動脈硬化症、パージャー病、レイノー病、心筋梗塞、狭心症、糖尿病性ニューロパチー、脊柱管狭窄症、脳血管障害、脳梗塞、肺高血圧症、骨折、およびアルツハイマー病を含む、臓器への血液供給が縮小、制限または閉塞される疾患、状態（condition）、状態（state）または障害。

20

【 0 0 7 9 】

単離された：「単離された」生体成分、例えば、核酸、タンパク質（抗体を含む）またはオルガネラは、その成分が天然に存在する環境（例えば、細胞）における他の生体成分、例えば、他の染色体および染色体外 DNA、RNA、タンパク質およびオルガネラから離れて実質的に分離または精製されている。「単離された」核酸およびタンパク質は、標準的な精製方法により精製された核酸およびタンパク質を含む。この用語は、宿主細胞において組換え発現により調製された核酸およびタンパク質、ならびに化学合成された核酸も包含する。

30

【 0 0 8 0 】

リンカー：一部の場合には、リンカーは、可変重鎖を可変軽鎖に間接的結合させるのに役立つ抗体結合性断片（例えば、Fv断片）中のペプチドである。「リンカー」は、抗体などの標的化部分を検出可能な標識などのエフェクター分子に連結させるのに役立つペプチドを指すこともある。

【 0 0 8 1 】

用語「コンジュゲートさせること」、「接合させること（joining）」、「結合させること」または「連結させること」は、2つのポリペプチドを1つの連続したポリペプチド分子にすること、または放射性核種または他の分子を scFvなどのポリペプチドに共有結合で付着させることを指す。特異的な文脈では、これらの用語は、抗体部分などのリガンドをエフェクター分子に接合させることへの言及を含む。連結は、化学的手段によることもあり、または組換え手段によることもある。「化学的手段」は、1つの分子を形成するために2分子間に形成された共有結合が存在するように抗体部分とエフェクター分子とが反応することを指す。

40

【 0 0 8 2 】

作動可能に連結された：第1の核酸配列が、第2の核酸配列と機能的関係に置かれている場合、第1の核酸配列は、第2の核酸配列と作動可能に連結されている。例えば、CMVプロモーターなどのプロモーターは、このプロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与える場合、コード配列に作動可能に連結されている。一般に、作動可能に連結

50

されているDNA配列は隣接しており、2つのタンパク質コード領域を接合させることが必要な場合、同じリーディングフレーム内にある。

【0083】

非経口：消化管(alimentary canal)(例えば、消化管(digestive tract))經由以外の、例えば、皮下、筋肉内、胸骨内または静脈内投与による、投与を指す。

【0084】

病的凝固亢進：播種性血管内凝固症候群、心臓発作、脳卒中、冠動脈疾患、深部静脈血栓症、血栓塞栓性疾患、肺塞栓症、血管疾患、外科手術、外傷、悪性腫瘍、血管補綴デバイスの存在、全身麻酔、妊娠、経口避妊薬の使用、全身性エリテマトーデス、感染症、敗血症、糖尿病、自己免疫疾患、膵炎、肝硬変、憩質炎、抗リン脂質抗体症候群、活性化プロテインC抵抗性、プロテインC欠乏症、プロテインS欠乏症、凝固第VII因子レベル上昇、粘着性血小板症候群、ホモシスチン血症(homocystindemia)、アンチトロンビン欠乏症、線維素溶解異常、プロトロンビンG20210A変異、およびトロンボモジュリン変異の際に見られるものなどの、病的に急速なもしくは過剰な血液凝固、または凝固傾向の増加を含む、遺伝性または後天性の状態(condition)、障害または状態(state)。

10

【0085】

薬学的に許容される担体：使用される薬学的に許容される担体は、従来のものである。Remington: The Science and Practice of Pharmacy, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 21<sup>st</sup> Edition (2005)には、本明細書で開示される抗体の薬学的送達に好適な組成物および製剤が記載されている。

20

【0086】

一般に、担体の性質は、用いられる特定の投与様式に依存する。例えば、非経口製剤は、薬学的におよび生理学的に許容される流体、例えば、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、デキストロス水溶液、グリセロールなどをビヒクルとして含む、注射用の流体を通常は含む。固体組成物(例えば、粉剤・散剤(powder)、丸剤、錠剤またはカプセル形態)のための従来の非毒性固体担体としては、例えば、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプンまたはステアリン酸マグネシウムを挙げることができる。生物学的に中性の担体に加えて、投与される医薬組成物は、少量の非毒性補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、保存剤およびpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートを含むし得る。

30

【0087】

疾患を予防すること、処置すること、または改善すること：疾患を「予防すること」は、疾患の完全な発生を阻止することを指す。「処置すること」は、疾患または病態の徴候または症状を、それが発生し始めた後に、改善する治療介入を指す。「改善すること」は、疾患の徴候または症状の数または重症度の低減を指す。

【0088】

精製された：精製されたという用語は、絶対純度を必要とせず、むしろ、相対的用語として意図されている。したがって、例えば、精製されたペプチド調製物は、ペプチドまたはタンパク質が、細胞内のその天然環境にあるペプチドまたはタンパク質よりも富化されている調製物である。一実施形態では、調製物は、タンパク質またはペプチドが調製物の全ペプチドまたはタンパク質含量の少なくとも50%に相当するように精製される。実質的精製は、他のタンパク質または細胞成分からの精製を示す。実質的に精製されたタンパク質は、純度少なくとも60%、70%、80%、90%、95%または98%である。したがって、1つの特異的な非限定的例では、実質的に精製されたタンパク質は、他のタンパク質または細胞成分が90%含まれていない。

40

【0089】

試料(または生体試料)：対象から採取されたゲノムDNA、RNA(mRNAを含む)、タンパク質またはそれらの組合せを含む生物検体。例としては、末梢血、組織、

50

細胞、尿、唾液、組織生検、細針吸引物、手術検体、および剖検材料が挙げられるが、これらに限定されない。

【0090】

配列同一性：アミノ酸または核酸配列間の類似性は、配列同一性とも呼ばれる、配列間の類似性によって表される。配列同一性は、同一性（または類似性または相同性）パーセンテージによって測定されることが多く、パーセンテージが高いほど、2つの配列の類似性が高い。ポリペプチドまたは核酸分子のホモログまたはバリエーションは、標準的な方法を使用してアラインメントされた場合、比較的高い配列同一性を有する。

【0091】

比較のための配列アラインメント法は、当技術分野において周知である。様々なプログラムおよびアラインメントアルゴリズムが、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, Gene 73:237, 1988; Higgins and Sharp, CABIOS 5:151, 1989; Corpet et al., Nucleic Acids Research 16:10881, 1988; および Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, 1988に記載されている。Altschul et al., Nature Genet. 6:119, 1994は、配列アラインメント法および相同性計算の詳細にわたる考慮事項を提供している。

10

【0092】

配列分析プログラム `blastp`、`blastn`、`blastx`、`tblastn` および `tblastx` とともに使用するための、NCBI 基本的なローカルアラインメント検索ツール (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403, 1990) は、米国国立生物工学情報センター (NCBI, Bethesda, MD) をはじめとするいくつかの情報源から、およびインターネット上で入手可能である。このプログラムを使用して配列同一性を決定する方法についての説明は、インターネット上のNCBIのウェブサイトで入手可能である。

20

【0093】

FXII ポリペプチドに特異的に結合する抗体の  $V_H$  のホモログおよびバリエーションは、NCBI Blast 2.0、デフォルトパラメーターに設定したギャップ付き `blastp` を使用して抗体のアミノ酸配列との完全長アラインメントにわたって計数して少なくとも約75%、例えば、少なくとも約80%、90%、95%、96%、97%、98% または99%の配列同一性を有することを典型的に特徴とする。約30アミノ酸より多いアミノ酸数のアミノ酸配列の比較には、デフォルトパラメーター（ギャップ存在コスト11、および残基1個当たりのギャップコスト1）に設定したデフォルト `BLOSUM62` 行列を使用する `Blast 2` 配列関数が用いられる。より短いペプチド（およそ30アミノ酸未満）をアラインメントする場合、アラインメントは、`Blast 2 sequences` 機能を使用して、デフォルトパラメーター（開始ギャップペナルティー9、伸長ギャップペナルティー1）に設定した `PAM30` 行列を用いて行うべきである。参照配列とのよりいっそう高い類似性を有するタンパク質は、この方法により評価されたとき、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98% または少なくとも99%の配列同一性などの、同一性パーセンテージの増加を示す。全体に満たない配列が配列同一性について比較される場合、ホモログおよびバリエーションは、典型的には、10~20アミノ酸の短い制限枠に関して少なくとも80%の配列同一性を有し、参照配列とのそれらの類似性に依存して少なくとも85%または少なくとも90%もしくは95%の配列同一性を有し得る。そのような短い制限枠に関して配列同一性を決定するための方法は、オンライン上のNCBIウェブサイトで入手可能である。これらの配列同一性範囲が、単に助言のために提供されることは当業者には理解される。提供される範囲内に入らない強く有意なホモログが得られることは、十分にあり得る。

30

40

【0094】

固形腫瘍がん：肉腫、癌およびリンパ腫を含む、通常は嚢胞や液体領域がない、異常な

50

組織塊を形成するがんの種類。固形腫瘍がんは、膵臓、乳房、卵巣、前立腺、骨、膀胱、子宮頸、結腸および直腸、子宮内膜、腎臓、口唇および口腔、脳、腎臓、肝臓、皮膚、中皮、肺ならびに甲状腺のがん、またはこれらの転移を含み得る。

【0095】

対象：ヒトおよび非ヒト哺乳動物を含む、ヒト対象と獣医学的对象の両方を含むカテゴリーである、生きている多細胞脊椎生物。一部の実施形態では、対象は、任意の哺乳動物、例えば、ヒト、非ヒト霊長類または獣医学的对象、例えばイヌである。

【0096】

合成の：研究室において人工的手段による産生される。例えば、合成核酸またはタンパク質（例えば、抗体）は、研究室で化学合成され得る。

10

【0097】

治療有効量（または薬学的に有効な量）：処置される対象において所望の効果を達成するのに十分な特異的物質の量。例えば、この有効量は、第XII因子の活性化を阻害するために必要な量であり得る。これらの用語は、抗FXIIモノクローナル抗体の量、またはそのような抗体と、*in vivo*で血栓形成を有効に阻害するためにまたは必要としている患者に対して*in vivo*で測定可能な恩恵を別の形でもたらすために必要とされる別の抗凝固薬または抗血栓剤との組合せの量を示すこともある。対象に投与される場合、所望の*in vitro*効果を達成することが示されている標的組織濃度を達成する投与量が、一般に使用される。正確な量は、治療用組成物の成分および物理的特徴、意図する患者集団、個々の患者の考慮事項などを含むがこれらに限定されない、非常に多くの要因に依存し、当業者は、その正確な量を容易に決定することができる。

20

【0098】

血栓症：循環系を通る血流を閉塞させる、血管内の凝血塊（「血栓」とも呼ばれる）の形成または存在。血栓症は、血液の組成、血管壁の質および/または血流の性質の異常により通常は引き起こされる。凝血塊の形成は、血管壁への傷害（例えば、外傷または感染症からの）によりおよび傷害箇所を通った血流の減速または停滞により引き起こされることが多い。一部の場合には、凝固の異常が血栓症を引き起こす。遊離して体内を移動する凝血塊は、塞栓として公知である。血栓が動脈の内腔の断面積の75%より多くを占めると、酸素の減少（低酸素）および乳酸のような代謝産物の蓄積のため、供給を受ける組織への血流は、症状を引き起こすほどに低減される。90%より高度な閉塞は、酸素の完全枯渇である無酸素症、および細胞死の1様式である梗塞を生じさせる結果となり得る。血栓塞栓症は、血栓症とその主な合併症である塞栓症との組合せである。

30

【0099】

ベクター：宿主細胞に導入されることによって形質転換宿主細胞を生じさせる、核酸分子。ベクターは、複製起点などの、宿主細胞においてそのベクターの複製を可能にする核酸配列を含み得る。ベクターは、1つまたは複数の選択可能なマーカー遺伝子、および当技術分野において公知の他の遺伝子エレメントも含み得る。

【0100】

別段の解説がない限り、本明細書で使用される全ての技術および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。単数形の用語「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈による別段の明確な指示がない限り、複数の指示対象を含む。「AまたはBを含むこと(comprising)」は、A、もしくはBを含むこと(including)、またはAとBを含むこと(including)を意味する。核酸またはポリペプチドについて与えられる、全ての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、および全ての分子量または分子質量値が、近似値であり、説明のために提供されることを、さらに理解されたい。本明細書に記載されるものと同様または同等の方法および材料を本開示の実践または試験の際に使用することができるが、好適な方法および材料が下で説明される。本明細書において言及する全ての出版物、特許出願、特許および他の参考文献は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。矛盾がある場合、用語の説明を含めて、本明細書が優先するものとする。加えて、材料、方法および例は、

40

50

説明に過ぎず、限定することを意図したものではない。

【 0 1 0 1 】

III. FXII特異的モノクローナル抗体

ヒト血液タンパク質第XII因子(FXII)に結合するモノクローナル抗体、例えば、マウスモノクローナル抗体5C12(本明細書では「AB053」とも呼ばれる)またはそのヒト化バージョン(「ヒト化5C12」、「h5C12」または「AB054」とも呼ばれる)が、本明細書で開示される。抗体(またはその抗原結合性断片)は、FXIIと免疫複合体を形成することができ、FXIIの活性を阻害する。開示される抗体の投与は、炎症および血栓症を阻害し、したがって、FXIIの病的活性化によって特徴付けられる疾患および障害を処置するために使用することができる。

10

【 0 1 0 2 】

5C12重鎖、5C12 VHドメイン、5C12軽鎖および5C12 VLドメインのアミノ酸配列が下記に提供される。VHおよびVLドメイン配列中の、IMGTによる各CDRの位置に、下線が付与されている。当業者は、カバットまたはチョチア番号付けスキームなどの任意の他の番号付けスキームを使用して、CDRの境界を容易に決定することができる。重鎖および軽鎖配列の下線付き残基は、定常ドメインを示す。重鎖および軽鎖のcDNA配列も提供される。

【 0 1 0 3 】

5C12重鎖(配列番号1):

【化1】

DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNNLEWMGYIQYSGNTNSNP  
SLKSRISITRDTSKNQFFLHLNSVTTEDTATYYCARWGSFDYWGQGTTTLTVSSAKTTPPSVYP  
LAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYPPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSS  
TWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTTITLTPKVT  
CVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCR  
VNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFPEDITVEWQWNG  
QPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVOQSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPG  
K

20

30

【 0 1 0 4 】

5C12 VHドメイン(配列番号2):

【化2】

DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNNLEWMGYIQYSGNTNSNP  
SLKSRISITRDTSKNQFFLHLNSVTTEDTATYYCARWGSFDYWGQGTTTLTVSS

CDR1: GYSITSGYS(配列番号2の残基26~34)

CDR2: IQYSGNT(配列番号2の残基52~58)

CDR3: ARWGSFDY(配列番号2の残基97~104)

40

【 0 1 0 5 】

5C12軽鎖(配列番号3):

【化3】

QIVLTQSPAIMASPGKVTMTCSASSSVNYMHWYQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPARFS  
GSGSGTSYSLTISSMEAGDAATYYCQQWSGNPPTFGGGTILEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTS  
GGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYER  
HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

50

【 0 1 0 6 】

5 C 1 2 V L ドメイン ( 配列番号 4 ) :

【 化 4 】

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSK~~LASG~~VPARFS  
GSGSGTSYSLTISSMEAGDAATYYCQQWSGNPPTFGGGTILEIK

C D R 1 : S S V N Y ( 配列番号 4 の残基 2 7 ~ 3 1 )

C D R 2 : D T S ( 配列番号 4 の残基 4 9 ~ 5 1 )

C D R 3 : Q Q W S G N P P T ( 配列番号 4 の残基 8 8 ~ 9 6 )

10

【 0 1 0 7 】

5 C 1 2 重鎖 c D N A 配列 ( 配列番号 5 )

【 化 5 】

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAACCTTCTCAGTCACTTTCACTC  
ACCTGCACTGTCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGCAG  
TTTCCAGGAAACAATCTGGAATGGATGGGCTACATACAGTACAGTGGTAACTAATTC  
AACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTC  
CTGCATTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTATTGTGCAAGATGGGGG  
TCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCC  
CCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAATCCATGGTGACCCTG  
GGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCC  
CTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGACAGTCTGACCTCTACACTCTGAGC  
AGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCC  
CACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAA  
GCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAGGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAA  
GGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAA  
GGATGATCCCAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCA  
GACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCAT  
CATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTT  
TCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAG  
GTGTACACCATTCCACCTCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTG  
CATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGC  
CAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCT  
ACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACCTGCTCT

20

30

40

【 化 6 】

GTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGT  
AAA

【 0 1 0 8 】

5 C 1 2 軽鎖 c D N A 配列 ( 配列番号 6 )

## 【化 7】

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCTATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACC  
 ATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAATTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGG  
 CACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCG  
 CTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGG  
 AGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTGGTAACCCACCGACGTTCCGGTGGAG  
 GCACCATACTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCAT  
 CCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACC  
 CCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTG  
 AACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCAC  
 GTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGA  
 CATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT

10

## 【0109】

ヒト化重鎖および軽鎖配列は、抗体 5 C 1 2 について生成された。h 5 C 1 2 重鎖、軽鎖、V H ドメインおよびV L ドメイン配列が下記に示される。

## 【0110】

ヒト化 5 C 1 2 重鎖 (「H C 1」配列番号 7)

20

## 【化 8】

QVQLQESGPGLVKPSQTL~~SLT~~CTVSGYSITSGYSWHWIRQHPGKGLEWIGYIQYSGNTNSNPS  
 LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTA~~VYY~~CARWGSFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFP  
LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS  
SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP  
EVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL  
SLSLG

30

## 【0111】

ヒト化 5 C 1 2 (H C 1) V H ドメイン (配列番号 8)

## 【化 9】

QVQLQESGPGLVKPSQTL~~SLT~~CTVSGYSITSGYSWHWIRQHPGKGLEWIGYIQYSGNTNSNPS  
 LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTA~~VYY~~CARWGSFDYWGQGLVTVSS

40

CDR 1 : G Y S I T S G Y S (配列番号 8 の残基 26 ~ 34)

CDR 2 : I Q Y S G N T (配列番号 8 の残基 52 ~ 58)

CDR 3 : A R W G S F D Y (配列番号 8 の残基 97 ~ 104)

## 【0112】

ヒト化 5 C 1 2 軽鎖 (「L C 1」配列番号 9)

50

【化 1 0】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVNYLHWYQQKPGQAPRRLIYDTSKLATGIPARFSGS  
 GSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSGNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGT  
ASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK  
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0 1 1 3】

ヒト化5C12(LC1)VLドメイン(配列番号10)

10

【化 1 1】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVNYLHWYQQKPGQAPRRLIYDTSKLATGIPARFSGS  
 GSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSGNPPTFGGGTKVEIK

CDR1 : S S V N Y (配列番号10の残基27~31)

CDR2 : D T S (配列番号10の残基49~51)

CDR3 : Q Q W S G N P P T (配列番号10の残基88~96)

【0 1 1 4】

ヒト化5C12重鎖(HC1)cDNA配列(配列番号11)

20

30

40

50

## 【化 1 2】

CAGGTGCAGCTCCAGGAGAGCGGACCCGGTCTGGTGAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCT  
 GACCTGCACCGTGAGCGGCTACTCAATCACCTCTGGCTACAGCTGGCACTGGATCAGGCA  
 GCACCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATTGGCTATATCCAGTACAGCGGCAACACCAACA  
 GCAACCCAGCCTCAAGAGCAGGGTGACCATCAGCAGGGATACAAGCAAGAACCAGTTC  
 AGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGTG  
 GGGCAGCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTTCTGCTAGCACCAA  
 GGGCCCCAGCGTGTTCCTCTCGCTCCCTGCAGCCGGAGCACATCCGAGAGCACCGCTGC  
 TCTGGGCTGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTCAGCTGGAATAGCGG  
 CGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCCCGCTGTCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAG  
 CCTGAGCTCCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGAACAAAGACCTACACCTGCA  
 ACGTGGACCATAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAATCCAAGTATGGA  
 CCCCCCTGTCTCCTTGCCCTGCTCCTGAATTTCTCGGAGGCCCTCCGTCTTCTGTTTCC  
 CCCCAGCCAAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACACCCGAAGTCACCTGCGTCGTGGT  
 GGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGAGTGGAGG  
 TGCATAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCGTG  
 TCCGTGCTCACCGTCCTGCATCAGGATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT  
 GTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCTAAGGGCCAAC  
 CTCGGGAGCCCCAAGTGTATAACCCTCCCTCCCAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAA  
 GTGAGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCCTCCGACATCGCTGTGGAATGGGAA  
 AGCAATGGCCAACCTGAGAACAATAACAAGACCACACCCCCGTGCTGGACTCCGATGG  
 CTCTTCTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAATCCCGGTGGCAAGAGGGAAACG  
 TGTTACAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCT  
 CCCTGAGCCTCGGCTAGTAA

10

20

30

## 【0 1 1 5】

ヒト化5C12軽鎖(LC1)cDNA配列(配列番号12)

## 【化 1 3】

GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGCAACCCTGAGCTTGAGCCCCGGTGAGAGGGCCAC  
 CCTGTCATGCAGGGCCAGCAGCAGCGTGAACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCG  
 GTCAAGCCCCCAGGAGGCTGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCACCGGCATCCCCGCC  
 AGGTTTTCCGGCAGCGGGTCAGGCACCGACTACACCCTACCATAAGCAGCCTGGAGCC  
 CGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGTGAGCAGTGGAGCGGCAACCCACCTACCTTTGGCGG  
 AGGCACTAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCC  
 CAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCT  
 ACCCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG  
 CCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC  
 TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC  
 CAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAA

40

50



## 代替ヒト化重鎖および軽鎖配列

ヒト化プロセス中に、合計3つのヒト化重鎖（HC1、HC2、HC3）および3つのヒト化軽鎖（LC1、LC2、LC3）配列が開発された。ヒト化重鎖および軽鎖の可能な組合せ9つ全てを含むヒト化抗体が生成され、試験された：（1）HC1+LC1、（2）HC1+LC2、（3）HC1+LC3、（4）HC2+LC1、（5）HC2+LC2、（6）HC2+LC3、（7）HC3+LC1、（8）HC3+LC2、および（9）HC3+LC3。試験された全ての抗体は、FXIIに対して同様の結合親和性を示し、同様のFXII阻害活性を有した（aPTTアッセイにより決定して）。

## 【0120】

ヒト化5C12抗体（「AB054」とも呼ばれる）は、HC1+LC1（配列番号8および10）から構成される。HC2、HC3、LC2およびLC3の重鎖、VHドメイン、軽鎖、VLドメインおよびcDNA配列が下記に示される。マウス5C12 HC、ヒト化5C12 HC、HC2およびHC3のCDR配列は同一であり、マウス5C12 LC、ヒト化5C12 LC、LC2およびLC3のCDR配列は同一であり、フレームワーク残基のみが、重鎖および軽鎖配列中で異なる。

## 【0121】

HC2重鎖（配列番号13）

## 【化17】

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGTGYSITSGYSWHWIRQHPGKGLEWMGYIQYSGNTNSNP  
 SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGSFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVF  
 PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
 SSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT  
 PEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
 KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
 EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
 LSLSLG

## 【0122】

HC2 VHドメイン（配列番号14）

## 【化18】

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGTGYSITSGYSWHWIRQHPGKGLEWMGYIQYSGNTNSNP  
 SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGSFDYWGQGLVTVSS

CDR1：GYSITSGYS（配列番号14の残基26～34）

CDR2：IQYSGNT（配列番号14の残基52～58）

CDR3：ARWGSFDY（配列番号14の残基97～104）

## 【0123】

HC3重鎖（配列番号15）

10

20

30

40

50

【化19】

DVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSGYSWHWIRQPPGKGLEWIGYIQYSGNTNSNPS  
 LKSRVTISRDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARWGSFDYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFP  
 LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS  
 SSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP  
 EVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
 EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
 WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL  
 SLSLG

10

【0124】

HC3 VHドメイン (配列番号16)

【化20】

DVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSGYSWHWIRQPPGKGLEWIGYIQYSGNTNSNPS  
 LKSRVTISRDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARWGSFDYWGQGTMTVTVSS

CDR1 : G Y S I T S G Y S (配列番号16の残基26~34)

20

CDR2 : I Q Y S G N T (配列番号16の残基52~58)

CDR3 : A R W G S F D Y (配列番号16の残基97~104)

【0125】

LC2 軽鎖 (配列番号17)

【化21】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVNYLHWYQQKPGQAPKRWIYDTSKLATGIPARFSG  
 SGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSGNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
 TASVVCLLNFPYAPREKVKWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKH  
 KVVACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

【0126】

LC2 VLドメイン (配列番号18)

【化22】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVNYLHWYQQKPGQAPKRWIYDTSKLATGIPARFSG  
 SGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSGNPPTFGGGTKVEIK

CDR1 : S S V N Y (配列番号18の残基27~31)

40

CDR2 : D T S (配列番号18の残基49~51)

CDR3 : Q Q W S G N P P T (配列番号18の残基88~96)

【0127】

LC3 軽鎖 (配列番号19)

【化23】

DIVLTQTPATLSLSPGERATLSCRASSSVNYLHWYQQKPGQAPKRLIYDTSKLATGIPARFSGS  
 GSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSGNPPTFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT  
 ASVVCLLNFPYAPREKVKWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHK  
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

50

【 0 1 2 8 】

L C 3 V L ドメイン ( 配列番号 2 0 )

【 化 2 4 】

DIVLTQTPATLSLSPGERATLSCRASSSVNYLHWYQQKPGQAPKRLIYDTSKLATGIPARFSGS  
GSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSGNPPTFGQGTRLEIK

C D R 1 : S S V N Y ( 配列番号 2 0 の残基 2 7 ~ 3 1 )

C D R 2 : D T S ( 配列番号 2 0 の残基 4 9 ~ 5 1 )

C D R 3 : Q Q W S G N P P T ( 配列番号 2 0 の残基 8 8 ~ 9 6 )

10

【 0 1 2 9 】

H C 2 重鎖 c D N A 配列 ( 配列番号 2 1 )

【 化 2 5 】

GACGTGCAGCTCCAGGAGAGCGGACCCGGTCTGGTGAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCT  
GACCTGCACCGTGACCGGCTACTCAATCACCTCTGGCTACAGCTGGCACTGGATCAGGCA  
GCACCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCCAGTACAGCGGCAACACCAACA  
GCAACCCAGCCTCAAGAGCAGGGTGACCATCAGCAGGGATAACAAGCAAGAACCAGTTC  
AGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGTG  
GGGCAGCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCCTGTCTTCTGCTAGCACCAA  
GGGCCCCAGCGTGTTCCTCTCGCTCCCTGCAGCCGGAGCACATCCGAGAGCACCGCTGC  
TCTGGGCTGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTCAGCTGGAATAGCGG  
CGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCCCGCTGTCTCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAG  
CCTGAGCTCCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGAACAAAGACCTACACCTGCA  
ACGTGGACCATAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGAATCCAAGTATGGA  
CCCCCTGTCTCCTTGCCCTGCTCCTGAATTTCTCGGAGGCCCTCCGTCTTCCTGTTTCC  
CCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACACCCGAAGTCACCTGCGTCGTGGT  
GGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGAGTGGAGG  
TGCATAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCGTG  
TCCGTGCTCACCGTCTGCATCAGGATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT  
GTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCTAAGGGCCAAC  
CTCGGGAGCCCAAGTGTATACCTCCCTCCCAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAA  
GTGAGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCCTCCGACATCGCTGTGGAATGGGAA  
AGCAATGGCCAACCTGAGAACAATAAAGACCACACCCCCCGTGTGGACTCCGATGG  
CTCCTTCTCCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAATCCCGGTGGCAAGAGGGAAACG

20

30

40

【 化 2 6 】

TGTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCT  
CCCTGAGCCTCGGCTAGTAA

【 0 1 3 0 】

L C 2 軽鎖 c D N A 配列 ( 配列番号 2 2 )

50

【化 2 7】

GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGCAACCCTGAGCTTGAGCCCCGGTGAGAGGGCCAC  
 CCTGTCATGCAGGGCCAGCAGCAGCGTGAACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCG  
 GTCAAGCCCCCAAGAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCACCGGCATCCCCGCC  
 AGGTTTTCCGGCAGCGGGTCAGGCACCGACTACACCCTCACCATAAGCAGCCTGGAGCC  
 CGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGTCAGCAGTGGAGCGGCAACCCACCTACCTTTGGCGG  
 AGGCACTAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCTCC  
 CAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTCT  
 ACCCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG  
 CCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC  
 TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC  
 CAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAA

10

【 0 1 3 1】

H C 3 重鎖 c D N A 配列 ( 配列番号 2 3 )

【化 2 8】

GACGTGCAGCTCCAGGAGAGCGGACCCGGTCTGGTGAAGCCCAGCGAGACCCTGAGCCT  
 GACCTGCACCGTGAGCGGCTACTCAATCACCTCTGGCTACAGCTGGCACTGGATCAGGCA  
 GCCACCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATTGGCTATATCCAGTACAGCGGCAACACCAACA  
 GCAACCCAGCCTCAAGAGCAGGGTGACCATCAGCAGGGATACAAGCAAGAACCAGTTC  
 AGCCTGAGGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGTG  
 GGGCAGCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCATGGTGACCGTGTCTTCTGCTAGCACCAA  
 GGGCCCCAGCGTGTTCCTCTCGCTCCCTGCAGCCGGAGCACATCCGAGAGCACCGCTGC  
 TCTGGGCTGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTCAGCTGGAATAGCGG  
 CGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCCCGCTGTCTGTCAGAGCAGCGGCCTGTACAG  
 CCTGAGCTCCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGAACAAAGACCTACACCTGCA  
 ACGTGGACCATAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAATCCAAGTATGGA  
 CCCCCCTGTCTCCTTGCCCTGCTCCTGAATTTCTCGGAGGCCCTCCGTCTTCCTGTTTCC  
 CCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACACCCGAAGTCACCTGCGTCGTGGT  
 GGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGAGTGGAGG  
 TGCATAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCGTG  
 TCCGTGCTCACCGTCTGTCATCAGGATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT  
 GTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCTAAGGGCCAAC  
 CTCGGGAGCCCCAAGTGTATAACCCTCCCTCCAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAA  
 GTGAGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCCTCCGACATCGCTGTGGAATGGGAA  
 AGCAATGGCCAACCTGAGAACAACACTACAAGACCACACCCCCCGTGTGGACTCCGATGG

20

30

40

【化 2 9】

CTCCTTCTTCCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAATCCCGGTGGCAAGAGGGAAACG  
 TGTTACAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCT  
 CCCTGAGCCTCGGCTAGTAA

50

## 【 0 1 3 2 】

L C 3 軽鎖 c D N A 配列 ( 配列番号 2 4 )

## 【 化 3 0 】

GACATCGTGCTGACCCAGACCCCAGCAACCCTGAGCTTGAGCCCCGGTGAGAGGGCCAC  
 CCTGTCATGCAGGGCCAGCAGCAGCGTGAACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCCG  
 GTCAAGCCCCCAAGAGGCTGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCACCGGCATCCCCGCC  
 AGGTTTTCCGGCAGCGGGTCAGGCACCGACTACACCCTCACCATAAGCAGCCTGGAGCC  
 CGAGGACTTCGCCGTGTAATACTGTCAGCAGTGGAGCGGCAACCCACCTACCTTTGGCCA  
 GGGCACTAGGTTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCTCC  
 CAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCT  
 ACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG  
 CCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC  
 TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC  
 CAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAA

10

## 【 0 1 3 3 】

F X I I に結合する ( 例えば、特異的に結合する ) モノクローナル抗体または抗原結合性断片が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、モノクローナル抗体または抗原結合性断片は、V H ドメインとV L ドメインとの両方を含む。

20

## 【 0 1 3 4 】

一部の実施形態では、F X I I に結合するモノクローナル抗体または抗原結合性断片は、抗体5 C 1 2 からの少なくとも1つのC D R 配列を含む。一部の実施形態では、C D R 配列は、I M G T、カバットまたはチョチア番号付けスキームを使用して決定される。

## 【 0 1 3 5 】

一部の実施形態では、F X I I 特異的モノクローナル抗体または抗原結合性断片は、V H ドメインおよびV L ドメインを含み、抗体のV H ドメインは、配列番号2の1つ、2つまたは3つ全てのC D R 配列を含む、および/または抗体のV L ドメインは、配列番号4の1つ、2つまたは3つ全てのC D R 配列を含む。一部の例では、V H ドメインは、配列番号2の残基26~34、52~58および97~104を含み、V L ドメインは、配列番号4の残基27~31、49~51および88~96を含む。

30

## 【 0 1 3 6 】

特定の例では、V H ドメインは、配列番号2のC D R 配列を含み、V H ドメインのアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号8、配列番号14または配列番号16と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一であり、V L ドメインは、配列番号4のC D R 配列を含み、V L ドメインのアミノ酸配列は、配列番号4、配列番号10、配列番号18または配列番号20と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。特定の非限定的な例では、V H ドメインのアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号8、配列番号14または配列番号16を含むかまたはそれからなり、V L ドメインのアミノ酸配列は、配列番号4、配列番号10、配列番号18または配列番号20を含むかまたはそれからなる。1つの非限定的な例では、V H ドメインのアミノ酸配列は、配列番号8を含むかまたはそれからなり、V L ドメインのアミノ酸配列は、配列番号10を含むかまたはそれからなる。

40

## 【 0 1 3 7 】

一部の実施形態では、モノクローナル抗体または抗原結合性断片は、完全な重鎖および/または完全な軽鎖を含む。一部の例では、重鎖は、配列番号2のC D R 配列を含み、重

50

鎖のアミノ酸配列は、配列番号 1、配列番号 7、配列番号 13 または配列番号 15 と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98% または少なくとも 99% 同一である、および/または軽鎖は、配列番号 4 の CDR 配列を含み、軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号 3、配列番号 9、配列番号 17 または配列番号 19 と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98% または少なくとも 99% 同一である。特定の非限定的な例では、重鎖のアミノ酸配列は、配列番号 1、配列番号 7、配列番号 13 もしくは配列番号 15 を含むかもしくははそれからなる、および/または軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号 3、配列番号 9、配列番号 17 もしくは配列番号 19 を含むかもしくははそれからなる。1つの非限定的な例では、重鎖のアミノ酸配列は、配列番号 7 を含むかまたはそれからなり、軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号 9 を含むかまたはそれからなる。

10

## 【0138】

FXII 特異的抗原結合性断片は、例えば、Fab 断片、Fab' 断片、F(ab)<sub>2</sub> 断片、単鎖可変断片 (scFv) またはジスルフィド安定化可変断片 (dsFv) であり得る。一部の実施形態では、抗原結合性断片は、scFv である。

## 【0139】

FXII 特異的モノクローナル抗体は、IgG、IgM、IgA、IgD または IgE などの、任意のアイソタイプのものであり得る。一部の実施形態では、モノクローナル抗体は、IgG である。

20

## 【0140】

一部の実施形態では、モノクローナル抗体または抗原結合性断片は、ヒト化抗体または抗原結合性断片である。一部の例では、ヒト化抗体の VH ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 2 の CDR 配列を含み、配列番号 8 と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98% または少なくとも 99% 同一である、および/またはヒト化抗体の VL ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 4 の CDR 配列を含み、配列番号 10 と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98% または少なくとも 99% 同一である。特異的な非限定的な例では、VH ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 8 を含むかもしくははそれからなる、および/または VL ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 10 を含むかもしくははそれからなる。

30

## 【0141】

一部の実施形態では、ヒト化モノクローナル抗体または抗原結合性断片は、完全な重鎖および/または完全な軽鎖を含む。一部の例では、重鎖は、配列番号 2 の CDR 配列を含み、重鎖のアミノ酸配列は、配列番号 7 と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% 同一である、および/または軽鎖は、配列番号 4 の CDR 配列を含み、軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号 9 と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% 同一である。特定の非限定的な例では、重鎖のアミノ酸配列は、配列番号 7 を含むかもしくははそれからなる、および/または軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号 9 を含むかもしくははそれからなる。

40

## 【0142】

一部の実施形態では、モノクローナル抗体または抗原結合性断片は、キメラまたは合成抗体または抗原結合性断片である。

## 【0143】

本明細書で開示されるモノクローナル抗体または抗原結合性断片と異種タンパク質またはペプチドとを含む融合タンパク質も本明細書で提供される。一部の実施形態では、異種タンパク質は、Fc タンパク質である。一部の例では、Fc タンパク質は、マウス Fc またはヒト Fc タンパク質である。

50

## 【0144】

本明細書で開示されるモノクローナル抗体または抗原結合性断片と、これらに限定されないがフルオロフォア、酵素または放射性同位体などの、検出可能な標識とを含む、抗体コンジュゲートが、さらに提供される。

## 【0145】

薬学的に許容される担体と本明細書で開示されるモノクローナル抗体または抗原結合性断片とを含む組成物も提供される。

## 【0146】

本明細書で開示されるモノクローナル抗体または抗原結合性断片をコードする核酸分子も提供される。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号5、配列番号6、配列番号11、配列番号12、配列番号21、配列番号22、配列番号23または配列番号24と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。一部の例では、核酸分子は、配列番号5、配列番号6、配列番号11、配列番号12、配列番号21、配列番号22、配列番号23および/または配列番号24のヌクレオチド配列を含む。特定の非限定的な例では、核酸分子は、配列番号11および/または配列番号12を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、プロモーターに作動可能に連結されている。記載の核酸分子を含むベクターが、さらに提供される。本明細書で開示される核酸分子およびベクターを含む細胞も提供される。

## 【0147】

試料中のFXIIを検出する方法が、さらに提供される。一部の実施形態では、方法は、本明細書で開示されるモノクローナル抗体または抗原結合性断片と試料を接触させるステップ、および抗体の試料への結合を検出するステップを含む。一部の例では、モノクローナル抗体または抗原結合性断片は、直接標識される。他の例では、方法は、モノクローナル抗体または抗原結合性断片を二次抗体と接触させるステップ、および二次抗体のモノクローナル抗体または抗原結合性断片への結合を検出するステップをさらに含む。

## 【0148】

FXIIを含む試料中のFXIIの活性化および/または活性を阻害する*in vitro*方法も提供される。一部の実施形態では、方法は、本明細書で開示されるFXII特異的抗体または抗原結合性断片と試料を接触させるステップを含む。特定の例では、試料は、血液または血漿試料を含む。一部の例では、方法は、FXIIaの活性を阻害する方法である。

## 【0149】

対象におけるFXIIの活性化および/または活性を阻害する方法が、さらに提供される。一部の実施形態では、方法は、本明細書で開示される抗体または抗原結合性断片の有効量を対象に投与するステップを含む。対象におけるFXIIの活性化および/または活性が関与する病的プロセスを処置する方法も提供される。一部の実施形態では、方法は、本明細書で開示される抗体または抗原結合性断片の有効量を対象に投与するステップを含む。対象におけるFXIIの活性化および/または活性が関与する血栓症を阻害する方法が、さらに提供される。一部の実施形態では、方法は、本明細書で開示される抗体または抗原結合性断片の有効量を対象に投与するステップを含む。一部の例では、方法は、FXIIaの活性を阻害するステップを含む。

## 【0150】

方法の一部の実施形態では、対象は、細菌感染症、真菌感染症、ウイルス感染症、寄生虫感染症、虚血性臓器疾患、微小血管血栓症、大血管血栓症、血栓塞栓症、播種性血管内凝固症候群、重症全身性炎症反応症候群、FXIIa活性が関与するアレルギー反応もしくは炎症反応、急性呼吸窮迫症候群、がん、羊水塞栓症、外傷、移植拒絶反応、鎌状赤血球症、自己免疫疾患を患っているもしくは発症するリスクがある、または医療デバイス移植を受けている。一部の例では、虚血性臓器疾患は、心筋梗塞または虚血性脳卒中である。一部の例では、がんは、非転移性固形腫瘍がん、転移性固形腫瘍がんまたは白血病であ

10

20

30

40

50

る。一部の例では、医療デバイス移植は、カテーテル、心臓弁、ステントまたはグラフトの移植である。一部の例では、方法は、第2の抗凝固療法または抗血栓もしくは血栓溶解療法の有効量を対象に投与するステップをさら含む。

#### 【0151】

開示される方法の一部の実施形態では、モノクローナル抗体または抗原結合性断片は、非経口投与により投与される。一部の実施形態では、モノクローナル抗体または抗原結合性断片は、約0.1 mg/kg ~ 約2 g/kg、または約0.1 mg/kg ~ 約20 mg/kg、例えば、約0.5 mg/kg ~ 約10 mg/kg、または約1 mg/kg ~ 約5 mg/kgの用量で投与される。一部の例では、モノクローナル抗体または抗原結合性断片は、約0.1、約0.25、約0.5、約0.75、約1.0、約2.5、約5.0、約7.5、約10、約12.5、約15、約17.5、約20 mg/kg、約50 mg/kg、約75 mg/kg、約100 mg/kg、約200 mg/kg、約500 mg/kg、約1000 mg/kgまたは約2 g/kgの用量で投与される。

10

#### 【0152】

開示されるモノクローナル抗体、抗原結合性断片、融合タンパク質、抗体コンジュゲート、組成物、核酸分子、ベクターまたは単離された細胞を含むキットが、本開示によりさらに提供される。キットは、例えば、使用説明資料、バッファー、細胞培養培地、薬学的に許容される担体または希釈剤などをさらにも含む。

#### 【0153】

#### IV. 抗体コンジュゲート

検出可能な標識などの剤にコンジュゲートされた本明細書で開示されるモノクローナル抗体または抗原結合性断片を含む、抗体コンジュゲートが、本明細書で提供される。診断および治療目的の両方に関して、本明細書で開示される抗体または抗原結合性断片に剤を連結または共有結合させることができる。そのような分子または部分は、これらに限定されないが、エフェクターまたはレポーター分子であり得る。レポーター分子は、アッセイを使用して検出することができる任意の部分と定義される。抗体にコンジュゲートとされたレポーター分子の非限定的な例としては、酵素、放射標識、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、発色団、発光分子、光親和性分子、着色粒子、またはリガンド、例えばビオチンが挙げられる。

20

#### 【0154】

抗体コンジュゲートのある特定の例は、抗体が検出可能な標識に連結されているコンジュゲートである。検出可能な標識は、それらの特異的機能特性および/または化学的特性のため検出することができる化合物および/またはエレメントであり、それらの使用により、それらに結合している抗体を検出することおよび/または所望に応じてさらに定量することが可能になる。

30

#### 【0155】

抗体コンジュゲートは、診断剤として使用することができる。抗体診断薬は、*in vitro*診断において、例えば、様々なイムノアッセイにおいて使用されるもの、および/または一般に「抗体によるイメージング」として公知の*in vivo*診断プロトコールで使用されるものという、一般に2つのクラスに入る。

40

#### 【0156】

多くの適切なイメージング剤が、当技術分野において公知であり、抗体へのそれらの結合のための方法も公知である（例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,021,236号、同第4,938,948号および同第4,472,509号を参照されたい）。イメージング部分は、例えば、常磁性イオン、放射性同位体、蛍光色素、またはNMRで検出可能な物質であり得る。

#### 【0157】

例示的な常磁性イオンとしては、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジ

50

ウム ( I I )、テルビウム ( I I I )、ジスプロシウム ( I I I )、ホルミウム ( I I I ) および / またはエルビウム ( I I I ) が挙げられるが、これに限定されない。X 線イメージングなどの、他の状況で有用なイオンとしては、ランタン ( I I I )、金 ( I I I )、鉛 ( I I ) およびビスマス ( I I I ) が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【 0 1 5 8 】

治療および / または診断適用のための例示的な放射性同位体としては、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{19}\text{F}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$  および  $^{125}\text{I}$  が挙げられるが、これらに限定されない。放射性標識されたモノクローナル抗体は、当技術分野において周知の方法に従って産生することができる。例えば、モノクローナル抗体を、ヨウ化ナトリウムおよび / またはカリウムならびに化学的酸化剤、例えば次亜塩素酸ナトリウム、または酵素的酸化剤、例えばラクトペルオキシダーゼとの接触により、ヨウ素化することができる。モノクローナル抗体を、リガンド交換プロセスにより、例えば、過テクネチウム酸塩を第一スズ溶液で還元し、還元されたテクネチウムに SEPHADEX ( 商標 ) カラム上でキレートを形成させ、このカラムに抗体を適用することにより、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  で標識することができる。あるいは、例えば、過テクネチウム酸塩と、還元剤、例えば  $\text{SnCl}_2$  と、緩衝液、例えばフタル酸カリウムナトリウム溶液と、抗体とをインキュベートすることによる、直接標識技術を使用することができる。金属イオンとして存在する放射性同位体を抗体に結合させるために使用されることが多い中間官能基は、ジエチレントリアミン五酢酸 ( DTPA ) またはエチレンジアミン四酢酸 ( EDTA ) である。

#### 【 0 1 5 9 】

コンジュゲートとしての使用が企図される蛍光標識としては、Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630 / 650、BODIPY 650 / 665、BODIPY - FL、BODIPY - R6G、BODIPY - TMR、BODIPY - TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6 - FAM、フルオレセインイソチオシアネート、HEX、6 - JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、Rhodamine Green、Rhodamine Red、Renografin、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミン、および / または Texas Red が ( これらに限定されないが ) 挙げられる。

#### 【 0 1 6 0 】

企図される抗体コンジュゲートの他のタイプは、抗体が二次結合リガンドにおよび / または発色性基質との接触時に着色生成物を生成する酵素 ( 酵素タグ ) に連結されている、主として *in vitro* での使用を企図されたものである。好適な酵素の例としては、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼまたはグルコースオキシダーゼが挙げられる。二次結合リガンドとしては、ビオチンならびに / またはアビジンおよびストレプトアビジン化合物が挙げられる。そのような標識の使用は、当業者に周知であり、例えば、米国特許第 3,817,837 号、同第 3,850,752 号、同第 3,939,350 号、同第 3,996,345 号、同第 4,277,437 号、同第 4,275,149 号および同第 4,366,241 号に記載されており、各々が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【 0 1 6 1 】

アジド基を含有する分子を使用して、低強度紫外線により生成される反応性ニトレン中間体によってタンパク質との共有結合を形成することもできる ( Potter & Haley, 1983 )。特に、プリンヌクレオチドの 2 - および 8 - アジドアナログは、粗細胞抽出物中のヌクレオチド結合タンパク質を同定するために部位特異的フォトプローブとして使用されている ( Owens & Haley, 1987 ; Atherton et al., 1985 )。2 - および 8 - アジドヌクレオチドは、精製タンパク質のヌクレオチド結合ドメインをマッピングするためにも使用されており ( Khatoon et al., 1989 および Dholakia et al., 1989 )、これらのヌクレオチドを抗体結合剤として使用することができる。

10

20

30

40

50

## 【0162】

抗体のそのコンジュゲート部分への結合またはコンジュゲーションのためのいくつかの方法が、当技術分野において公知ある。一部の結合方法は、例えば、米国特許第4,472,509号および同第4,938,948号(各々が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているものなどの有機キレート剤を用いる、金属キレート錯体の使用を含む。モノクローナル抗体をグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩などのカップリング剤の存在下で酵素と反応させることもできる。フルオレセインマーカを有するコンジュゲートは、これらのカップリング剤の存在下で、またはイソチオシアン塩との反応により、調製される。米国特許第4,938,948号では、乳房腫瘍のイメージングは、モノクローナル抗体の使用により達成され、検出可能なイメージング部分は、メチル-p-ヒドロキシベンズイミデートまたはN-スクシンイミジル-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネートなどのリンカーを使用して抗体に結合される。

10

## 【0163】

他の実施形態では、抗体結合部位を変えない反応条件を使用して免疫グロブリンのFc領域内にスルフヒドリル基を選択的に導入することによる、免疫グロブリンの誘導体化が企図される。この方法論に従って産生される抗体コンジュゲートは、改善された寿命、特異性および感度を示すことが開示されている(参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,196,066号)。レポーターまたはエフェクター分子がFc領域の炭水化物残基にコンジュゲートされる、エフェクターまたはレポーター分子の部位特異的結合も、文献で開示されている。この手法は、現在臨床評価中である診断および治療に有望な抗体を産生することが報告されている。

20

## 【0164】

別の実施形態では、*in vivo*での安定性および半減期を改善するために免疫グロブリンを改変することを選択することができる。PEG化は、ポリエチレングリコール(PEG)ポリマー鎖の抗体への共有結合による付着を含む、1つのそのようなプロセスである。PEG化は、PEGの反応性誘導体と標的分子のインキュベーションにより日常的に果たされている。PEGの共有結合による付着は、抗体を宿主の免疫系から「遮蔽する」(免疫原性および抗原性を低減させる)ことができ、腎クリアランスを低減させることによりその循環時間を延長する薬剤の流体力学的サイズ(溶液中でのサイズ)を増加することができる。PEG化は、水溶性をもたらすこともできる。抗体を改変するために使用される他のポリマーとしては、ポリエチレンイミンおよびポリリシンが挙げられ、これらは、コハク酸基によって連結されることが多い。

30

## 【0165】

## V. 免疫検出法

なおさらなる実施形態では、生体成分を、そのような成分と免疫学的に反応する抗体を使用して、結合、精製、除去、定量および/または別様に一般に検出するための、免疫検出法が、提供される。一部の免疫検出法としては、少し例を挙げるだけでも、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫放射定量アッセイ、フルオロイムノアッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、およびウェスタンブロットが挙げられる。様々な有用な免疫検出法のステップが当技術分野において周知であり、当業者はそのようなステップを容易に行うことができる。

40

## 【0166】

一般に、免疫結合法は、目的の標的を含有する試料を得るステップ、および免疫複合体の形成を可能にするのに有効な条件下で標的と免疫学的に反応する一次抗体と試料を接触させるステップを含む。次いで、様々な異なる方式を使用して、抗体の標的への結合を評価することができる。

## 【0167】

一形式では、抗体を、例えばカラムマトリックスの形態の、固体支持体に連結させることができ、固定された抗体に、標的を含有すると疑われる試料が適用される。不必要な成分は、カラムから洗浄され、したがって、固定抗体と免疫複合体を形成している標的を残

50

して溶出される。

【0168】

免疫結合法は、試料中の標的の量を検出および定量するための、ならびに結合プロセス中に形成された任意の免疫複合体の検出および定量のための方法も含む。ここで、標的を含有すると疑われる試料を得、標的に対する抗体と試料を接触させ、次いで、特異的条件下で形成された免疫複合体を検出し、そのような複合体の数を定量する。

【0169】

抗原検出に関して、分析される生体試料は、例えば、血液、血清、血漿、粘液、尿、唾液、涙液または精液のような体液などの、標的を含有すると疑われる任意の試料であり得る。あるいは、組織を使用することができる。免疫複合体（一次免疫複合体）の形成を可能にするのに有効な条件下で、かつ十分な期間、抗体と選択された生体試料とを接触させることは、一般に、単に、試料に抗体組成物を添加すること、および抗体が、存在する抗体との免疫複合体を形成する（存在する抗体と免疫学的に反応する標的に結合する）のに十分な期間にわたって、混合物をインキュベートすることだけである。この時間の後、組織選択、ELISAプレート、ドットプロットまたはウェスタンプロットなどの、試料-抗体組成物は、一般に、洗浄して一切の非特異的結合種を除去し、これによって、一次免疫複合体内に特異的に結合しているこれらの分子のみを検出することが可能になる。

【0170】

一般に、免疫複合体形成の検出は、当技術分野において周知であり、非常に多くの手法の適用によってこの検出を達成することができる。これらの方法は、一般に、標識またはマーカー、例えば、それらの放射性タグ、蛍光タグ、生物学的タグおよび酵素的タグのいずれかの検出に基づく。そのような標識の使用に関する米国特許としては、米国特許第3,817,837号、同第3,850,752号、同第3,939,350号、同第3,996,345号、同第4,277,437号、同第4,275,149号および同第4,366,241号が挙げられ、各々が参照により本明細書に組み込まれる。しかし、二次結合リガンド、例えば、二次抗体および/またはビオチン/アビジンリガンド結合配置も使用することができ、当技術分野においても公知である。

【0171】

検出に用いられる抗体は、それ自体が、検出可能な標識に連結することができ、次いで、この標識を単に検出することだけによって、組成物中の一次免疫複合体の量を決定することが可能になる。あるいは、一次免疫複合体内に結合される一次抗体を、抗体に対して結合親和性を有する二次結合リガンドによって検出することができる。これらの場合、二次結合リガンドを検出可能な標識に連結させることができる。二次結合リガンドは、それ自体が抗体であることが多く、したがって、「二次」抗体と呼ばれることもある。一次免疫複合体を、標識された二次結合リガンド、または抗体と、二次免疫複合体の形成を可能にするのに有効な条件下で、かつ十分な期間にわたって接触させる。次いで、二次免疫複合体を、一般に、洗浄して一切の非特異的結合標識二次抗体やリガンドを除去し、次いで、二次免疫複合体中に残存する標識を検出する。

【0172】

さらなる方法は、2ステップ手法による一次免疫複合体の検出を含む。抗体に対する結合親和性を有する二次結合リガンド、例えば抗体を使用して、上記のように二次免疫複合体を形成する。洗浄後、二次免疫複合体を、二次抗体に対して結合親和性を有する三次結合リガンドまたは抗体と、この場合もやはり、免疫複合体（三次免疫複合体）の形成を可能にするのに有効な条件下で、かつ十分な期間にわたって接触させる。三次リガンドまたは抗体は、このようにして形成された三次免疫複合体の検出を可能にする検出可能な標識に連結される。このシステムは、この増幅が所望される場合、シグナル増幅をもたらすことができる。

【0173】

Charles Cantorにより設計された免疫検出の1つの方法は、2つの異なる抗体を使用する。第1のステップのビオチン化されたモノクローナル抗体またはポリク

10

20

30

40

50

ローナル抗体を使用して標的抗原（複数可）を検出し、次いで、第2のステップの抗体を使用して、複合体化されたビオチンに結合しているビオチンを検出する。その方法では、試験される試料を、先ず、第1のステップの抗体を含有する溶液中でインキュベートする。標的抗原が存在する場合、抗体の一部が抗原に結合して、ビオチン化抗体/抗原複合体を形成する。次いで、抗体/抗原複合体を、ストレプトアビジン（もしくはアビジン）、ビオチン化DNA、および/または相補的ビオチン化DNAの逐次的な溶液中でのインキュベーションにより増幅し、各々のステップでは抗体/抗原複合体に追加のビオチン部位が付加される。増幅ステップを好適なレベルの増幅が達成されるまで繰り返し、達成された時点で、ビオチンに対する第2のステップの抗体を含有する溶液中で試料をインキュベートする。この第2のステップの抗体は、例えば、発色基質を使用して組織酵素学により抗体/抗原複合体の存在を検出するために使用することができる酵素で標識される。好適な増幅を用いて、肉眼で見えるコンジュゲートを産生することができる。

10

## 【0174】

別の公知の免疫検出方法は、イムノPCR方法論を活用する。このPCR法は、ビオチン化DNAとのインキュベーションまではCantor法と同様であるが、ストレプトアビジンとビオチン化DNAとの複数のインキュベーションラウンドを使用するのではなく、抗体を放出する低pHまたは高塩濃度緩衝液を用いてDNA/ビオチン/ストレプトアビジン/抗体複合体を洗浄除去する。次いで、得られた洗浄溶液を好適なプライマーと適切な対照とともに使用してPCR反応を行う。PCRの膨大な増幅能力および特異性を、単一の抗原分子を検出するために利用することができる。

20

## 【0175】

抗原が固定される別のELISAは、検出における抗体競合の使用を含む。このELISAでは、抗原に対する標識抗体をウェルに添加し、結合させる、および/またはそれらの標識によって検出する。次いで、未知の試料中の抗原の量を、コーティングされたウェルでのインキュベーション中に試料と抗原に対する標識抗体とを混合することにより決定する。試料中の抗原の存在は、ウェルへの結合に利用可能な抗原に対する抗体の量を低減させるように、ひいては最終的なシグナルを低減させるように作用する。このことは、非標識抗体が抗原コーティングウェルに結合する未知の試料中の抗原に対する抗体の検出にも適しており、標識抗体に結合するために利用可能な抗原の量も低減させる。

## 【0176】

30

ELISAは、コーティング、インキュベーションおよび結合、非特異的結合種を除去するための洗浄、ならびに結合した免疫複合体の検出などの、共通のある特定の特徴を一般に有する。抗原または抗体のいずれかでプレートをコーティングする際、一般に、プレートのウェルを、抗原または抗体の溶液とともに、一晚、または指定の時間にわたって、インキュベートする。次いで、プレートのウェルを洗浄して、不完全に吸着した材料を除去する。次いで、ウェルの一切の残存する利用可能な表面を、試験抗血清に対して抗原的に中性である非特異的タンパク質で「コーティング」する。これらの非特異的タンパク質は、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、または粉乳の溶液を含む。コーティングは、固定用表面の非特異的吸着部位のブロッキングを可能にし、ひいては、表面への抗血清の非特異的結合に起因するバックグラウンドを低減させる。

40

## 【0177】

多くのELISAにおいて、直接的な手順ではなく二次または三次検出が使用される。したがって、ウェルへのタンパク質または抗体の結合、バックグラウンドを低減させるための非反応性材料でのコーティング、および未結合材料を除去するための洗浄の後、固定用表面と試験される生体試料とを免疫複合体(抗原/抗体)形成を可能にするのに有効な条件下で接触させる。したがって、免疫複合体の検出は、標識された二次結合リガンドまたは抗体、および標識された三次抗体または三次結合リガンドとコンジュゲートしている二次結合リガンドまたは抗体を必要とする。

## 【0178】

「免疫複合体(抗原/抗体)形成を可能にするのに有効な条件下」は、条件が、BSA

50

、ウシガンマグロビン ( B G G ) またはリン酸緩衝食塩水 ( P B S ) / T w e e n などの溶液で抗原および/または抗体を希釈することを含み得ることを意味する。これらの添加される剤は、非特異的バックグラウンドの低減を補助する傾向がある。

【 0 1 7 9 】

「好適な」条件は、インキュベーションが、有効な結合を可能にするのに十分な温度で、十分な期間にわたってのインキュベーションであることも意味する。一部の例では、インキュベーションステップは、約 1 ~ 約 4 時間、約 2 5 ~ 約 2 7 の温度で、または一晩、約 4 でのステップである。

【 0 1 8 0 】

V I . 抗体精製

ある特定の実施形態では、F X I I に対する抗体は、精製され得る。用語「精製された」は、本明細書で使用される場合、他の成分から単離可能な組成物であって、タンパク質がその天然に得ることができる状態と比較して任意の程度に精製されている組成物に言及するように意図されている。したがって、精製されたタンパク質は、天然に存在することができる環境から遊離したタンパク質も指す。用語「実質的に精製された」が使用される場合、この表記は、タンパク質またはペプチドが、組成物の主要成分を形成する、例えば、組成物中のタンパク質の約 5 0 %、約 6 0 %、約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、約 9 5 % またはそれより多くを構成する、組成物を指す。

【 0 1 8 1 】

タンパク質精製技法は、当業者に周知である。これらの技法は、あるレベルでの、細胞環境のポリペプチド画分と非ポリペプチド画分とへの粗分画を含む。ポリペプチドを他のタンパク質から分離してしまうと、クロマトグラフィー技法および電気泳動技法を使用して目的のポリペプチドをさらに精製して、部分的精製または完全精製（または均一に至る精製）を達成することができる。

【 0 1 8 2 】

純粋なペプチドの調製に特に好適な分析方法は、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動である。タンパク質精製のための他の方法は、硫酸アンモニウム、P E G、抗体などでの沈殿、または熱変性、続いての遠心分離、ゲル濾過、逆相、ヒドロキシアパタイト ( hydroxylapatite ) および親和性クロマトグラフィー、ならびにこのようなまたは他の技法の組合せを含む。

【 0 1 8 3 】

F X I I に対する抗体を精製する場合、原核生物または真核生物発現系においてポリペプチドを発現させること、および変性条件を使用してタンパク質を抽出すること望ましいこともある。ポリペプチドは、ポリペプチドのタグ付き部分に結合する親和性カラムを使用して他の細胞成分から精製することができる。当技術分野において一般に公知であるように、様々な精製ステップを行う順序を変えることができ、またはある特定のステップを省くことができ、それでもなお、結果として、実質的に精製されたタンパク質またはペプチドの調製に好適な方法となると考えられる。

【 0 1 8 4 】

一般に、完全な抗体は、抗体の F c 部分に結合する剤（例えば、プロテイン A ）を利用して分画される。あるいは、抗原を使用して、適切な抗体を同時に精製および選択することができる。そのような方法は、カラム、フィルターまたはビーズなどの支持体に結合した選択剤を利用することが多い。抗体を支持体に結合させ、夾雑物を除去し、特定の条件（例えば、塩、熱など）の適用により抗体を放出させる。

【 0 1 8 5 】

タンパク質またはペプチドの精製度を定量するための様々な方法は、本開示に鑑みて当業者には公知である。これらの方法は、例えば、活性画分の比活性を決定すること、または S D S / P A G E 分析により画分中のポリペプチドの数を評価することを含む。画分の純度を評価するための別の方法は、画分の比活性を計算すること、それを初期抽出物の比

10

20

30

40

50

活性と比較すること、およびひいては純度を計算することである。活性の量を表すために使用される実際の単位は、精製を追跡するために選択される特定のアッセイ技術、および発現されるタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すか否かに、もちろん、依存する。SDS/PAGE条件が異なれば、時には有意に、ポリペプチドの移動も変わることがあることは公知である。したがって、異なる電気泳動条件下では、精製されたまたは部分的に精製された発現産物の見掛けの分子量が変わり得ることが、理解される。

#### 【0186】

#### VII. 医薬組成物

医薬組成物は、薬学的に許容される担体に溶解または分散された有効量の1つまたは複数の抗体、治療剤または追加の薬剤を含むことができる。水性組成物は、薬学的に許容される担体または水性媒体に溶解または分散された有効量の抗体を含む。用語「薬学的に許容される」、「治療的上許容される」などの用語は、動物またはヒトに必要なに応じて投与された場合に有害反応、アレルギー反応や他の厄介な反応を生じさせない、分子実体および組成物を指す。

10

#### 【0187】

用語「薬学的に許容される担体」および「治療的上許容される担体」は、当業者には公知であるような、任意のおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング、界面活性剤、抗酸化物質、保存剤（例えば、抗菌剤、抗真菌剤）、等張剤、吸収遅延剤、塩、保存剤、薬物、薬物安定剤、ゲル剤、結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、着香剤、色素、そのような材料およびそれらの組合せを含む（例えば、参照により本明細書に組み込まれるRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329を参照されたい）。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および剤の使用は、当技術分野において周知である。任意の従来の媒体または剤が活性成分と非適合性である場合を除いて、治療用組成物におけるその使用が企図される。補助活性成分を組成物に組み込むこともできる。ヒトへの投与のために、調製物は、無菌性、発熱性、ならびに一般的な安全性および純度基準を満たすべきである。

20

#### 【0188】

生体材料は、必要に応じて、望ましくない低分子量分子を除去するために十分に透析するべきである、および/または所望のピヒクルへのより容易な製剤化のために凍結乾燥するべきである。次いで、活性化合物は、一般に、非経口投与のために製剤化され、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、鼻腔内、肺内、髄腔内（intrathecal）または腹腔内経路による注射または他の手段のために製剤化される。典型的に、そのような組成物を注射剤として、液体の液剤または懸濁剤のいずれかとして調製することができ、注射前の液体の添加の際に液剤または懸濁剤の調製に使用するのに好適な固体形態を調製することもでき、調製物を乳化させることもできる。

30

#### 【0189】

注射剤の使用に好適な医薬品形態は、無菌水性液剤または分散液剤；ゴマ油、ピーナツ油または水性プロピレングリコールを含む製剤；および無菌注射液剤または分散液剤の即時調製のための無菌粉剤・散剤を含む。全ての場合、この形態は、無菌でなければならない、容易な注射可能性またはエアロゾル送達が存在する程度に流動性でなければならない。この形態を、持続放出用に設計された他の薬物送達ピヒクルに組み込むことができ、または延長された生物学的半減期を有するように改変することができる。この形態は、製造および保管条件下で安定していなければならない、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護されなければならない。

40

#### 【0190】

遊離塩基または薬学的に許容される塩としての活性化合物の液剤は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合された水で調製することができる。分散液剤は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物で、ならびに油中で調製することもできる。通常の保存および使用条件下では、これらの調製物は、微生物の成長を防止するために保存剤を含有する。

50

## 【 0 1 9 1 】

F X I I に対する抗体は、遊離塩基の、中性または塩形態の組成物に製剤化することができる。薬学的に許容される塩は、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基とで形成される）、ならびに例えば塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸とで形成される、酸付加塩を含む。遊離カルボキシル基で形成される塩は、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムもしくは水酸化第二鉄などの無機塩基から誘導することもでき、またはイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジンもしくはプロカインなどのような有機塩基から誘導することもできる。

## 【 0 1 9 2 】

担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）、これらの好適な混合物、および植物油を含有する、溶媒または分散媒であることもある。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用により、分散液剤の場合は必要粒径の維持により、および界面活性剤の使用により、維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによってもたらすことができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含めることができる。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅らせる剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に使用をことにより、もたらすことができる。

## 【 0 1 9 3 】

無菌注射用液剤は、必要に応じて、上に列挙した様々な他の成分を有する適切な溶媒の必要量に活性化化合物を組み入れ、その後、濾過滅菌することにより調製される。一般に、分散液剤は、塩基性分散媒と、上に列挙したものからの必要とされるその他の成分とを含有する無菌ビヒクルに、様々な滅菌活性成分を組み入れることによって調製される。無菌注射用液剤の調製のための無菌粉剤・散剤の場合、調製方法は、任意の追加の所望成分を加えた活性成分の粉剤・散剤を、事前に滅菌濾過されたその溶液から生じさせる、真空乾燥および凍結乾燥技法である。直接注射するためのより濃縮されたまたは高度に濃縮された液剤の調製も企図され、溶媒としての D M S O の使用は、極めて迅速な浸透、高濃度の活性薬剤の小領域への送達をもたらすことが想定される。

## 【 0 1 9 4 】

製剤化されると、液剤は、投与用製剤に適合する様式で、治療に有効であるような量で投与される。製剤は、上記のタイプの注射用液剤などの様々な剤形で容易に投与されるが、薬物放出カプセル剤なども用いることができる。

## 【 0 1 9 5 】

水性液剤の非経口投与のために、例えば、液剤を必要な場合適切に緩衝し、液体希釈剤を最初に十分な食塩水またはグルコースで等張性にするべきである。これらの特定の水性液剤は、静脈内、筋肉内、皮下、鼻腔内および腹腔内投与に特に好適である。これに関連して、用いることができる滅菌水性媒体は、本開示に鑑みて当業者には公知である。例えば、1 m l の等張 N a C l 溶液中に 1 投与量を溶解し、1 0 0 0 m l の皮下注入流体に添加することができまたは提案された注入の部位に注射することができる（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 15<sup>th</sup> Ed. Mack Printing Company, pages 1035-1038 and 1570-1580, 1975 を参照されたい）。処置される対象の状態に依存して、投与量の多少の変動が必然的に生じる。投与の責任者が個々の対象に適切な用量を決定する。

## 【 0 1 9 6 】

静脈内または筋肉内注射などの非経口投与用に製剤化される化合物に加えて、他の薬学的に許容される形態は、例えば、経口投与用の錠剤または他の固体；リポソーム製剤；徐放性カプセル剤；および現在使用されている任意の他の形態、例えばクリーム剤などを含む。

## 【 0 1 9 7 】

10

20

30

40

50

治療剤は、それが、固体形態で投与されるか、液体形態で投与されるか、またはエアロゾル形態で投与されるか、およびそれが、注射などの投与経路のために無菌である必要があるかに依存して、異なるタイプの担体を含み得る。F X I I に対する抗体は、静脈内に、皮内に、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、腔内に、直腸内に、局部に、筋肉内に、皮下に、結膜下に、膀胱内に、粘膜に、心膜内に、臍帯内に、眼内に、経口で、局所的に、吸入（例えば、エアロゾル吸入）により、注射により、注入により、持続注入により、局所灌流、標的細胞を直接浸漬して、カテーテルによって、洗浄によって、クリームで、脂質組成物（例えば、リポソーム）で、当業者に公知である他の方法または前述のことの任意の組合せにより、投与することができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990 を参照されたい）。

10

【 0 1 9 8 】

動物またはヒト患者に投与される組成物の実際の投与量は、身体的および生理学的要因、例えば、体重、状態の重症度、処置される疾患の種類、過去のまたは同時に行われる治療介入、患者の特発性疾患、および投与経路により決定することができる。投与に責任のある従事者が、個々の対象のための組成物中の活性成分（複数可）の濃度および適切な用量（複数可）を決定する。

【 0 1 9 9 】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、例えば、少なくとも約 0 . 1 % の活性化化合物を含むことができる。他の実施形態では、活性化化合物は、単位の重量の約 2 % ~ 約 7 5 % 間、または例えば、約 2 5 % ~ 約 6 0 % の間、およびこれらの中で導き出せる任意の範囲を構成することができる。

20

【 0 2 0 0 】

一部の実施形態では、組成物は、1つまたは複数の成分の酸化を遅らせる様々な抗酸化物質を含む。組成物が液体形態である実施形態では、担体は、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、脂質（例えば、トリグリセリド、植物油、リポソーム）およびそれらの組合せを含むがそれらに限定されない、溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用により、例えば液体ポリオールもしくは脂質などの、担体への分散による必要粒径の維持により、例えばヒドロキシプロピルセルロースなどの、界面活性剤の使用により、またはそれらの組合せにより維持することができる。多くの場合、例えば糖、塩化ナトリウムまたはそれらの組合せなどの、等張剤を含めることができる。

30

【 0 2 0 1 】

特定の実施態様では、注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチンまたはそれらの組合せなどを、組成物に使用することによりもたらすことができる。

【 0 2 0 2 】

F X I I 活性を阻害する本開示の抗体は、第 X I I 因子欠損がヒトおよび動物、例えばマウスにおいて無症候性であることを考えると、本質的に安全である。このことは、他の抗凝固抗体の使用に対する大きな進歩であり、なぜなら、ここで論じられるもの以外の（F X I I の接触活性化を阻害するもの以外の）抗体は、それらの投与経路または投与量にかかわらず出血性障害を引き起こすと予想されるからである。第 X I I 因子が極めて重要な止血に関与しないことを考えると、ここで開示されている抗体のような抗体は、止血に対するそのような有害作用を有しない。実際、これらの抗体にはその標的の飽和以外のさらなる効果がないので、過剰投与からの危険は理論的にゼロである。したがって、本願の抗体は、安全な抗血栓薬（抗凝固薬、血液希釈剤）である。

40

【 0 2 0 3 】

医薬組成物を、F X I I 活性化が問題になる疾患を患っている対象に、非経口投与することができる。組成物を、必要としている患者に、ボーラスとしてまたは持続注入により

50

投与することができる。例えば、抗体または抗体断片のボラス投与は、 $0.0025 \sim 100 \text{ mg/kg}$  体重、 $0.025 \sim 0.25 \text{ mg/kg}$ 、 $0.010 \sim 0.10 \text{ mg/kg}$ 、または $0.10 \sim 0.50 \text{ mg/kg}$ の量であり得る。持続注入の場合は、Fab断片として存在する本発明の抗体を $0.001 \sim 100 \text{ mg/kg}$  体重/分、 $0.0125 \sim 1.25 \text{ mg/kg}$  /分、 $0.010 \sim 0.75 \text{ mg/kg}$  /分、 $0.010 \sim 1.0 \text{ mg/kg}$  /分、または $0.10 \sim 0.50 \text{ mg/kg}$  /分で、1～24時間、1～12時間、2～12時間、6～12時間、2～8時間、または1～2時間の期間にわたって投与することができる。抗体は、用量の関数として毎時、毎日、毎週または毎月反復されるボラス注射により投与することができる。投与の頻度および継続期間は、制限がなく、状態の重症度、および治療活性の継続の必要性に依存する。頻度はまた、1週間に3回から2週間～6カ月毎に1回までの範囲であり得る。

10

#### 【0204】

加えて、組成物を患者に皮下、静脈内または筋肉内注射によって投与することができる。例えば、抗FXII抗体 $10 \sim 100 \text{ mg}$ の用量を皮下注射によって毎日、毎週、隔週または毎月投与することができる。

#### 【0205】

本開示の抗体は、単剤療法として使用することができるが、他の療法と組み合わせてもよい。例えば、ある特定の疾患の処置に有用であると考えられる、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)、血小板阻害剤、抗凝固薬、または血栓溶解剤などの、1つまたは複数の追加の抗血栓剤または抗炎症剤の共投与。これらの併用療法は、抗凝固薬または抗炎症薬の必要頻度または用量を低減させる可能性がある。共投与または併用療法とは、各々が別々に製剤化されたまたは一緒に1つの組成物に製剤化された2つの治療薬の投与を意味し、別々に製剤化された場合には、ほぼ同時に投与されるか、または同じ治療期間にだが異なる時点で投与される。

20

#### 【0206】

組み合わせて使用するための抗血小板薬としては、不可逆的シクロオキシゲナーゼ阻害剤(アスピリン)、アデノシン二リン酸(ADP)受容体阻害剤(クロピドグレル、プラスグレル、チカグレロールおよびチクロピジン)、ホスホジエステラーゼ阻害剤(シロスタゾール)、糖タンパク質IIb/IIIa阻害剤(アブシキシマブ、エプチフィバチドおよびチロフィバン)、アデノシン再取り込み阻害剤(ジピリダモール)、ならびにトロンボキサン阻害剤、例えば、トロンボキサンシンターゼ阻害剤(イフェトロバン)、トロンボキサン受容体アンタゴニスト(セラトロダスト、ピコタミド)、およびテルトロバンが挙げられる。

30

#### 【0207】

組み合わせて使用するための抗凝固薬としては、ビタミンKアンタゴニスト(ワルファリン)、未分画および低分子量ヘパリン(エノキサパリン、ダルテパリン、ヘパリン)、トロンビン阻害剤(ビバリルジン、アルガトロバン、ダビガトラン、アンチトロンピンIII)、および第Xa因子阻害剤(アピキサバン、フォンダパリヌクス、リバーロキサバン、エドキサバン)が挙げられる。

#### 【0208】

組み合わせて使用するための線維素溶解剤としては、アニストレプラーゼ、レテプラーゼ、ストレプトキナーゼ、カビキナーゼ、アルテプラーゼ、テネクテプラーゼ、ウロキナーゼ、スタフィロキナーゼ、プラスミンおよびロキナーゼ(rokinase)が挙げられる。

40

#### 【0209】

組み合わせて使用するための抗炎症薬としては、NSAID、例えば、セレコキシブ、ピロキシカム、インドメタシン、メロキシカム、ケトプロフェン、スリンダク、アスピリン、ジフルニサル、ナブメトン、ならびにコルチコステロイド、例えば、プレドニゾン、ベタメタゾン、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾンおよびプレドニゾンが挙げられる。これらは、補体系またはカリクレインキニン系の阻害剤も含み得る。

50

## 【 0 2 1 0 】

## V I I I . キット

本明細書に記載の組成物のいずれも、キットに含めることができる。したがって、キットは、好適な容器に、抗体（または抗原結合性断片）および/または追加の薬剤を含む。他の成分をキットに含むことができる。診断用および治療用キットは、好適な容器に、薬学的に許容される製剤における抗体の薬学的に許容される製剤を含む。キットは、単一の容器を含むことができる、および/またはキットは、化合物ごとに別個の容器を有することができる。

## 【 0 2 1 1 】

キットの成分が1つおよび/または複数の液体の液剤で提供される場合、その液体の液剤は水性液剤であり、滅菌水性液剤が特定の実施形態の一例である。抗体を注射可能な組成物に製剤化することもでき、この場合、容器はそれ自体が、注射器、ピペットおよび/または他のそのような機器であることができ、この容器から、製剤を身体の感染部位に適用することができる、動物に注射することができる、ならびに/またはさらにはキットの他の成分に適用することおよび/もしくはキットの他の成分と混合することができる。

10

## 【 0 2 1 2 】

しかし、キットの成分を乾燥粉剤・散剤（複数可）として提供することもできる。試薬および/または成分が、乾燥粉剤・散剤として提供される場合、粉剤・散剤を好適な溶媒の添加により再構成することができる。溶媒を別の容器で提供することができることも予想される。

20

## 【 0 2 1 3 】

容器は、一般に、抗体/抗体製剤が好適に割り振られて配置される少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、瓶、注射器および/または他の容器を含む。キットは、無菌の薬学的に許容されるバッファーおよび/または別の希釈剤を収容するための第2の容器も含むことができる。

## 【 0 2 1 4 】

キットは、商業的販売のために厳重に密封された状態でバイアルを収容するための手段、例えば、所望のバイアルが保持される射出/またはブロー成形プラスチック容器なども含むことができる。

## 【 0 2 1 5 】

容器の数および/またはタイプに関係なく、キットは、動物の身体内への最終的な抗体の注射/投与および/または留置を支援するための器具を含むこともでき、および/またはキットをそのような器具とともに包装することもできる。そのような器具は、注射器、ピペット、鉗子、および/または任意のそのような医学的に承認された送達ビヒクルであり得る。

30

## 【 0 2 1 6 】

## I X . 治療上の使用

F X I I 活性を防止する本開示の抗体は、F X I I 欠損がヒトおよびマウスにおいて無症候性であることを考えると、本質的に安全である。このことは、他の抗凝固抗体の使用に対する大きな進歩であり、なぜなら、本明細書で開示されるもの以外の抗体は、それらの投与経路または投与量にかかわらず出血性障害を引き起こすと予想されるからである。F X I I が極めて重要な止血に関与しないことを考えると、本明細書で開示される抗体のような抗体には、止血に対するそのような有害作用がない。実際、これらの抗体にはその標的の飽和以外のさらなる効果がないので、過剰投与からの危険は理論的にゼロである。したがって、本開示の抗体は、安全な抗血栓薬（抗凝固薬、血液希釈剤）および安全な抗炎症性分子である。

40

## 【 0 2 1 7 】

## A . 血栓症および血栓塞栓症

血栓症は、循環系を通る血流を閉塞させる、血管内での血餅の形成である。血管が損傷すると、血液は、血小板（platelet）（血小板（thrombocyte））およびフィブリンを使

50

用して血餅を形成して失血を防止する。血管が負傷していないときでも、ある特定の条件下では体内で血餅が形成されることがある。遊離して体内を移動し始める凝血塊は、塞栓として公知である。血栓が動脈の内腔の断面積の75%より多くを占めると、酸素の減少（低酸素）および乳酸のような代謝産物の蓄積のため、供給を受ける組織への血流が、症状を引き起こすほどに低減される。90%より高度な閉塞は、酸素の完全枯渇である無酸素症、および細胞死の1様式である梗塞を生じさせる結果となり得る。血栓塞栓症は、血栓症とその主な合併症である塞栓症との組合せである。

【0218】

静脈血栓症および動脈血栓症という2つの明確に異なる型の血栓症があり、これらの各々が、いくつかのサブタイプにより表される。静脈血栓症は、静脈内の血栓（血餅）の形成である。このカテゴリーの下で分類することができる、いくつかの疾患がある。

10

【0219】

深部静脈血栓症（DVT）は、深部静脈内での血餅の形成である。DVTは、大腿静脈などの下肢静脈を冒すことが最も多い。血流の速度、血液の粘度および血管壁の質という3つの因子が、深部静脈内での血餅の形成において重要である。DVTの古典的な徴候としては、患部の腫脹、疼痛および発赤が挙げられる。

【0220】

門脈血栓症は、肝門脈を冒す型の静脈血栓症であり、門脈圧亢進症および肝臓への血流供給の低減をもたらす。門脈血栓症には、脾炎、肝硬変、憩室炎または胆管癌などの病的原因がある。

20

【0221】

腎静脈血栓症は、血栓による腎静脈の閉塞である。腎静脈血栓症は、腎臓からの排液の低減をもたらす傾向がある。抗凝固療法が、最適な処置である。

【0222】

頸静脈血栓症は、感染症、静注薬物使用または悪性腫瘍に起因して起こり得る状態である。頸静脈血栓症は、全身性敗血症、肺塞栓症および乳頭浮腫を含む、一連の様々な合併症を有し得る。静脈の部位の鋭痛によって特徴付けられるが、頸静脈血栓症は、ランダムに起こり得るので診断が困難と判明することもある。

【0223】

バッド・キアリ症候群は、肝静脈または下大静脈の遮断である。この型の血栓症は、腹痛、腹水および肝肥大を呈する。治療とシャントの使用による外科的介入とで処置が異なる。

30

【0224】

バジェット・シュレッター病は、血栓による上肢静脈（例えば、腋窩静脈または鎖骨下静脈）の閉塞である。この状態は、通常は激しい運動の後に表面化し、通常は、若年の、他の点では健康な人々に見られる。女性よりも男性が罹患する。

【0225】

脳静脈洞血栓症（CVST）は、血栓による硬膜静脈洞の遮断の結果として生じる稀な形の脳卒中である。症状は、頭痛、視覚異常、脳卒中のあらゆる症状、例えば、身体の片側の顔面および肢の脱力、ならびに痙攣を含み得る。診断は、通常はCTまたはMRIスキャンで行われる。罹患者の大部分は、完全に回復する。死亡率は、4.3%である。

40

【0226】

動脈血栓症は、動脈内の血栓の形成である。ほとんどの場合、動脈血栓症は、アテロームの破裂の後に起こり、したがって、アテローム血栓症と呼ばれる。動脈血栓症の別のよくある原因は、血流障害を引き起こす心房細動である。加えて、心房細動の直流通電除細動が、特に48時間より長く持続すると、血栓塞栓症の大きなリスクを伴うことは、周知である。血栓塞栓症は、抗凝固療法を受けない症例のおおよそ5%を襲う。電氣的除細動後の血栓塞栓症の機序および病態形成は、完全には理解されていない。動脈血栓症は、塞栓を生じさせることがあり、動脈塞栓症の主原因であり、潜在的に、身体のほぼあらゆる臓器の梗塞を引き起こし得る。

50

## 【 0 2 2 7 】

肝動脈血栓症は、肝臓移植後に重篤な合併症として通常は起こる。動脈塞栓が肢に形成することもある。

## 【 0 2 2 8 】

したがって、血栓症を有する患者の実際の出血、例えば、別の薬物に起因するまたは遺伝性もしくは後天性の任意の他の原因に起因する出血を、安全に処置することができる。また、例えば、体外デバイス、人工肺、透析膜、カテーテル、血管内の物体（例えば、ステント、グラフト）に関連する異物関連血栓症を、特に、他の薬物が禁忌である場合、安全に処置することができる。

## 【 0 2 2 9 】

B . 播種性血管内凝固症候群または消費性凝固障害

消費性凝固障害（CC）は、播種性血管内凝固症候群（DIC）または播種性血管内凝固障害としても公知であり、様々な疾患に応答して起こる凝固（coagulation）（血液凝固（blood clotting））機序の病的活性化である。DICは、全身の血管内での小血餅の形成をもたらす。小血餅が、凝固タンパク質および血小板を消費すると、正常な凝固が破壊され、異常な出血が、皮膚（例えば、血液試料が採取された部位から）、消化管、呼吸器、および手術創部から起こる。小血餅はまた、臓器（例えば、肝臓）への正常な血流を途絶し、結果として機能不全になり得る。

## 【 0 2 3 0 】

DICは、急性に起こり得るが、根底にある問題に依存して、よりゆっくりと長期的に起こることもある。DICは、瀕死の状態にあるときに見られることが多く、死に至ることもある多臓器不全の発症に関与し得る。

## 【 0 2 3 1 】

恒常的条件下で、身体は、凝固と線維素溶解のバランスが微調整された状態で維持される。凝固カスケードの活性化は、フィブリノーゲンをフィブリンに変換するトロンビンを生成し、安定したフィブリン塊が止血の最終産物である。次いで、線維素溶解系が機能してフィブリノーゲンおよびフィブリンを分解する。線維素溶解系の活性化は、フィブリン塊の溶解に関与するプラスミンを（トロンビンの存在下で）生成する。フィブリノーゲンおよびフィブリンの分解によってポリペプチドが生じる結果となり、これらのポリペプチドは、フィブリン分解産物（fibrin degradation product）（FDP）またはフィブリン分解産物（fibrin split product）（FSP）と呼ばれる。プラスミンは、主要な凝固のタンパク質分解酵素であり、血餅の分解、または線維素溶解にも不可欠であるので、恒常性の状態におけるプラスミンの存在は、非常に重要である。

## 【 0 2 3 2 】

DICでは、凝固および線維素溶解プロセスは異常調節され、その結果、生じた出血に伴って広範な凝固が生じる。DICの誘発事象にかかわらず、一旦開始されると、DICのこの病態生理機能は、あらゆる状態で同様である。DICの1つの非常に重要メディエーターは、組織因子（TF）と呼ばれる膜貫通型糖タンパク質の放出である。TFは、多くの細胞型（内皮細胞、マクロファージおよび単球を含む）の表面に存在し、通常は、全身循環と接触せず、血管損傷後に循環に曝露される。例えば、TFは、サイトカイン（特に、インターロイキン1）、腫瘍壊死因子およびエンドトキシンへの曝露に反応して放出される。このことは、敗血症状態でのDICの発症に大きな役割を果たす。TFは、肺、脳および胎盤の組織にも大量に存在する。このことは、DICが、多数の外傷を有する患者においてDICが容易に発症する理由を説明するのに役立つ。活性化されると、TFは、凝固因子と結合し、次いで外因性経路を（FVIIによって）誘発し、その後、凝固の内因性経路（XII → XI → IX）を誘発する。

## 【 0 2 3 3 】

エンドトキシンの放出は、グラム陰性菌敗血症がDICを誘発する機序である。急性前骨髄球性白血病では、処置により白血病顆粒球前駆体が破壊され、その結果、貯蔵顆粒から大量のタンパク質分解酵素が放出され、微小血管の損傷を引き起こす。他の悪性腫瘍は

10

20

30

40

50

、TFおよびプラスミノゲンアクチベーターインヒビター - 1 (PAI - 1) を放出することによって線維素溶解を妨げる様々な癌遺伝子の発現を増強し得る。

【0234】

循環における過剰なトロンピンは、凝固カスケードの過剰な活性化の結果として生じる。過剰なトロンピンは、フィブリノーゲンを切断し、最終的に循環中に複数のフィブリン血栓を残す。これらの過剰な凝血塊は、血小板を捕捉してより大きな凝血塊になり、微小血管および大血管血栓症をもたらす。微小循環内、大血管内および臓器内に凝血塊が詰まるこの状態は、DICに伴って起こる虚血、炎症、臓器灌流障害、および終末器官損傷につながる。

【0235】

凝固インヒビターもこのプロセスで消費される。インヒビターレベルの低下によって、より多くの凝固が可能になり、その結果、フィードバック系が発生し、そこで凝固の増加によって、より多くの凝固が生じる。同時に、血小板減少が起こり、このことは、血小板の捕捉と消費に起因した。凝固因子は、複数の凝血塊の発生の際に消費され、このことが、DICで見られる出血の一因となる。

【0236】

同時に、過剰な循環トロンピンは、プラスミノゲンからプラスミンへの変換を支援し、その結果、線維素溶解が生じる。凝血塊の分解は、強力な抗凝固特性を有する過剰量のFDPをもたらす、出血の一因となる。過剰なプラスミンもまた、補体およびキニン系を活性化する。これらの系の活性化は、DICを経験している患者が示す多くの臨床症状、例えば、ショック、低血圧、および血管透過性の増加をもたらす。急性型のDICは、正常な恒常性境界の完全な破壊に伴う血管内凝固プロセスの極度の発現と考えられる。DICは、予後不良および高い死亡率を伴う。

【0237】

しかし、DICの病態生理機能の基本的な仮定および解釈に対して最近異議が唱えられている。動物モデルにおける敗血症およびDICの研究によって、肝細胞の表面に高度に発現される、アッシュウェル・モレル受容体と呼ばれる受容体は、streptococcal pneumonia (SPN) および恐らく他の病原体に起因する菌血症および敗血症の際の血小板減少の原因であることが示されている。SPN敗血症において観察された血小板減少は、血小板などの凝固因子の消費の増加によるものではなく、肝細胞が血小板を摂取して循環から迅速に除去することを可能にするこの受容体の活性の結果であった。アッシュウェル・モレル受容体は、DICの凝固障害に関与する前に血栓形成促進成分を除去することにより、DICの重症度を低下させ、血栓症および組織壊死を軽減し、生存を促進する。したがって、DICにおいておよびこの受容体を欠く一部の組織において観察される出血は、機械的血管バリアの喪失に伴う血栓形成の増加の二次的なものであり得る。この発見には、DICの病態生理機能を低減させるための新しい手法を考案することに有意な臨床的意義がある可能性がある。

【0238】

唯一の有効な処置は、基礎疾患の好転である。抗凝固薬は、極めて稀に、および血栓形成が切迫した死（例えば、冠動脈血栓症または脳血管血栓症における）をもたらす可能性があるときにのみ、投与される。血小板は、数が $5,000 \sim 10,000 / \text{mm}^3$ 未満であり、大量出血が起こっているときに輸注されることがあり、新鮮凍結血漿は、凝固因子および抗血栓因子を補充しようとして投与されることがあるが、これらは、その場しのぎの手段に過ぎず、血栓形成の発生の増加をもたらす可能性がある。

【0239】

DICは、より低いフィブリノーゲンレベル（全てがフィブリンに変換されてしまったかのような）をもたらす、このことについて病院検査室において検査することができる。この検査は、フィブリンが分解され、その際に血餅が線維素溶解により溶解されたときに生じる、「フィブリン分解産物」(FSP)または「フィブリン分解産物」(FDP)についての検査である。一部の状況では、アンチトロンピンの注入が必要となることがある。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 4 0 】

## C . 外傷

身体外傷は、肢の除去などの、重篤な、体を変える肉体的傷害である。鈍器からまたは鈍器で加えられた衝撃または他の力により引き起こされるタイプの身体外傷である、鈍器外傷に対して、穿通性外傷は、皮膚または組織が物体により突き刺されるタイプの身体外傷である。事故などの計画されたものでない外傷と、外科手術の場合の計画された外傷の両方として、外傷を説明することもできる。両方が、軽度から重度の組織損傷、失血および/またはショックによって特徴付けられ、両方が、敗血症をはじめとする続発性感染症に至る可能性がある。本開示は、前処置（医学的手技の場合）と、外傷が生じた後の処置との両方を含む、外傷患者における出血の安全な処置を提供する。

10

## 【 0 2 4 1 】

外科医は、疾患もしくは傷害などの病態を調査および/もしくは処置するために、身体の機能もしくは外観を向上させるのを助けるために、または時には何らかの他の理由のために、患者に対して外科的手作業および器械技法を使用する。本開示は、周術期および介入周囲の血栓予防を含む、外科手術の結果として生じた外傷に、特に、出血リスクが高いとき、安全に対処することができる。2つの特定の関心領域は、神経系および眼に関する外科手術である。

## 【 0 2 4 2 】

原則として、手技は、患者の組織の切断または以前からの持続的創傷の縫合を含む場合、外科的とみなされる。この項目（rubric）に必ずしも入らない他の手技、例えば、血管形成術または内視鏡検査は、一般的な外科的手技または設定、例えば、無菌環境、麻酔、防腐条件、典型的な外科用器具、および縫合またはステープリングの使用を含む場合、外科的とみなすことができる。全ての形態の外科手術は、侵襲的手技とみなされる。いわゆる非侵襲的外科手術は、通常は、対処する構造を貫通しない切除（例えば、角膜のレーザー切断）または放射線外科手技（例えば、腫瘍に対する照射）を指す。外科手術は、数分から数時間まで続くことがある。

20

## 【 0 2 4 3 】

外科手技は、緊急性、手技のタイプ、関係する体組織、侵襲度、および特殊器具使用により、一般に分類される。待機手術は、非致死性の状態を矯正するために行われ、患者の要請を受けて、外科医のおよび手術設備の利用可能性に依存して行われる。救急外科手術は、命、肢または機能的能力を救うために迅速に行わなければならない外科手術である。試験開腹は、診断を確定するために行われる。治療的手術は、過去に診断された状態を処置する。

30

## 【 0 2 4 4 】

切断術は、体の一部、通常は、肢または指を切除することを含む。再移植は、切断された体の一部を再び取り付けることを含む。再建手術は、体の損傷、離断または変形部の再建を含む。美容外科手術は、他の点では正常な構造の外観を向上させるために行われる。切除術は、患者から臓器、組織または他の身体部分を切除することである。移植手術は、異なるヒト（または動物）からの別の臓器または身体部分の患者への挿入による、臓器または身体部分の置換である。移植に使用するための生きているヒトまたは動物からの臓器または身体部分の除去も、ある種の外科手術である。

40

## 【 0 2 4 5 】

外科手術が、1つの臓器系または構造に対して行われる場合、その外科手術は、関係する臓器、臓器系または組織により分類されることもある。例としては、心臓手術（心臓に対して行われる）、消化器系手術（消化管およびその副器官内に行われる）、および整形外科手術（骨および/または筋肉に対して行われる）が挙げられる。

## 【 0 2 4 6 】

最小侵襲手術は、腹腔鏡手術または血管形成術の場合のような、体腔または身体構造内に小型器具を挿入するためのより小さい外部切開（複数可）を含む。対照的に、直視下手技は、目的の領域に接近するために大きい切開を必要とする。レーザー手術は、組織の切

50

断にメスまたは類似の手術器具の代わりにレーザーを使用することを含む。マイクロサージェリーは、外科医が小さい構造を見るための手術用顕微鏡の使用を含む。ロボット外科手術は、外科医の指示のもとで器具類を制御するためにダ・ヴィンチまたはゼウス外科手術システムなどの手術用ロボットを使用する。

#### 【0247】

外傷性出血は、傷害の多岐にわたる国際的影響の多くを占め、死亡の大部分の原因となり、負傷者に大きな罹患率をもたらしている。プレホスピタルケアの相違にもかかわらず、外傷性出血の急性期管理は世界中で類似しており、広く受け入れられている公開ガイドラインに従う。重傷を負った患者のケアは、4つの、多くの場合重複する、セグメントとして行われる：蘇生、手術および救命救急期。出血の診断および制御は、全ての外傷治療中に優先度が高くあるべきであり、出血性ショック状態にある患者では特に重要である。出血制御の早期取組みは、直接圧迫、圧迫包帯または止血帯による目に見える重度出血源の直接制御；長骨および骨盤骨折の固定；ならびに患者を温かい状態に保つことを含む。蘇生期の間、加温した静脈内輸液；出血の外科的制御の前の降圧蘇生；ならびに血液および血液製剤の適切な輸注が施される。手術期には、出血および任意の他の傷害の外科的制御、ならびに追加の輸注が施される。最後に、救命救急期は、術後支援および組織灌流を施す。

10

#### 【0248】

##### D. デバイス移植

インプラントは、欠損している生体構造を置き換えるために製造された医療デバイスであり、損傷した生体構造を支持するか、または既存の生体構造を増強する。医療用インプラントは、移植される生物学組織である移植片とは対照的に、人造デバイスである。身体と接触するインプラントの表面は、最も機能的なものに応じてチタン、シリコンまたはアパタイトなどの、生物学材料で製造されたものであり得る。一部の場合には、インプラントは、電子機器、例えば、人工ペースメーカーおよび人工内耳インプラントを含有する。一部のインプラントは、生物活性であり、例えば、埋め込み型ピル (implantable pill) または薬物溶出性ステントの形態の皮下薬物送達デバイスである。

20

#### 【0249】

最もよく見られるタイプの医療用インプラントは、骨折した骨が治癒する間、骨折した骨を固定するために使用するピン、ロッド、ネジおよびプレートである。より複雑なインプラントとしては、人工関節、例えば、膝および股関節、乳房インプラント、人工心臓弁、ステントおよびカテーテルが挙げられる。

30

#### 【0250】

##### E. 移植

レシipientの損傷したまたは非存在の臓器を置き換えるための、ある体からの臓器の別の体への臓器移植、または患者自身の身体ドナー部位からの臓器の臓器移植。再生医療のこの新たに出現した分野は、科学者および工学者に患者自身の細胞 (幹細胞、または不全臓器から抽出された細胞) から再成長する臓器を作出させている。同じ人物の体内に移植される臓器および/または組織は、自家移植片と呼ばれる。同じ種の2対象間で最近行われる移植は、同種移植と呼ばれる。同種移植片は、生きている供給源からのものであることもあり、または死体供給源からのものであることもある。

40

#### 【0251】

典型的に移植され得る臓器は、心臓、腎臓、肝臓、肺、膵臓、腸および胸腺である。組織としては、骨、腱 (両方とも筋骨格グラフトと呼ばれる)、角膜、皮膚、心臓弁および静脈が挙げられる。世界中で、腎臓は、最もよく移植される臓器であり、僅差で肝臓、次いで心臓が続く。角膜および筋骨格グラフトは、最もよく移植される組織であり、これらのグラフトは、臓器移植片の数を10倍より大きく上回る。

#### 【0252】

臓器ドナーは、生きていることもあり、脳死していることもある。組織は、心臓死しているドナーから、心臓の鼓動の停止後24時間以内に回収することができる。臓器と異な

50

り、大部分の組織（角膜を除いて）は、最大5年間保存および保管することができ、これは、それらの組織が「バンキングされ」得ることを意味する。アメリカ合衆国では、組織移植は、アメリカ食品医薬品局（FDA）のより規制されており、FDAは、主として伝染病の拡大の防止を目的として、移植の安全性に厳格な規制を定めている。規制は、ドナーのスクリーニングおよび試験についての基準を含み、組織グラフトの処理および分配に対する厳格な規制も含む。臓器移植は、FDAにより規制されていない。

### 【0253】

移植医学は、現代医学の最も難易度が高い複雑な分野の1つである。移植拒絶反応の肝要な問題に加えて、外科手術部位での凝血塊形成に続いての凝血塊の血管系への輸送の結果として生じる血栓症は、大きな懸念事項である。

10

### 【0254】

#### F. がん

がん患者における凝固障害の多様性は、腫瘍特異的成長特性、内膜の障害に伴う血管新生、骨髓造血障害、低タンパク質血症、または臓器機能不全に伴う転移性病変の成長から生じる。最近の研究により、凝固障害と腫瘍成長との間の臨床的に意義のある相関が見出された。これらの研究は、特に、微小転移性疾患の処置のために使用される場合、腫瘍転移を制御することを目的として、成長因子に重点を置いた新たな治療戦略を促した。しかし、そのような処置は、生命を脅かす凝固のアンバランスをもたらす可能性がある。

### 【0255】

実際、一部のがんは、正常細胞よりも多くの血栓形成性タンパク質を発現する。これらのタンパク質は、組織因子、コラーゲン、ラミニン、第VII、XIおよびXII因子、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター、アンチトロンビン、ピトロネクチン、フィブロネクチン、およびフィブリノーゲンを含む。これらのタンパク質は、がん細胞表面に出現することもあり、または分泌されることもあり、がん患者にかなり頻繁に起こるがん関連血栓症を誘発し得る。本開示の抗体での安全な抗凝固は、止血不全を有する一部のがん患者を支援することができる。

20

### 【0256】

凝固恒常性は、非外科的がん治療後、特に、出血と血栓症の両方を引き起こす病変を生じさせる術前照射後、さらに損なわれる可能性がある。抗がん化学療法は、肝機能を冒し、凝固促進因子と抗凝固因子の両方の合成を減少させる。ほとんどの化学療法プロトコールは、主要な用量制限副作用として生じる血小板合成に影響を与える。このことは、全身化学療法と局所抗腫瘍療法の併用中に両方に観察された。化学療法により生じる副作用は可逆的であるが、内皮病変は、抗がん処置後何年にもわたって存続することがある。さらに、一部の患者は、化学療法中に少ない血小板数を有し、これらの患者は、出血リスクが高いが、それでもやはり血栓症に対する処置を必要とし得る。

30

### 【0257】

#### G. 脳卒中および心筋梗塞

脳卒中は、脳への血液供給の障害に起因する脳機能の急速な低下である。これは、虚血、血栓、塞栓（詰まった粒子）または出血（hemorrhage）（出血（bleed））に起因し得る。血栓性脳卒中では、血栓（血餅）は、通常はアテローム動脈硬化性プラークの周囲に形成する。動脈の遮断は漸進的であるので、症候性血栓性脳卒中の開始は、より緩徐である。血栓性脳卒中は、大血管疾患および小血管疾患という2つのカテゴリーに分けることができる。前者は、内頸動脈、椎骨のおよびウィリス輪などの、血管を冒す。後者は、ウィリス輪の枝などの、より小さい血管を冒し得る。

40

### 【0258】

心筋梗塞（MI）は、血栓による冠動脈の閉塞に多くの場合起因する、梗塞（虚血に起因する組織の死）により引き起こされる。MIは、救急医療処置が迅速に受けられないと、すぐに致命的になる。最初のエピソード（発作）から12時間以内に診断された場合には、血栓溶解療法が開始される。

### 【0259】

50

## H. 感染

感染が血栓症部位に存在した場合、血栓が分解し、その結果、循環系全体に感染物質（膿血、敗血性血栓）の粒子が拡散され、転移性膿瘍が、どこにあったとしても、開始される可能性がある。感染がなければ、血栓は、離脱し、塞栓として循環に入り、最終的には血管内に詰まって完全に血管を閉塞する可能性があり、これを非常に迅速に処置しなければ、閉鎖後の領域での組織壊死（梗塞）に至る。この閉鎖が冠動脈に存在した場合、心筋が酸素の欠乏に起因して適切に機能することができないことにより、心筋虚血が起こる可能性がある。この酸素欠乏は、ひいては心筋梗塞をもたらす可能性がある。

【0260】

## I. 炎症

FXIIaの阻害は、接触活性化により支持される全ての病的反応を減弱させると予想される。例えば、接触活性化は、アナフィラキシー、血管性浮腫、肺の反応（例えば、喘息）、皮膚の反応、腸の反応、眼の反応、心血管の反応（ショック、浮腫など）、および全身性炎症反応症候群を促進し得る。FXIIaは、血症プレカリクレインを切断することによりカリクレインを産生し、次いでこのプレカリクレインがキニノーゲン1を切断し、ブラジキニン遊離させる。ブラジキニンは、最も強力な公知炎症性メディエーターの1つである。したがって、FXIIaの阻害は、プレカリクレインを減弱し、それによってブラジキニンの生成を低減させるため、ブラジキニン経路が関与する炎症反応および血管調節反応に干渉すると予想される。接触活性化は、補体系の活性化も誘発し得るので、FXII阻害は、補体系が関与する炎症反応を低減すると当然予想される。

【0261】

## J. 併用療法

本開示の抗体を単剤療法として使用することができるが、FXII阻害剤により処置されると予想される病状の処置に使用される他の療法と併用してもよい。例えば、NSAID、血小板阻害剤、抗凝固薬または血栓溶解剤などの、1つまたは複数の追加の抗炎症剤または抗血栓剤の共投与は、ある特定の疾患の処置に有用と考えられる。これらの併用療法は、同じ病態を標的とする他の薬物の必要処置頻度および用量を低減させる可能性がある。共投与または併用療法とは、各々が別々に製剤化されたまたは一緒に1つの組成物に製剤化された治療薬の投与であり、別々に製剤化された場合には、ほぼ同時に投与されるか、または同じ治療期間にだが異なる時点で投与される。

【0262】

以下の実施例は、ある特定の特征および/または実施形態を例証するために提供される。これらの実施例が、記載される特定の特征または実施形態に本開示を限定するとみなすべきでない。

【実施例】

【0263】

（実施例1）

### 材料および方法

この実施例は、実施例2に記載する研究に使用する実験手順および材料を説明する。

【0264】

### 抗FXIIモノクローナル抗体(MAb)の生成

標準的な方法により、FXII欠損マウスに組換えヒトFXII (Ivanov et al., Blood 2017; 129:1527-1537) で免疫し、ハイブリドーマを産生した。クローン5C12は、FXIIおよびFXIIaに結合する抗体を産生する。ハイブリドーマ細胞をサブクローニングし、増やし、標準手順を使用して5C12を精製し、*in vitro*で特徴付け、次いで*in vivo*での実験に使用した。

【0265】

### 5C12の特徴付け

FXII (40 nM) (Haematologic Technologies, Inc., Essex Junction, VT) を0~80 nM 5C12とインキュベート

10

20

30

40

50

し(10分)、次いで1 µg/mlのデキストラン硫酸とインキュベートした(20分)。次いで、Spectrozyme FXIIa(0.5mM)(Sekisui Diagnostics GmbH, Pfungstadt, Germany)を添加して、活性化FXII(FXIIa)による加水分解を測定した。次に、FXII(100nM)および5C12(0~200nM)を共インキュベートし(10分)、次いでキニノーゲン-1(HK、12.5nM)、プレカリクレイン(PK、12.5nM)(Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN)および短鎖または長鎖ポリリン酸塩(10 µM)(60分、最終濃度)で50/50希釈した(Ivanov et al., Blood 2017; 129:1527-1537)。ポリブレン(6 µg/ml)およびダイズトリプシンインヒビター(50 µg/ml)の添加後にアミド分解活性を定量した。FXIIa阻害を試験するために、Spectrozyme FXIIaを、FXIIa(20nM)と5C12(0~40nM)との混合物に添加した。FXII(100nM)活性化に対する5C12(0~100nM)の効果を試験するために、トウモロコシトリプシンインヒビター(CTI、40 µg/ml)、カリクレイン(5nM)およびデキストラン硫酸(10 µg/ml)を共インキュベートした(0~60分)。試料を還元SDS-PAGEにより分離し、抗FXIIポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX)で免疫プロットした。

#### 【0266】

体外式膜型人工肺における血栓形成のヒヒモデル

長期体外露出大腿動脈-静脈(AV)シャント担持ヒヒ(n=3)を、以前に記載された(Gruber and Hanson, Blood 2003; 102:953-955; Crosby et al., ArterThromb Vasc Biol 2013; 33:1670-1678; Gruber et al., Thromb Res 2007; 119:121-127)ように使用した。手短に述べると、ヒヒに<sup>111</sup>I n 標識自己血漿および<sup>125</sup>I 標識相同フィブリンノーゲンを投与し、次いで、それらのAVシャントを伸ばして、食塩水でプライミングした膜型人工肺カートリッジ(Terumo-CAPIOX(登録商標)RX05、Terumo Cardiovascular Group, Ann Arbor, MI)を組み入れ、制限した0.1L/分の流速でAV圧力勾配により駆動される血液によって灌流した。人工肺の中の血小板放射活性を、ガンマカメライメージング(Xelis 3.1ソフトウェアとインターフェイスで接続されたGE-Brivo NM 615、GE Healthcare, Chicago, IL)を使用して記録し、長期AVシャントモデルにおける他のデバイスについて記載されたように計算した(Gruber and Hanson, Blood 2003; 102:953-955; Gruber et al., Thromb Res 2007; 119:121-127; Hanson et al., J Clin Invest 1993; 92:2003-2012; Tucker et al., Blood 2009; 113:936-944)。60分の時点で、カートリッジを除去し、すすぎ、乾燥させ、以前に記載されたような、<sup>125</sup>I フィブリン含量のその後の評価(Gruber and Hanson, Blood 2003; 102:953-955; Hanson et al., J Clin Invest 1993; 92:2003-2012)のために、冷蔵状態で保管した。手短に述べると、人工肺に消化用緩衝液(10mM Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH7.0、35mM SDS)を3日間充填して、捕捉された凝血塊を溶解し、ガンマカウンター(Wizard-3、PerkinElmer, Shelton, CT)を使用して放射活性を測定した。

#### 【0267】

ヒヒの抗凝固

用量設定実験において、1mg/kgの5C12の6連続用量を40分間隔でIV注射し、血漿試料のaPTT延長を測定した。5mg/kgの5C12は、凝固に対してほぼ飽和効果を生じさせることが判明した。灌流の15分前の低用量(20U/kg)のヘパリンは、多少の測定可能なリアルタイム血小板沈着はあるが人工肺の開存性を保ち、これにより、5C12の補足抗凝固による一切の変化の決定が可能になることも分かった。2つの人工肺灌流実験では、人工肺をヘパリン処置せずに灌流した。最も信頼できる実験では、ヘパリン(20U/kg)、5C12(5mg/kg)またはこれらの組合せでの前処置を、人工肺カートリッジ内の血小板停滞に対するそれらの効果について評価した。

## 【0268】

## 止血評価

成人用 Surgicut (登録商標) デバイス (Instrumentation Laboratories, Bedford, MA) を使用して、皮膚の一次止血を評価した。出血時間 (BT) を各実験中に2回記録した。BT試験中の失血を測定した。皮膚創傷を再出血について観察した。プロトロンビン時間 (PT) の延長は、止血障害の最も利用される臨床的に重要なマーカーであるので、KC4コアグロメーターを使用して血漿プロトロンビン時間を測定した。

## 【0269】

## 血液分析

血液試料をクエン酸塩中に採取し、SynthASil (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA) および KC4 (登録商標) Analyzer (TCoag, Ltd, Ireland) を使用して血漿 aPTT を測定した。血液の活性化凝固時間 (ACT) は、LupoTek KCT ( $r^2$ -Diagnostics, South Bend, IN) を使用して決定した。血漿トロンビン-アンチトロンビン複合体 (TAT) および血小板第4因子 (PF4) は、Siemens (Marburg, Germany) および RnD Systems (Minneapolis, MN) からの ELISA キットをそれぞれ用いて測定した。

## 【0270】

## データ分析

数値を本文中には平均および範囲として示し、図中には平均および SEM を示す。GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA) を使用して、処置についての一元配置 ANOVA により、平均を比較した。SigmaPlot 11 (Systat, Inc., Chicago, IL) を使用して、時間および処置についての反復測定 ANOVA により、血小板沈着速度に関するヘパリン結果とヘパリン+5C12結果との間の経時的比較を行った。平均間の差について、 $< 0.05$  の確率を統計的に有意とみなした。

## 【0271】

## (実施例2)

ヒヒにおける第XII因子の抗体阻害は、体外式膜型人工肺内の血液からの血小板沈着を低減させる

この実施例は、FXII特異的モノクローナル抗体5C12の特徴付け、ならびに抗凝固薬として機能するおよび血小板集積を低減させるその能力を記載する。加えて、霊長類モデルを使用して、これらの研究は、FXII阻害が、ヘパリン処置したヒヒとヘパリン処置していないヒヒとの両方において膜型人工肺内の血小板活性化および沈着を低減させることを示す。

## 【0272】

## 5C12はFXIIaを阻害する

5C12 MA b は、ウェスタンブロットのプロテアーゼドメインに結合することにより、アルファ型とベータ型両方のヒトおよびヒヒおよびアフリカミドリザルFXIIを認識したが、試験した他の種のFXIIを認識せず (図3A~3C)、FXII枯渇血漿と混合したヒト血漿とヒヒ血漿との両方のaPTTを延長した (図2A~2B) が、試験した他の種のaPTTを延長しなかった (図2C~2F)。5C12の濃度の増加は、ヒトおよびヒヒ血漿における凝固時間を延長し (図1A~1B)、およそ50~60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (330~400 nM) でFXII枯渇血漿のaPTTに達し、抗体との1:1複合体によるFXIIの阻害を示唆した。よく特徴付けられたFXIIaインヒビター (Hansson et al., J Thromb Haemost 2014; 12:1678-1686) であるCTIと比較して、5C12がより強力であり、200 nMで測定可能なaPTT延長があった (図1C)。5C12は、FXIIを露出してアクチベーターと接触させた場合、アミド分解活性の発生を防止し (図4A~4C)、活性部位阻害と一致して、等モル量のFXIIaのアミド分

10

20

30

40

50

解活性を遮断した(図4D)。5C12は、デキストラン硫酸の存在下ではカリクレインによるFXIIの活性化を阻害しなかった(図4E)。これらのデータは、5C12がFXIIの触媒ドメインに結合することによりFXIIaを阻害することを示す。

【0273】

5C12はin vivoで強力な抗凝固薬である

5C12の投与は、第1の用量漸増時間においてaPTTを4倍およびACTを3倍増加させた(図5A~5B)が、プロトロンビン時間にも循環TATレベルにも影響を与えなかった(図5C~5D)。血小板数、ヘマトクリット、ならびに白血球および赤血球数を含む、全血球計算パラメーターは、正常参照範囲内に留まった(図5E~5H)(Hainsey et al., Lab Anim Sci 1993; 43:236-243)。

10

【0274】

5C12は体外式膜型人工肺内の血小板沈着を阻害する

ヘパリンは、ヒヒにおいて、ベースラインに対してaPTTを1.6倍(1.5~1.7)増加させ、ベースラインに対してACTを1.3倍(1.2~1.5)増加させた(表1)。5mg/kgの5C12の投与は、aPTTを2.6倍(2.3~3.3)およびACTを1.8倍(1.7~1.9)増加させたが、止血障害マーカーであるPTを増加させなかった。ヘパリンと5C12との併用は、aPTTを3.9倍(3.4~4.5)およびACTを2.3倍(2.1~2.3)増加させたが、止血障害マーカーであるPTを増加させなかった。aPTTアッセイで5C12の抗凝固効果を3日間測定可能であった(図5A~5B)。

20

【0275】

【表1】

表1: 抗凝固および体外式膜型人工肺灌流中の凝固パラメーターの変化。aPTT、ACTおよびPT値を抗凝固薬への曝露前の3匹のヒヒにおいて各実験の開始(0分)および終了(60分)時に決定した。

	APTT (秒)		ACT (秒)		PT (秒)	
	開始 (0分)	終了 (60分)	開始 (0分)	終了 (60分)	開始 (0分)	終了 (60分)
ベースライン (n=6)	30.7±0.5		208.5±11.4		8.3±0.2	
ビヒクル (n=2)	30.2±0.5	33.4±0.2	200.5±12.6	176.8±11.4	8.2±0.2	8.3±0.4
ヘパリン (20 U/kg) (n=4)	49.1±2.4	34.2±0.8	271.5±11.2	190.6±5.9	8.6±0.2	8.7±0.2
5C12 (5 mg/kg) (n=3)	79.5±6.9	82.9±4.8	381.5±8.3	394.8±9.9	8.4±0.1	8.6±0.1
5C12 (5 mg/kg) + ヘパリン (20 U/kg) (n=3)	121.0±9.7	77.5±2.7	472.6±25.6	378.7±11.9	9.0±0.1	8.8±0.2

30

40

【0276】

抗凝固処置していないヒヒでは、人工肺内の血小板沈着が5分で検出可能であり(図6A)、灌流開始から30~60分間の血小板停滞速度は、1分当たり10億単位で平均1.64±0.13(bpm)であった(図6B)。ヘパリン処置したヒヒでは、血小板沈着は、25分で測定可能であり、30~60分間に1.21±0.08bpmの速度で成長した(図6B)。5C12の前処置は、血小板停滞速度をヘパリンなしで0.61±0.05bpmに、ヘパリンありで0.56±0.04bpmに低減させた(図6B)。終点血小板沈着は、10億単位で血小板52±11から24±4に低減され、人工肺の終点フィブリン数は、ヘパリンと5C12を補充することにより45±15mgから15

50

± 4 mg に低減された (図 6 C ~ 6 D)。フィブリン数と血小板数は、有意な相関 ( $R^2 = 0.99$ ) を示し、血小板活性化が人工肺血栓形成に肝要な役割を果たすことを示唆していた (図 6 E)。止血パラメーター (出血時間、出血体積、および出血速度) は、全ての処置レジメンのヒビについて正常範囲内に留まった (図 9 A ~ 9 C)。

#### 【0277】

抗凝固処置していないヒビでは、人工肺灌流後、血漿 TAT レベルが  $12 \text{ ng/ml}$  (範囲  $8 \sim 20 \text{ ng/ml}$ ) のベースラインから  $726 \text{ ng/ml}$  (範囲  $521 \sim 938 \text{ ng/ml}$ ) に 60 倍増加した (図 8 A)。ヘパリン処置したヒビでは、TAT は、37 倍増加したが、5C12 をヘパリンと併用したときには TAT が 14 倍増加した。血漿 PF4 レベルは、60 分の人工肺灌流後、未処置のヒビでは 11 倍、ヘパリン処置したヒビでは 7 倍、および 5C12 + ヘパリン併用処置したヒビでは 3 倍増加した (図 8 B)。

10

#### 【0278】

##### 治療適用

本明細書で開示する研究は、5C12 が、接触系を標的とする抗凝固薬であるにもかかわらず、抗凝固薬抗 FXII MA b である 5C12 の静脈内投与が、非ヒト霊長類において体外式膜型人工肺内への血小板集積を有意に低減させることを、初めて実証する。5C12 は、FXII 触媒ドメインに結合し、ここで、5C12 は、カリクレインによる FXII チモーゲンの FXIIa への変換の際にプロテアーゼ活性部位を遮断する位置にある。5C12 MA b は、aPTT および AACT などの、接触活性化により開始される凝固の試験において、主として (排他的とは言わないまでも) トロンビン生成を制限することにより、凝固を阻害する。FXII 活性の阻害は、膜への初期血小板粘着およびその後の膜上への集積に対して十分な効果が予測されていないが、データは、膜型人工肺カートリッジにおける初期平均壁せん断速度の低い計算値にもかかわらず、人工肺内の血小板活性化が、FXIIa 活性によって強く支持され、かつ、フィブリン蓄積に加えて、閉塞性デバイスの障害に寄与する可能性があることを示す。

20

#### 【0279】

ヒビ実験については、aPTT アッセイにおいて測定可能な抗凝固効果を生じさせるが、定量可能な血小板集積を完全に防止しない、低用量のヘパリンを、膜型人工肺に使用した。この用量は、カートリッジの閉鎖を防止するが、5C12 の抗血栓効果を実証することをなお可能にする。小児用 ECMO 中に、出血性合併症につながる高用量のヘパリンが使用される (ELSO Anticoagulation Guideline.2015)。5C12 が、ヘパリンの存在下で明らかに抗血栓性であるという知見は、ヘパリンを、5C12 と併用すると、より低用量で投与することができることを示唆しており、このことは、FXII が止血において未知の役割を果たすので、デバイスを通した血液の灌流を含む ECOS、例えば ECMO の間の潜在的に安全な抗凝固手法を提示し得る。

30

#### 【0280】

FXII の生理的機能は確立されていない。FXII チモーゲンタンパク質は、ほとんどの陸生脊椎動物に見られるが、鳥類および水中に生息するクジラ目動物には非存在である (Ponczek et al., J Thromb Haemost 2008; 6:1876-1883)。陸生脊椎動物のうち、哺乳動物のみが FXII を合成し、この FXII が、FXII と下流のトロンビン生成との間の橋渡しの役割を果たす。しかし、FXIIa は、*in vitro* で FXII 欠乏血漿の接触により開始される凝固時間を短縮し得る (Puyet et al., J Thromb Haemost 2013; 11:1341-1352)。これは、恐らく、FXIIa が、アンチトロンビンなどの一部の凝固インヒビターを含む、いくつかの高分子基質を切断し得るからである。FXII の非生理学的または病原性の役割は、幾人かの研究者により、ほとんどが実験条件下で、そしてまた少数が臨床的に示されている。例えば、FXII は、実験的胚着床を促進し (Matsubayashi et al., Am J Reprod Immunol 2008; 59:316-322; Kawato et al., Reprod Fertil Dev 2009; 21:840-847)、組織修復、血管新生および有糸分裂誘発を促進し (LaRusch et al., Blood 2010; 115:5111-5120)、カリクレイン活性化およびブラジキニン生成によって血管拡張および炎症を増進させ (Bjoerkqvist et al., Thromb Haem

40

50

ost 2013; 110:399-407)、樹状細胞相互作用による自己免疫疾患発病に寄与し得 (Go bel et al., NatCommun 2016; 7:11626)、実験的血栓形成プロセスに寄与し得 (米国特許第9,574,013号; Larsson et al., SciTransl Med 6:222ra17, 2014; Worm et al., Ann Transl Med 3:247, 2015)、好中球により産生されるF X I Iは、正常な好中球機能に関与するようである (Stavrouet al., J Clin Invest 2018; 128:944-959)。これら全てのデータに反して、病態はF X I I欠損と関連付けられていないが、C1Inhなどの天然F X I I aインヒビターの欠損は、局所および全身性反応を生じさせることがあり、このことは、血管性浮腫の際に見られるものなどの、接触活性化および過剰なブラジキニン生成の障害の低減と一致する。本明細書で開示するデータは、血栓形成と出血の両方が差し迫ったりスクである医学的手技においてもF X I I障害を利用す

10

## 【0281】

低い正常F X I Iレベルと心血管疾患との間の関連性を示す疫学的観察に基づいて、一部の研究者は、これらのデータから推定して、F X I I活性の大幅な低減 (例えば、F X I I欠損) が血栓症のリスク増加に関連し得ると提言した (Goodnough et al., Med 1983; 62:248-255; Kuhli et al., Am J Ophthalmol 2004; 137:459-464)。しかし、F X I I欠損時の心血管疾患の発生率、予後または罹患率は、確立されず、一般集団についての他の観察研究は、F X I Iレベルと血栓症の素因との間に何の関連性も見出さなかつた (Girolamiet al., J Thromb Thrombolysis 2004; 17:139-143; Zeerleder et al., Thromb Haemost 1999; 82:1240-1246)。F X I I aの基質であるF X Iの欠損は、軽度から中等度の出血性素因の原因となり得る一方で、血栓症のリスクを低下させもする (Salomonet al., Thromb Haemost 2011; 105:269-273; Preis et al., Blood 2017; 129:1210-1215; Salomon et al., Blood 2008; 111:4113-4117)。F X I I障害剤は、臨床開発中であり (Tillmanet al., Blood Rev 2018; 32:433-448; Gailaniet al., J Thromb Haemost 2015; 13:1383-1395)、F X I アンチセンスオリゴヌクレオチドは、膝置換術後の静脈血栓塞栓症予防のための第2相試験において改善された転帰を実証している (Bulleret al., N Engl J Med 2015; 372:232-240)。アンチセンスオリゴヌクレオチドでのF X I IまたはF X I Iどちらかの障害は、カテーテル誘導血栓症のウサギモデルにおいて同様の抗血栓有効性および安全性を示した (Yauet al., Blood 2014; 123:2102-2107)。F X I I障害剤の開発は、初期段階である。一部のモノクローナル抗F X I I / F X I I a抗体は、既に記載されているが、どれもヒト試験に達していない。数十年前に、モノクローナル抗F X I I抗体であるC6B7は、敗血症のヒヒモデルにおいて低血圧を低減させることが見出されたが、播種性血管内凝固症候群 (DIC)の徴候を減少させなかつた。しかしながら、この抗体のみが、ヒヒ血漿においてF X I I活性を約60%障害した (Pixleyet al., J Clin Invest 1993; 91:61-68)。より最近では、抗F X I I aモノクローナル抗体3F7は、ウサギECMOモデルにおいて血栓形成を低減させたため、遺伝性血管性浮腫に対する潜在的処置として評価されているところである (Larssonet al., Sci Transl Med 2014; 6:222ra17; Worm et al., Ann Transl Med 2015; 3:247; Farkaset al., Expert Opin Investig Drugs 2018; 27:87-103)。F X I Iを標的とする他の手法としては、C T Iに基づく合成ペプチド (Baeriswylet al., ACS Chem Biol 2015; 10:1861-1870)、抗F X I Iナノボディ (de Maat et al., ThrombHaemost 2013; 110:458-468)、およびヌクレアーゼ耐性F X I I障害性RNAアプタマー (Woodruff et al., J ThrombHaemost 2013; 11:1364-1373)が挙げられる。F X I Iアンチセンスオリゴヌクレオチドは、動物研究でも試験されている (Yau et al., Blood 2014; 123:2102-2107)。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、有効性を達成し、持続的F X I I欠損を生じさせるのに、何週間も要する (Bulleret al., N Engl J Med 2015; 372:232-240)ので、長期血栓予防に有用である可能性が高い。

20

30

40

50

## 【0282】

この研究の結果は、5C12MAbが、*in vivo*で循環FXIIと阻害性複合体を形成し、その結果、テンプレート出血時間の認識できる変化を伴うことなく、体外式膜型人工肺デバイスにおける血小板依存性血栓形成の有効な低減をもたらすことを示す。重要なこととして、5C12とヘパリンの併用が、単独のヘパリンによる抗凝固の抗血栓有効性を向上させることを実証した。

## 【0283】

## (実施例3)

致死性*S. aureus*曝露のヒヒモデルにおける5C12(AB053)を使用するFXIIa阻害の評価

この実施例は、致死性全身性炎症反応症候群(SIRS)のヒヒモデルにおける予防的5C12(本明細書では以降、「AB053」と呼ぶ)の効果を評価するための研究を説明する。血管内凝固および/または凝固障害を伴うまたは伴わないSIRSが、敗血症を予防または処置するために細菌性抗生物質を摂取した患者において時には観察されることもある。300億個の熱不活化*S. aureus*菌の長さ2時間の静脈内注入の直前に、ヒヒにAB053の「飽和」用量(10mg/kg)を静脈内投与した、または抗体を投与しなかった。追加のAB053の2用量を8時間後(10mg/kg)および24時間後(5mg/kg)に投与した。バイタルサインをモニターし、血液試料を採取して、臓器機能ならびに凝固、炎症および臓器傷害のマーカーを測定した。未処置動物(n=3)は、モニターした事実上全てのマーカーが6~24時間以内に有意に変化して重度のSIRSおよびショックを発症したため、48時間以内に安楽死させなければならなかった。対照的に、AB053(n=3)を投与したヒヒは、重症疾患であるSIRSを発症せず、血液マーカーの大きな変化がなく、生き残った。生存体は、最終分析のために7日後に安楽死させた。この研究の結果は、AB053でのほぼ完全なFXIIa阻害が、ヒヒにおける*S. aureus*誘導致死性SIRSの発症を防止し得ることを示す。

## 【0284】

## 生化学試験

血糖は、Contour Next血糖測定器(Bayer HealthCare LLC、Mishawaka、IN)を使用して測定した。血中乳酸は、Lactate Scout(EKF Diagnostics GmbH、Barleben、Germany)により測定した。血清アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アミラーゼ、クレアチニン、血中尿素窒素、カリウム、リン酸および乳酸デヒドロゲナーゼレベルは、標準的な臨床検査を使用して測定した。血漿中のミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性は、FluoroMPOミエロペルオキシダーゼ検出キット(Cell Technology、Fremont、CA)を使用して定量した。

## 【0285】

## CBC

K<sub>2</sub>-EDTA被覆バイアルに採取した血液を使用して全血球数(CBC)を測定し、Abaxis Vetscan HM5(Abaxis、Union City、CA)を使用して分析した。

## 【0286】

## aPTT

活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)を、0.32%クエン酸ナトリウム(最終濃度)で抗凝固処置した血漿試料において決定した。50μLの血漿を50μLのaPTT試薬(Pacific Hemostasis Kontakt、カタログ番号100312TS、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA)と3分間、37℃でインキュベートした。インキュベーション後、50μLの25mM CaCl<sub>2</sub>(Pacific Hemostasis CaCl<sub>2</sub>、カタログ番号100314TS、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA)を添加し、凝固までの時間をKC4A Analyzer(Amelung GmbH

10

20

30

40

50

、 Lemgo, Germany ) で決定した。

【0287】

PT

プロトロンビン時間 (PT) を、0.32%クエン酸ナトリウムで抗凝固処置した血漿試料において決定した。50  $\mu$ L の血漿を1分間、37 でインキュベートした。インキュベーション後、100  $\mu$ L の Pacific Hemostasis Thromboplastin - DS (カタログ番号100354TS、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) を添加し、凝固までの時間を KC4A Analyzer で決定した。

【0288】

アンチトロンビン ELISA アッセイ

活性化された因子とアンチトロンビンの複合体 (FXIIa - AT、カリクレイン - AT、FXIa - AT、FVIIa - AT、TAT) をカスタム酵素結合免疫吸着検定法によって測定した。プレートを一晩、4 で、次の親和性精製抗体 (100  $\mu$ L / ウェル) のうちの1つでコーティングした: (i) ヤギ抗ヒトFXII (2  $\mu$ g / mL); (ii) ヒツジ抗ヒトFXI (2  $\mu$ g / mL); (iii) ヒツジ抗ヒトトロンビン (2  $\mu$ g / mL)、全て Affinity Biologicals から; または (iv) ヤギ抗ヒトFVII (0.3  $\mu$ g / mL、R&D Systems、Minneapolis、MN、USA) または (v) ヒツジ抗ヒトプレカリクレイン抗体 (Affinity Biologicals)。各ステップの後、0.1% Tween - 20 を含有する PBS でプレートを洗浄し、次いで、1% BSA を含有する同じ緩衝液でブロッキングした。EDTA 血漿試料を、1% BSA、5mM EDTA、5mM ベンズアミジン塩酸塩、0.1% Tween - 20 を含有する PBS 中で60分間インキュベートした。ビオチン化親和性精製ヒツジ抗ヒトアンチトロンビン (0.5  $\mu$ g / mL、Affinity Biologicals)、続いてストレプトアビジン - HRP (400ng / mL、Jackson ImmunoResearch Laboratories、West Grove、PA、USA) およびオルト - フェニレンジアミン (OPD) を基質として検出に使用した。吸光度値を492nmで記録した。

【0289】

他の ELISA アッセイ

血漿キニノーゲン (全ての形態)、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI - 1)、および組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) は、DuoSet ELISA キット (R&D Systems、Minneapolis、MN) を使用して定量した。プラスミン - アンチプラスミン複合体については、親和性精製ヤギ抗ヒトプラスミノゲン (2  $\mu$ g / mL、Affinity Biologicals) を捕捉抗体として、およびホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ヒト2 - アンチプラスミン (1  $\mu$ g / mL、Affinity Biologicals) を検出抗体として使用した。D - ダイマー ELISA は、マウスモノクローナル抗ヒトD - ダイマー (クローンDD1、1  $\mu$ g / mL、Novus Biologicals、Littleton、CO) を捕捉抗体として、およびホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートヒツジ抗ヒトフィブリノーゲン (2  $\mu$ g / mL、Affinity Biologicals) を検出抗体として使用して行った。血漿サイトカインは、MILLIPLEX MAP Non - Human Primate Cytokine Magnetic Bead Panel (EMD Millipore、Billerica、MA) を使用して定量した。C3b は、捕捉のためにマウスモノクローナル抗ヒトC3b / c IgG、クローンC3 - 28 (Cell Sciences) を、および検出抗体としてヤギ抗ヒトC3 (Complement Technologies) を使用して測定した。C5b - 9 は、モノクローナル抗体 aE11 (Enzo Life Sciences) を捕捉抗体として使用して測定し、抗ヒトC6ビオチン化抗体 (Quidel Corporation、San Diego、CA) を検出抗体として使用した。ヌクレオソ

10

20

30

40

50

ームは、Cell Death Detection ELISA PLUSキット (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を使用して定量した。

【0290】

#### 細菌

*S. aureus* 亜種 *aureus* Rosenbach (ATCC 12598) を American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) から購入した。細菌の標準投与を制御し、生きている生物による潜在的交絡効果を回避するために、対数期培養 *S. aureus* を食塩水で十分に洗浄し、計数し、次いで、1時間、70℃で加熱した。分割量を使用するまで -80℃で保管した。均一性のために、動物を単一の調製物からの細菌に曝露した。

10

【0291】

#### 動物

合計6匹の動物をこれらの最終研究に使用した。体重6.7~20.2kgの間の6匹の健康な若年ヒヒ (*Papio anubis* および *ursinus*) を使用した。対照群動物からのデータを、FXIの接触活性化を阻害するAB023 (Silasi et al., Blood Advances 3(4):658-669 2019) であるFXI抗体を使用して研究の一部として発表した。

【0292】

#### 実験

実験計画は、対照群 (n = 3) および処置群 (n = 3) という2つのアームを含んだ。2時間にわたるIV注入により投与して、300億個の熱不活化 *S. aureus* 菌 (ヒヒにおける確証された致死用量) に両方の群の動物を曝露した。未処置群には細菌注入のみを投与したが、処置群には、細菌注入の30分前に開始してAB053 (10mg/kg) のボラス (前処置) を投与し、追加の2回のIVボラス注射を *S. aureus* 注入開始後8時間 (10mg/kg) および24時間 (5mg/kg) の時点で投与した。細菌注入を開始した時点をもT0と指定した。細菌注入の開始から8時間後 (T + 8) に、動物を回復ケージに戻し、動物が、回復不能の臓器不全および敗血症ショックの徴候を呈するまで観察し、呈した時点で動物を人道的に安楽死させた。生き残った動物は、7日目に安楽死させた。

20

30

【0293】

#### 救命救急モニタリング

呼吸および心拍数、体温および平均全身動脈血圧 (MSAP) を Cardell Max-12 HD Duo モニターでモニターした。これらの生理学的データは、動物を回復ケージに戻すまでの最初の8時間は15分に1回、次いで3日間毎日1回、次いで7日目に、各々の血液試料採取の前に記録した。

【0294】

#### 血液試料採取

全身血液試料を、T - 0.5、0、+ 2、+ 4、+ 6、+ 8、+ 24、+ 48、+ 72 および + 168時間に、次の抗凝固薬および血液体積を使用して採取した：K<sub>2</sub>-EDTA被覆バイアルに血液3mL、0.32%クエン酸ナトリウムを含有するバイアルに血液2mL、および血清のために血液1mL。最初の24時間にわたって採血した血液の総量は、動物の計算血液体積 (70mL/kg) の10%未満であった。

40

【0295】

#### データおよび統計分析

Prism (GraphPad Software 7.0d) を統計分析に使用した。データを平均 ± 平均の標準誤差として示す。各時点で両側スチューデントt検定を使用して2群間の比較を行った。結果は、\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001で有意とみなした。ログランクマンテル・コックス検定を生存曲線の比較に使用した。

【0296】

50

この研究の主要エンドポイントは、生存期間であった。未処置（陰性対照）群では、動物3匹のうち2匹を24時間以内に、3匹目を2日目に安楽死させる必要があったが、AB053処置動物3匹は全て7日目まで生存した。AB053前処置は、aPTTを100秒より大きい値に増加させたが、対照動物で観察された*S. aureus*曝露に起因するaPTT上昇を促進しなかった。加えて、AB053処置は、PTの*S. aureus*誘導増加を減弱した。凝固活性化を、いくつかの凝固酵素とのアンチトロンビン複合体のレベルの変化として評価した。アンチトロンビン-酵素複合体は、*S. aureus*曝露から数時間以内に増加し、AB053処置は、この応答を鈍化させた。AB053処置は、フィブリノーゲン消費およびフィブリン（フィブリノーゲン）溶解の活性化も減弱した。*S. aureus*曝露後に増加する補体活性化のマーカおよび細胞死のマーカ

10

【0297】

結論

20

この研究の結果は、AB053がヒヒにおいて*S. aureus*曝露誘導致死性SIRSからの有効な防御をもたらすことを示す。未処置対照と比較して、全てのAB053処置動物は、致死用量の*S. aureus*を生き延びた。結果は、FXIIが*S. aureus*曝露誘導致死性SIRSの発症において重要な病因的役割を果たすことを示唆している。

【0298】

（実施例4）

5C12のヒト化（AB053）

この実施例は、マウス抗体5C12（本明細書では「AB053」とも呼ばれる）の配列の基づくヒト化抗体のライブラリーの生成を記載する。

30

【0299】

抗体

AB053を実施例1で説明したように生成した。AB053のヒト化は、LakePharma（Belmont, CA）におけるCDRグラフィティング技術により行った。

【0300】

発現ベクターの構築

ヒト化実験で設計した可変領域配列を先ず合成することにより、完全長抗体遺伝子を構築した。配列を哺乳動物細胞における発現用に最適化した。次いで、これらの可変領域配列を、ヒトIgG4（S241Pヒンジ改変）Fcドメインを既に含有する発現ベクターにクローニングした。

40

【0301】

比較のために、マウスAB053重鎖および軽鎖の可変領域を、上記と同じ骨格ヒトFc配列を使用して完全長キメラ鎖として構築した。

【0302】

小規模生産

3つのヒト化重鎖と3つのヒト化軽鎖の組合せにより生成した9つのヒト化抗体は、0.01L産生をもたらした。キメラ親抗体も、直接比較のために規模を拡大した。抗体産生用の無血清既知組成培地を使用して、示した重鎖および軽鎖についてのプラスミドを浮遊HEK293細胞にトランスフェクトした。次いで、MabSelect SuReプロテインA樹脂（GE Healthcare）を使用して、条件培地から完全長抗体を

50

精製した。

【0303】

結果

3つのヒト化重鎖を2つの異なるヒト重鎖アクセプターフレームワークに基づいて設計し、3つのヒト化軽鎖を2つの異なるヒト軽鎖アクセプターフレームワークに基づいて設計した(表2)。

【0304】

【表2】

表 2: ヒト化鎖情報

鎖名	鎖型	アクセプターフレームワーク
H7879 (キメラ親)	重鎖	該当なし
L7879 (キメラ親)	軽鎖	該当なし
H7880 (ヒト化 HC1)	重鎖	HC フレームワーク 1
H7881 (ヒト化 HC2)	重鎖	HC フレームワーク 1
H7882 (ヒト化 HC3)	重鎖	HC フレームワーク 2
L7880 (ヒト化 LC1)	軽鎖	LC フレームワーク 1
L7881 (ヒト化 LC2)	軽鎖	LC フレームワーク 1
L7882 (ヒト化 LC3)	軽鎖	LC フレームワーク 2

10

20

【0305】

第1のヒト化重/軽鎖は、第1のそれぞれのフレームワークを利用し、最も多いヒト配列と最も少ない親抗体フレームワーク配列(ヒト化HC1およびLC1;それぞれ、配列番号7および9)を含有する。第2のヒト化重/軽鎖は、ヒト化HC1/LC1と同じフレームワークを使用するが、追加の親配列(ヒト化HC2およびLC2;それぞれ、配列番号13および17)を含有する。第3のヒト化重/軽鎖は、第2のそれぞれのフレームワークを利用し、ヒト化HC2/LC2と同様に、ヒトフレームワークと融合した追加の親配列(ヒト化HC3およびLC3;それぞれ、配列番号15および19)も含有する。

30

【0306】

次いで、ヒト化重鎖および軽鎖を組み合わせて、9つのバリエーション完全ヒト化抗体を作出し、マウスモノクローナル抗体AB053の可変領域とIgG4、S241Pヒンジ改変、ヒトFc領域とを含有するキメラ抗体も作出した。(表3)。最有力ヒト化抗体候補の試験および選択(実施例5を参照されたい)のために小規模生産でこれらの抗体をHEK293に一過性発現させ、産生させた。

【0307】

40

50

## 【表 3】

表 3: HEK293 細胞に一過性発現させた抗体

抗体名	抗体 ID	力価 (mg/L)
キメラ	PP13892	80
HC1 + LC1	PP13893	128
HC1 + LC2	PP13894	59
HC1 + LC3	PP13895	114
HC2 + LC1	PP13896	26
HC2 + LC2	PP13897	63
HC2 + LC3	PP13898	72
HC3 + LC1	PP13899	88
HC3 + LC2	PP13900	71
HC3 + LC3	PP13901	153

10

20

## 【0308】

(実施例 5)

## 最有力ヒト化候補の選択

この実施例は、実施例 4 で説明した 9 つの抗体からの最有力ヒト化抗体の同定を説明する。抗体を、ヒト性スコア、結合特性 (ELISA、Octet)、aPTT、および FXIIa 活性の阻害により評価した。

## 【0309】

## ヒト性スコア

モノクローナル抗体のヒト性スコア (T20 スコア) を計算するツールが、Lake Pharma (Gao et al., BMC Biotechnology 13:55, 2013) により開発された。手短に述べると、T20 スコアは、可変領域の一次配列を分析することにより抗体のヒト性の程度を表す。完全長重鎖について、79 またはそれより高いスコアは、ヒトのように見えることを示し、完全長カッパ軽鎖について、86 またはそれより高いスコアは、ヒトのように見えることを示す。完全長可変領域についての T20 スコアは、ヒト化の間に手つかずの状態を保たれる CDR 領域の低いヒト性による有意な影響を受ける可能性があるため、ヒト化抗体のフレームワークについての T20 スコアも計算した。重鎖フレームワークについて、84 またはそれより高いスコアは、ヒトのように見えることを示し、カッパ軽鎖フレームワークについて、90 またはそれより高いスコアはワーク、ヒトのように見えることを示す。

30

## 【0310】

## ELISA

1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のヒト FXII (Enzyme Research Labs、#HFXXII 1212) で ELISA プレートを 4 で一晩、コーティングした。コーティングしたプレートを、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中の 2% BSA で、室温で 1 時間ブロッキングし、次いで PBS で 3 回洗浄した。試験した全ての抗体 (PP13892 ~ PP13901 またはヒト Fc アイソタイプ対照) を試料希釈剤で、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  から出発する 5 倍段階希釈の 11 点に希釈した。各試料を 2 連で実行した。各濃度をコーティングしたプレートで 1 時間、室温でインキュベートし、その後、PBS で 3 回洗浄した。結合した抗体をヤギ抗ヒト IgG-HRP で検出し、PBS で 6 回洗浄した。TMB 基質を各ウェルに添加し、1 M HCl で反応を停止した。吸光度を 450 nm で読み取った。

40

50

## 【0311】

450 nmで測定したODを抗体濃度の対数に対してプロットすることにより濃度応答曲線のEC<sub>50</sub>を計算し、このEC<sub>50</sub>は、非線形分析により計算した。

## 【0312】

## Octet

複数濃度動態実験を、Octet RED96システム(ForteBio)で行った。抗ヒトFcバイオセンサー(ForteBio)を試料希釈剤(PBSおよび0.02% Tween 20中の、0.1% BSA)で含水させ、pH 1.9のグリシンで事前調整した。抗原を、試料希釈剤で、200 nMから出発する3倍段階希釈の7点に希釈した。抗体を試料希釈剤で1 μg/mlに希釈し、次いで抗ヒトFcバイオセンサー上に固定した。試料希釈剤中で30秒間、ベースラインを確立した後、バイオセンサーを、段階希釈抗原を含有するウェルに移して、会合および解離を測定した。会合を180秒間観察し、解離を300秒間観察した。動態のセンサーグラムを一価結合モデル(1:1結合)にフィッティングすることにより、結合親和性を特徴付けた。

10

## 【0313】

## aPTT

0.38%クエン酸ナトリウムで抗凝固処置したヒトプール血漿(90 μL)(3名の個々の対象由来)を、様々な濃度(0~75または100 μg/mL)の抗体または対照(PBS)10 μLと混合し、室温で5分間、インキュベートした。次いで、40 μLの血漿/抗体混合物を40 μLのaPTT試薬(SynthASil、#0020006800、Instrumentation Laboratory、Bedford、MA)と3分間、37 °Cでインキュベートした。3分のインキュベーション後、40 μLのCaCl<sub>2</sub>を添加し、凝固までの時間をKC4 Analyzer(TCoag)で決定した。各試料を2連でアッセイした。

20

## 【0314】

## FXIIa阻害

HEPES緩衝食塩水(HBS)+0.1%BSA中の20 nM FXIIa(Enzyme Research Labs # HFXIIa 3350)の溶液を調製した。各ヒト化抗体ならびにマウスモノクローナルAB053およびキメラ抗体を、20 nM FXIIa溶液に、10 nMの最終抗体濃度になるように添加した。90 μLの各抗体試料を96ウェルプレートに2連で播種し、10 μLの発色性基質S-2302を各ウェルに添加した。プレートを405 nmで15分間、37 °Cで読み取った。

30

## 【0315】

## ヒト化鎖のヒト性スコアの計算

親およびヒト化抗体についてのT20スコアを表4に示す。

## 【0316】

40

50

【表 4】

表 4: 全てのヒト化鎖についてのヒト性スコア

VH	完全長 (フレームワーク+CDR) カットオフ = 79	フレームワークのみ カットオフ = 84
親	73	72
HC1	88	93
HC2	86	89
HC3	88	90

VL	完全長 (フレームワーク+CDR) カットオフ = 79	フレームワークのみ カットオフ = 84
親	63.1	68
LC1	88	96
LC2	86	93
LC3	85	91

10

【0317】

E L I S A による親和性測定

E L I S A からの親和性測定結果を図 1 1 に示し、各抗体についての計算した E C 5 0 を表 5 に提示する。

【表 5】

表 5: ヒト化およびキメラ抗体の計算した EC<sub>50</sub>

抗体 ID	EC <sub>50</sub> (ng/mL)	R <sup>2</sup>	
キメラ	PP13892	9.036	0.9989
HC1 + LC1	PP13893	9.116	0.9985
HC1 + LC2	PP13894	8.222	0.9984
HC1 + LC3	PP13895	9.018	0.9990
HC2 + LC1	PP13896	8.238	0.9993
HC2 + LC2	PP13897	8.777	0.9991
HC2 + LC3	PP13898	8.093	0.9994
HC3 + LC1	PP13899	8.479	0.9992
HC3 + LC2	PP13900	7.695	0.9992
HC3 + LC3	PP13901	9.467	0.9987

30

【0318】

O c t e t による親和性測定

O c t e t により測定したヒト化抗体 9 つおよびキメラ抗体の親和性測定値を表 6 に示す。

【0319】

40

50

【表 6】

表 6: ヒト化およびキメラ抗体の動態測定値

抗体 ID	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)
PP13892	2.4E-10	4.6E+05	1.1E-04
PP13893	3.0E-10	5.3E+05	1.6E-04
PP13894	3.0E-10	5.3E+05	1.6E-04
PP13895	4.1E-10	5.0E+05	2.0E-04
PP13896	4.4E-10	5.0E+05	2.2E-04
PP13897	1.5E-10	6.2E+05	9.0E-05
PP13898	3.1E-10	5.0E+05	1.6E-04
PP13899	2.7E-10	5.6E+05	1.5E-04
PP13900	3.2E-10	5.8E+05	1.9E-04
PP13901	3.5E-10	5.3E+05	1.8E-04

KD = 平衡解離定数

Kon = 会合定数

Koff = 解離定数

【0320】

a P T T スクリーン

ヒト血漿における a P T T 濃度応答曲線からの結果を図 1 2 に示す。

【0321】

F X I I a 活性に対するヒト化抗体の効果

F X I I a 活性に対する 5 C 1 2 抗体バリエーションの固定濃度の効果を図 1 3 に示す。上記のデータに基づいて、ヒト化抗体 P P 1 3 8 9 3 ( H C 1 + L C 1 ) を抗体 A B 0 5 4 としての継続開発の最有力候補として選択した。

【0322】

ヒトおよびヒヒ血漿における a P T T に対する A B 0 5 4 と A B 0 5 3 の比較

ヒトおよびヒヒ血漿における a P T T 延長に対する A B 0 5 4 の効果を、マウス親抗体である A B 0 5 3 の効果と比較した ( 図 1 4 A ~ 1 4 B ) 。

【0323】

概要

この実施例に記載した結果は、A B 0 5 3 のヒト化に成功したことを実証し、P P 1 3 8 9 3 ( 本明細書では以降、「A B 0 5 4」と呼ぶ) をさらなる研究に選択した。抗体 A B 0 5 4 は、0.3 mM の K D を有し、この抗体 A B 0 5 4 が、マウスモノクローナル A B 0 5 3 と同様にヒトおよびヒヒ血漿において a P T T を延長することを明らかにした。加えて、A B 0 5 4 は、ヒト F X I I a を阻害し、F X I I への結合および F X I I a 活性の阻害がヒト化後に維持されることを裏付けた。

【0324】

( 実施例 6 )

膜型人工肺灌流システムにおける A B 0 5 4 の抗血栓有効性の評価

この実施例は、表面で開始される血栓形成のモデルにおける A B 0 5 4 の抗血栓効果を評価するための研究を説明する。ヒヒにおける表面で開始される血栓形成のモデルで抗体を試験した。体外式膜型人工肺に使用される小児用膜型人工肺を、ヒヒ動静脈シャントの拡張ループに挿入した。膜型人工肺内での凝血塊形成および成長を、A B 0 5 4、ヘパリ

10

20

30

40

50

ンまたはこれら2つの組合せでの処置後に測定した。本明細書で開示するデータは、単独でのまたはヘパリンとの組合せでのA B 0 5 4が膜型人工肺デバイス内での血栓形成を低減させることを示す。

#### 【0325】

##### 序論

カテーテル、ステント、グラフト、フィルターおよび体外臓器支援システムを含む、血液接触医療デバイスは、システム内への血栓集積に起因して故障することがあり、デバイス関連血栓塞栓症を誘発する可能性もある。開存性を維持するために、様々な時間長にわたって灌流されるデバイスは、出血の発生率および/または重症度を増加させる予防的抗凝固を必要とする。体外式膜型人工肺( E C M O )は、悪化したインフルエンザの症例などにおける急性呼吸不全の短期管理のための使用、または急性心不全の一次的緩和における使用がますます増えてきているが、その恩恵は、抗凝固関連出血により低減される。E C M Oシステムは、血小板の活性化を促進するいくつかの構成成分、ならびに流血に曝露されるホロファイバーおよび膜を含む、血液凝固接触システムを有する。血液凝固接触活性化経路の阻害は、代替のより安全な抗凝固手法として提案されている。

10

#### 【0326】

a P T T、A C T、P TおよびC B C

活性化部分トロンボプラスチン時間( a P T T )は、0.32%クエン酸ナトリウムで抗凝固処置した血漿試料において決定した。40  $\mu$  Lの血漿を40  $\mu$  Lのa P T T試薬( S y n t h A S i l、# 0 0 2 0 0 0 6 8 0 0、I n s t r u m e n t a t i o n L a b o r a t o r y、B e d f o r d、M A )と3分間、37  $^{\circ}$  Cでインキュベートした。インキュベーション後、40  $\mu$  Lの20 mM C a C l <sub>2</sub>を添加し、凝固までの時間をK C 4 A n a l y z e r ( T C o a g、L t d、I r e l a n d )で決定した。

20

#### 【0327】

活性化凝固時間( A C T )は、抗凝固処置していない血液試料で決定した。採血直後に、K C 4 ( 商標 ) A n a l y z e r ( T C o a g、L t d、I r e l a n d )を使用して40  $\mu$  Lの血液を40  $\mu$  LのL u p o T e k K C T ( r <sup>2</sup> - D i a g n o s t i c s、S o u t h B e n d、I N )に添加し、凝固までの時間を記録した。

#### 【0328】

プロトロンビン時間( P T )は、0.32%クエン酸ナトリウムで抗凝固処置した血漿試料において決定した。40  $\mu$  Lの血漿を3分間、37  $^{\circ}$  Cでインキュベートした。インキュベーション後、40  $\mu$  LのD a d e ( 登録商標 ) I n n o v i n ( 登録商標 ) ( S i e m e n s H e a l t h c a r e、M a r b u r g、G e r m a n y )を添加し、凝固までの時間をK C 4 A n a l y z e rで決定した。

30

#### 【0329】

K<sub>2</sub>-E D T A被覆バイアルに採取した0.25 mLの血液を使用して全血球数( C B C )を測定し、H e m a v e t 9 5 0 F S ( E r b a D i a g n o s t i c s、G e r m a n y )を使用して分析した。

#### 【0330】

A B 0 5 4 抗体の生成

40

実験グレードA B 0 5 4を、L a k e P h a r m a ( B e l m o n t、C A )においてH E K 2 9 3細胞中での一過性発現により生成した。手短に述べると、各DNA発現構築物の規模を拡大して、トランスフェクションに適切な量にした。トランスフェクションに進む前に、品質評価のためにプラスミドDNAをアガロースゲル上で泳動させ、配列を確認した。浮遊H E K 2 9 3細胞を振盪フラスコに播種し、無血清既知組成培地を使用して増やした。トランスフェクションの日、増やした細胞を、新鮮培地が入っている新たなフラスコに播種した。L a k e P h a r m a標準操作手順を使用して、各DNA構築物をH E K 2 9 3細胞に一過性トランスフェクトした。細胞を、産生工程終了まで流加培養物( C 4 5 4 1およびC 4 5 4 2、M e d n a )として維持した。

#### 【0331】

50

一過的產生工程からの条件培地を回収し、遠心分離および濾過により清澄化した。結合用緩衝液と事前に平衡させたプロテインAカラムに、上清を添加した。OD280値(NanoDrop、Thermo Scientific)を測定してゼロになるまで、洗浄用緩衝液をカラムに通した。標的タンパク質を低pH緩衝液で溶出し、画分を回収し、各画分のOD280値を記録した。標的タンパク質を含有する画分をプールし、0.2µm膜フィルターによって濾過した。タンパク質濃度は、OD280値および算出吸光係数(1.60mg/mL<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)から計算した。

【0332】

動物

合計9の人工肺灌流実験を2匹のヒヒで行い、これらの実験に3つの処置群を含めた(表7)。実験を各ヒヒにおいて2週間の期間にわたって行った。

10

【0333】

処置群

- 第1群：膜型人工肺灌流の開始の15分前にヘパリン(20U/kg)を投与した(n=3)
- 第2群：膜型人工肺灌流の開始の30分前にAB054(5mg/kg)を投与した(n=3)
- 第3群：膜型人工肺灌流の開始の30分前にAB054(2mg/kg)を投与し、15分前にヘパリン(20U/kg)を投与した(n=3)。この群では、完全FXII阻害を維持するために24時間前に投与したAB054(5mg/kg)に加えて2mg/kgのAB054を追加した。

20

【0334】

【表7】

表7: 各ヒヒについての処置の要約

	実験	ヒヒ1	ヒヒ2
1週目	1	20 U/kg ヘパリン	20 U/kg ヘパリン
	2	20 U/kg ヘパリン	5 mg/kg AB054
	3		+ 2 mg/kg AB054 + 20 U/kg ヘパリン
2週目	4	5 mg/kg AB054	5 mg/kg AB054
	5	+ 2 mg/kg AB054	+ 2 mg/kg AB054
		+ 20 U/kg ヘパリン	+ 20 U/kg ヘパリン

30

【0335】

膜型人工肺灌流

非終末期膜型人工肺灌流実験を、体重9~15kgの若年のオスのヒヒ(papioanubis)で行った。各ヒヒは、外科的に留置して治癒した、大腿動脈と大腿静脈を接続する長期体外露出動静脈(AV)シャントを有していた。灌流実験の期間(60分)の間に、長期AVシャントを伸ばして、食塩水でプライミングした人工肺カートリッジ(Terumo-CAPiox(登録商標)RX05、被覆ホローファイバー設計、Terumo Cardiovascular Group、Ann Arbor、MI)を組み入れた。灌流を100mL/分の制御流速に設定した。

40

【0336】

実験は、座位で拘束した、軽度の鎮静をかけた、または覚醒した動物で行った。ケージから研究室に移す前に、急性ケタミン鎮静(10mg/kg)またはテラゾール(5mg/kg)で動物に鎮静をかけた。ケージに戻すために、ケタミン(必要に応じて1~2mg/kg)またはテラゾール(1mg/kg)で動物に軽い鎮静をかけた。

50

## 【0337】

実験中、AVシャントに組み入れたシリコンゴム延長チューブ経由で被験物質を投与し、このチューブから血液試料を採取した。赤血球数およびヘマトクリットを含む全血球数を、各動物において毎日、実験前および後などに測定し、計算失血量は、いずれの実験日にも総血液体積の4%を超えなかった。複数の実験（動物1匹当たり4～5）を各動物において2週間の期間にわたって別々の日に行った。シャントが十分な非制限ベースライン流速（ $> 250 \text{ mL / 分}$ ）を有した動物のみを、反復実験に使用した。

## 【0338】

## 血液試料採取

各実験の開始（0分）および終了（60分）時に、膜型人工肺の近位側のAVシャントの中流から全身血液試料（1mL）を1/10体積の3.2%クエン酸塩抗凝固剤へと収集した。ヘパリンを投与する日においてヘパリン投与前（ヘパリン前）に追加の試料を採取した。ACTを測定するために、0.2mLの全血を採取し、直ちに分析した。CBCを測定するために、0.25mLの全血をK<sub>2</sub>-EDTA被覆管に採取し、Hemavet 950FSで分析した。

10

## 【0339】

## 止血評価

ヒヒの一次止血に対する被験物質の効果を、標準テンプレート皮膚出血時間試験（Surgicutt（登録商標）、International Technidyne Corp、Piscataway、NJ）を使用して評価した。全ての出血時間試験は、膜型人工肺実験の開始の15分後に同じ熟練技術者が行った。

20

## 【0340】

## 血小板およびフィブリノーゲンの放射標識

血小板沈着の定量のために、自家ヒヒ血小板を1mCiの<sup>111</sup>Inで標識し、その後、これらの血小板を動物に再注入し、実験を行う前に少なくとも1時間、最大4日間、循環させた。Xeleris 3.1ソフトウェアとインターフェイスで接続されたGE-Brio NM 615（GE Healthcare、Chicago、IL）を使用して、人工肺膜上の血小板関連放射活性の集積を5分間隔で決定した。

## 【0341】

相同な<sup>125</sup>I標識ヒヒフィブリノーゲン（5～25μg、4μCi、 $> 90\%$ 凝固性）を各研究の10分前にIV注射した。血小板に結合した<sup>111</sup>Inを自然崩壊させるため実験の少なくとも30日後、ガンマカウンター（Wizard-3、PerkinElmer、Shelton、CT）を使用して標識フィブリノーゲン/フィブリンの血栓への組込みを評価した。デバイス内に沈着した<sup>125</sup>I放射活性を測定し、実験中に採取した血漿試料中の凝固性フィブリン（フィブリノーゲン）の放射活性と比較した。

30

## 【0342】

## 膜型人工肺内への血小板沈着

人工肺内の血小板沈着を灌流実験中にリアルタイムで測定した。放射線データをガンマカメラにより5分間隔で収集し、測定したCPMの生データを分析して血小板沈着を計算した。

40

## 【0343】

## フィブリン（フィブリノーゲン）含量

実験終了時に血栓を有する人工肺デバイスを、<sup>111</sup>In放射活性が自然崩壊するまで（30日余り）保管した。この時点で、グラフト中に残存する唯一の放射活性は、標識フィブリノーゲンからの<sup>125</sup>Iである。

## 【0344】

## 結果

AB054の抗血栓有効性を評価するために、ヒヒの動静脈シャントに内挿した体外式膜型人工肺を使用して、表面で開始される血栓形成をモデル化した。

## 【0345】

50

実験中の3時点でaPTT、ACTおよびPTを使用して、実験中の抗凝固を測定した(図15A~15C)。血漿試料を実験の開始(0分)および終了(60分)時に採取した。ヘパリンを投与した場合、ヘパリン投与前にも血漿を採取した。

【0346】

各実験において、灌流開始の15分後に皮膚テンプレート出血時間を実行して、止血を評価した(図16A~16C)。出血時間、体積および速度は、処置によって変わらないようであった。

【0347】

膜型人工肺内への血小板集積を測定するために、シャントの大腿動脈からの血液を60分間デバイス内を流して、動物の大腿静脈に戻した。デバイス内に停滞している血小板の数、および血栓の成長速度を計算した(図17A~17B)。単独でのヘパリンまたはAB054のどちらかでの処置と比較して、AB054とヘパリンの組合せは、人工肺内の血小板沈着を低減させるようであった。

【0348】

最終血小板沈着およびフィブリンを全ての群において評価した(図18A~18B)。単独でのヘパリンまたはAB054のどちらかでの処置と比較して、AB054とヘパリンの組合せは、実験終了時に測定した血小板集積とフィブリン集積の両方を低減させた。

【0349】

結論

この研究の結果は、AB054が、プロトロンビン時間もテンプレート出血時間も認識できるほど変化させずに、体外式人工肺デバイスにおける血小板依存性血栓形成を低減させることを実証した。AB054とヘパリンの組合せは、単独でのヘパリンと比較して抗血栓有効性を向上させた。

【0350】

(実施例7)

ヒヒ血管グラフト血栓症モデルにおけるAB054の抗血栓有効性の評価

この実施例は、ヒヒ血栓症モデルにおけるAB054の抗血栓効果を評価するための研究を説明する。合成血管グラフトデバイスをコラーゲンまたは組織因子で被覆して、血栓形成性表面を生成した。本明細書で開示するデータは、AB054が、コラーゲンにより開始される血栓集積を対照と比較して制限するが、血栓が組織因子により開始された場合には抗血栓活性を有さないことを実証する。これらのデータは、接触経路阻害剤としてのAB054の作用機序と一致する。

【0351】

序論

カテーテル、ステントおよびグラフトを含む血液接触医療デバイスは、血栓集積に起因して故障することがあり、デバイス関連血栓塞栓症を誘発する可能性もある。開存性を維持するために、様々な時間長にわたって灌流されるデバイスは、出血の発生率および/または重症度を増加させる予防的抗凝固を必要とする。血液凝固接触活性化経路の阻害は、代替のより安全な抗凝固手法として提案されている。

【0352】

試薬および測定

aPTT、ACT、PTおよびCBCは、実施例6で説明したように測定した。実験グレードAB054は、実施例6で説明したように生成した。

【0353】

動物

合計72の血管グラフト血栓形成実験を単一のヒヒで行った。(図19)。実験を7週間の期間にわたって行った。

【0354】

処置群

合計72のグラフト血栓形成実験を行った。18の研究日に、拡張シャントループに挿

10

20

30

40

50

入した1つのコラーゲン被覆および1つの組織因子被覆グラフトを用いる2回の灌流実験を行い、この灌流実験は、各々の日に4つのグラフトの実験 - 2つのコラーゲン被覆グラフトおよび2つの組織因子被覆グラフト - を含んだ。2、3および4週目に毎週3回、9 mg / kg の A B 0 5 4 の注射を動物に施し、同日 ( 1 日目 ) ならびに翌日および翌々日 - 注射の 2 4 時間後 ( 2 日目 ) および注射の 4 8 時間後 ( 3 日目 ) - に実験を行った。最後の注射の後、実験を除去期間の 1 週目および 2 週目の両方で行った。各週は、3 日の実験からなった。食塩水対照は、抗体除去後の 1 週目および 7 週目に行った。全ての群について N = 6。

#### 【 0 3 5 5 】

##### 血管グラフト灌流

非終末期グラフト灌流実験を、体重 1 0 k g の若年のオスのヒビ ( p a p i o a n u b i s ) で行った。各ヒビは、外科的に留置して治癒した、大腿動脈と大腿静脈を接続する長期体外露出動静脈 ( A V ) シャントを有していた。

#### 【 0 3 5 6 】

灌流実験の期間 ( 6 0 分 ) の間に、長期 A V シャントを伸長して、ウマ I 型コラーゲン ( C h r o n o - L o g C o r p o r a t i o n , H a v e r t o n , P A ) または組織因子 ( D a d e ( 登録商標 ) I n n o v i n ( 登録商標 ) , S i e m e n s H e a l t h c a r e , M a r b u r g , G e r m a n y ) のどちらかで被覆した、内径 4 m m および長さ 2 0 m m の、食塩水でプライミングした e P T F E ( 伸長ポリテトラフルオロエチレン、G o r e - T e x ; W . L . G o r e a n d A s s o c i a t e s , F l a g s t a f f , A Z ) グラフトに組み入れた。

#### 【 0 3 5 7 】

抗凝固処置していないヒビにおけるシャントを通る血流は、コラーゲン被覆 e P T F E グラフトセグメントにおける急速な血栓形成を著実に誘発した。各実験中に、グラフトを通る最大血液流速 ( 典型的には約 2 5 0 m l / 分 ) を遠位クランプングにより 1 0 0 m l / 分に制限して、4 m m グラフト内に  $2 6 5 s^{-1}$  の平均初期壁せん断速度を生じさせた。超音波流量計 ( T r a n s o n i c s S y s t e m s , I t h a c a , N Y ) を使用して、流速を継続的にモニターした。4 m m グラフトは閉鎖せず、パルス流量は、血栓形成中に 1 0 0 m l / 分のままであった。グラフトセグメント ( および血栓 ) を、各実験後 6 0 分でシャントから除去し、永久シャントを回復させた。血栓形成は、典型的には、経時的にコラーゲン表面から下流に延びるので、血小板集積を A V シャントの長さ 1 0 c m 領域内のグラフトのすぐ遠位側でも測定した。このモデルでは、血栓の成長は、近位のコラーゲンまたは組織因子表面上に存在し ( 「グラフト」血栓 ) 、血栓は、コラーゲンセグメントの遠位側に成長した ( 血栓「テール」を形成した ) 。

#### 【 0 3 5 8 】

動物に軽度の鎮静をかけ、動物を座位で拘束しているときに、実験を行った。ケージから研究室に移す前に、急性ケタミン鎮静 ( 1 0 m g / k g ) またはテラゾール ( 5 m g / k g ) で動物に鎮静をかけた。ケージに戻すために、ケタミン ( 必要に応じて 1 ~ 2 m g / k g ) またはテラゾール ( 1 m g / k g ) で動物に軽い鎮静をかけた。

#### 【 0 3 5 9 】

実験中、A V シャントに組み入れたシリコンゴム延長チューブ経由で A B 0 5 4 ( 9 m g / k g ) を投与し、このチューブから血液試料を採取した。赤血球数およびヘマトクリットを含む全血球数を、各動物において毎日、実験前および後などに測定し、計算失血量は、いずれの実験日にも総血液体積の 4 % を超えなかった。

#### 【 0 3 6 0 】

##### 血液試料採取

各実験の開始 ( 0 分 ) および終了 ( 6 0 分 ) 時に、グラフトデバイスの近位側の A V シャントの中流から全身血液試料 ( 1 m L ) を 1 / 1 0 体積の 3 . 2 % クエン酸塩抗凝固剤へと収集した。3 および 4 週目の A B 0 5 4 の投与前に、追加の試料を採取した。A C T を測定するために、0 . 2 m L の全血を採取し、直ちに分析した。C B C を測定するため

10

20

30

40

50

に、0.25 mLの全血をK<sub>2</sub>-EDTA被覆管に採取し、Hemavet 950FSで分析した。

【0361】

止血評価

ヒヒの一次止血に対する被験物質の効果を、標準テンプレート皮膚出血時間試験 (Surgicutt (登録商標)、International Technidyne Corp、Piscataway、NJ) を使用して評価した。全ての出血時間試験は、灌流実験の開始の15分後に同じ熟練技術者が行った。

【0362】

グラフト被覆および組立て

内径4 mmのePTFE血管グラフト材料を、ウマI型コラーゲン (Chrono-Log Corporation、Haverton、PA) または組織因子 (Dade (登録商標) Innovin (登録商標)、Siemens Healthcare、Marburg、Germany) のどちらかで被覆した。

【0363】

血小板およびフィブリノーゲンの放射標識

血小板沈着の定量のために、自家ヒヒ血小板を1 mCiの<sup>111</sup>Inで標識し、その後、これらの血小板を動物に再注入し、実験を行う前に少なくとも1時間、最大4日間、循環させた。Xeleris 3.1ソフトウェアとインターフェイスで接続されたGE-Brivo NM 615 (GE Healthcare、Chicago、IL) を使用して、グラフト表面上および遠位シャントセグメント内の血小板関連放射活性の集積を1分間隔で決定した。このデータから、5分間隔に関しての血小板集積を計算した。

【0364】

相同な<sup>125</sup>I標識ヒヒフィブリノーゲン (5~25 μg、4 μCi、>90%凝固性) を各研究の10分前にIV注射した。血小板に結合した<sup>111</sup>Inを自然崩壊させるため実験の少なくとも30日後、ガンマカウンター (Wizard-3、PerkinElmer、Shelton、CT) を使用して標識フィブリノーゲン/フィブリンの血栓への組込みを評価した。デバイス内に沈着した<sup>125</sup>I放射活性を測定し、実験中に採取した血漿試料中の凝固性フィブリン (フィブリノーゲン) の放射活性と比較した。

【0365】

グラフト内の血小板沈着

グラフト内の血小板沈着を灌流実験中にリアルタイムで測定した。放射線データをガンマカメラにより1分間隔で収集し、測定したCPMの生データを分析して血小板沈着を計算した。5分間隔の累積血小板沈着を計算した。

【0366】

フィブリン (フィブリノーゲン) 含量

実験終了時に血栓を有するグラフトおよびテールセグメントをシャントループから切り取り、<sup>111</sup>In放射活性が自然崩壊するまで (30日余り) 保管した。この時点で、グラフト中に残存する唯一の放射活性は、標識フィブリノーゲンからの<sup>125</sup>Iであった。

【0367】

統計分析

コラーゲン被覆グラフトと組織因子被覆グラフトの両方についての完全血栓のリアルタイム血小板沈着を、二元配置ANOVAを使用して時間因子および処置因子について分析し、対照に対する比較のためにボンフェローニ事後分析を用いた。全ての他の測定値 (aPTT、ACT、最終血小板集積、最終フィブリン数、出血時間、PT) を、一元配置ANOVAを使用して分析し、対照に対する比較のためにダネット事後分析を用いた。全ての分析は、GraphPad Prism 5を使用して行った。

【0368】

結果

血栓形成性表面に反応してAB054が血栓形成防止する潜在性を評価するために、合

10

20

30

40

50

成血管グラフトデバイスをコラーゲン（接触経路のアクチベーター）または組織因子（外因性経路の開始剤）で被覆し、これらのデバイスをヒヒの動静脈シャント内に配置した。

【0369】

図19に概要を示すようにAB054（9mg/kg）の毎週3回の注射を受けた単一のヒヒにおいて反復実験を行った。実験中の抗凝固を、aPTTおよびACTを使用して測定した。血漿試料を灌流実験の開始（0分）および終了（60分）時に採取した。図1のタイムラインは、7週間の期間にわたって各実験の開始時に取った測定値からのaPTTデータを示す。図20A～20Dは、時点または処置群のいずれかにより分類した各実験の開始および終了時のaPTTおよびACT測定値を示す。

【0370】

各実験中に、PT測定値および皮膚テンプレート出血時間により止血を評価した。PTは、灌流実験の開始および終了時に採取した血漿試料を使用して測定した（図21A～21B）。テンプレート皮膚出血時間（Surgicutt）は、灌流実験開始の15分後に行った（図22）。

【0371】

血栓形成性表面への血栓集積を評価するために、シャントの大腿動脈からの血液を、60分間グラフト内を流れさせた。コラーゲン被覆グラフト（図23A～23D）および組織因子被覆グラフト（図24A～24D）により停滞した血小板の数を、リアルタイムで測定した。成長中の血栓に関する血小板集積の分析を、グラフトとテール部分の両方について行い、併せた合計の血栓についても行った。

【0372】

形成された血栓の最終血小板沈着およびフィブリン含量を、60分で、コラーゲン被覆グラフト（図25A～25F）と組織因子被覆グラフト（図26A～26F）の両方について評価した。上記のように、グラフトおよびテールを別々におよび一緒に評価した。全血球数を各実験の開始および終了時に測定した（図27A～27E）。

【0373】

結論

この研究の結果は、AB054が、ヒヒにおけるコラーゲン被覆血管グラフト表面への血液曝露により引き起こされる血栓発生を有意に低減させることを実証した。AB054の抗血栓活性は、最終用量の後、少なくとも2週間は持続した。AB054の作用機序と一致して、組織因子により開始される血栓発生を阻害しなかった。プロトロンビン時間の認識できる変化も、テンプレート出血時間の認識できる変化も、観察されなかった。

【0374】

本開示の原理を適用することができる多くの可能な実施形態に鑑みて、説明した実施形態が本開示の好ましい例に過ぎず、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきでないことは理解されるはずである。もっと正確に言えば、本発明の範囲は、後続の特許請求の範囲により定義される。したがって、本発明者らは、これらの特許請求の範囲に記載の範囲および趣旨に入る全てを本発明者らの発明であると主張する。

10

20

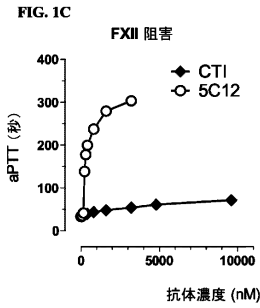
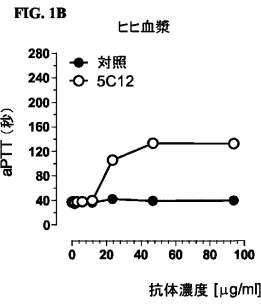
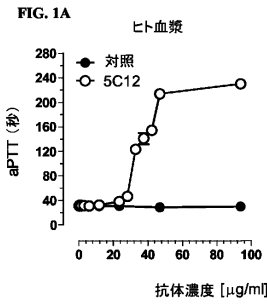
30

40

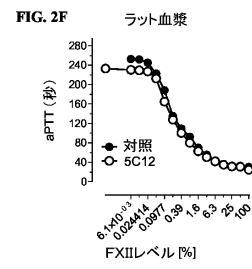
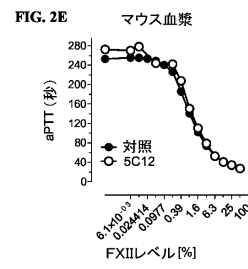
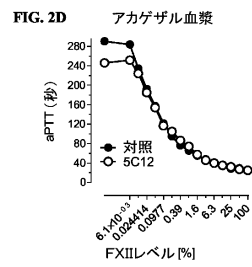
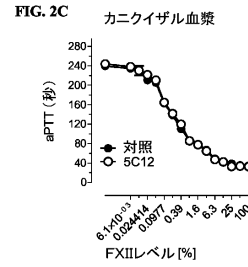
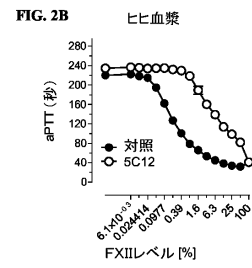
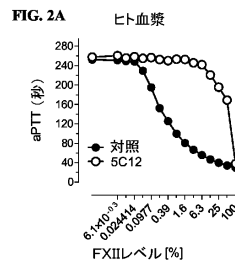
50

【図面】

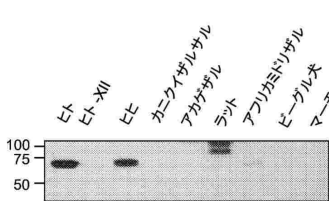
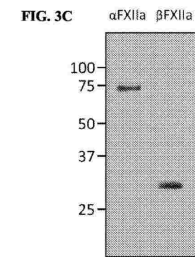
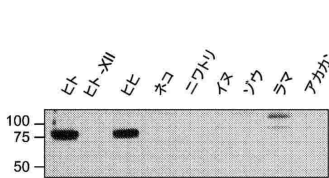
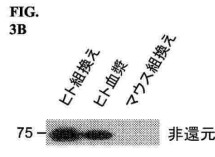
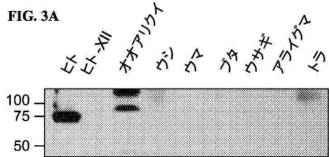
【図 1 A - 1 C】



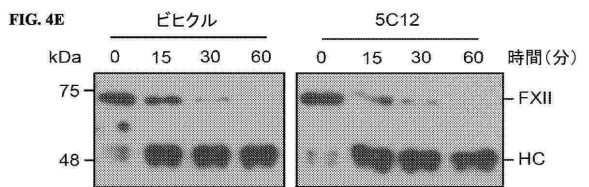
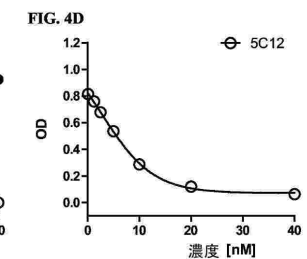
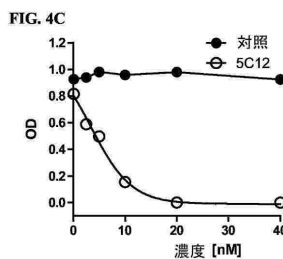
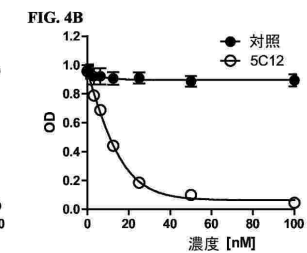
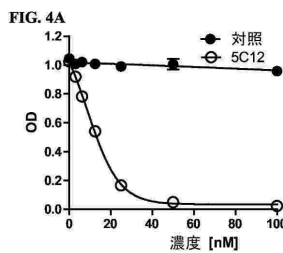
【図 2 A - 2 F】



【図 3 A - 3 C】



【図 4 A - 4 E】



10

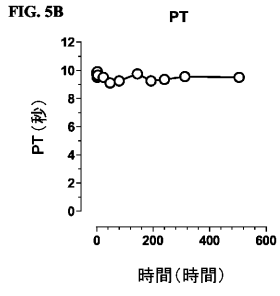
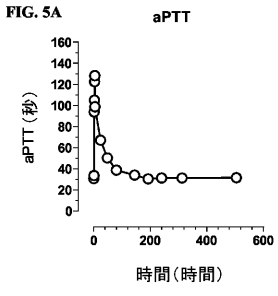
20

30

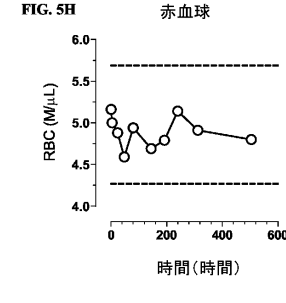
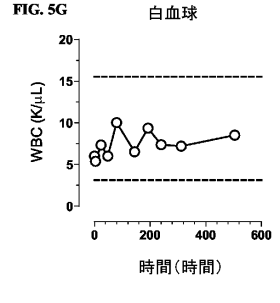
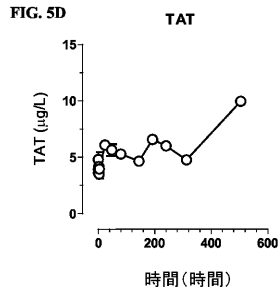
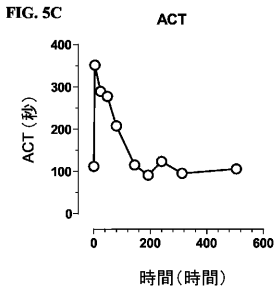
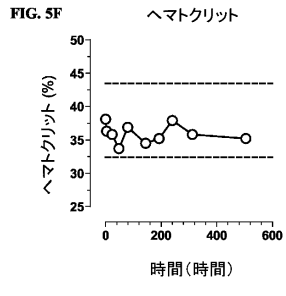
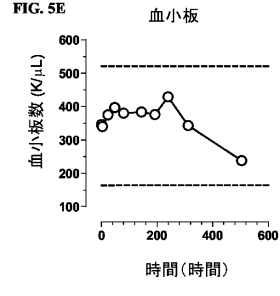
40

50

【 図 5 A - 5 D 】



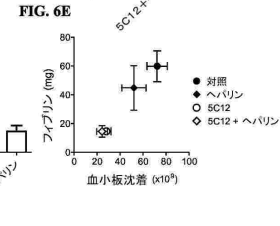
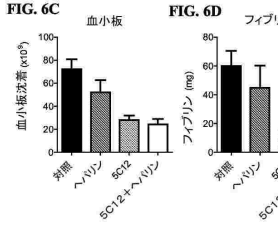
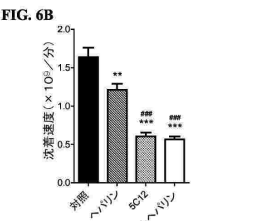
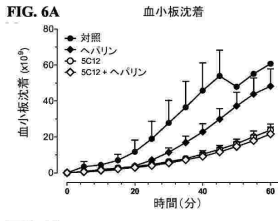
【 図 5 E - 5 H 】



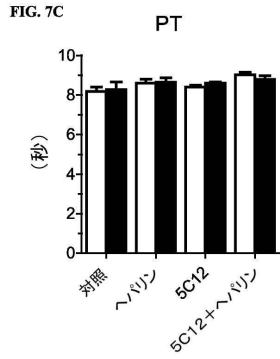
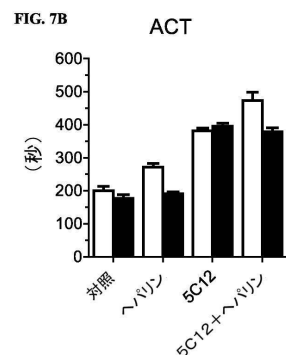
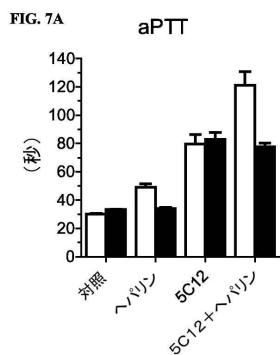
10

20

【 図 6 A - 6 E 】



【 図 7 A - 7 C 】

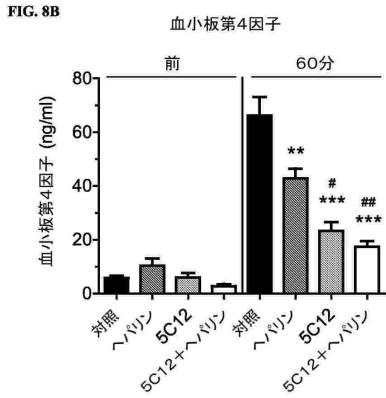
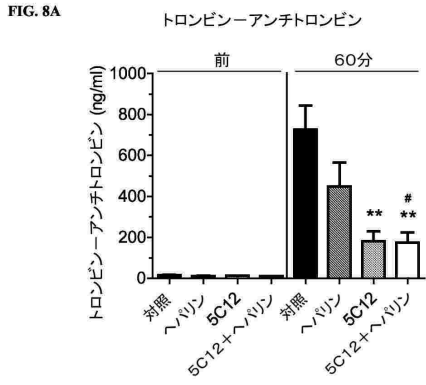


30

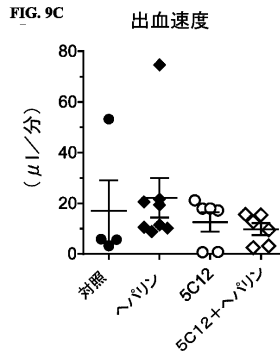
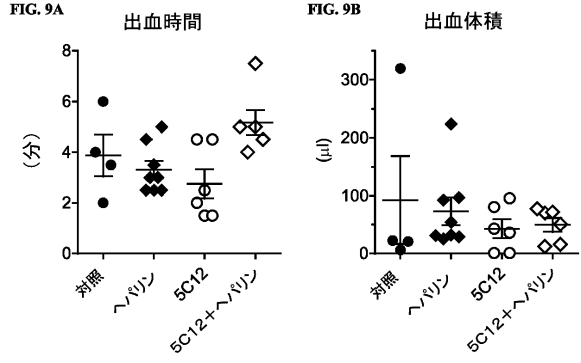
40

50

【 図 8 A - 8 B 】



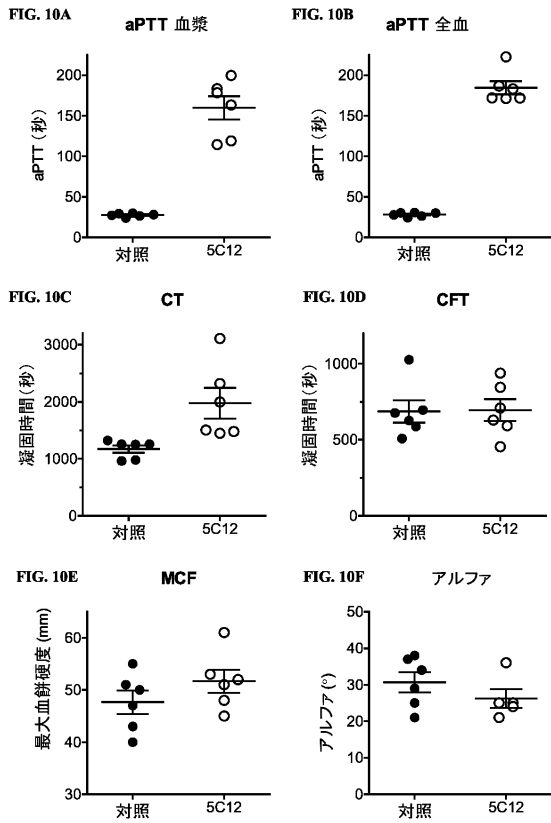
【 図 9 A - 9 C 】



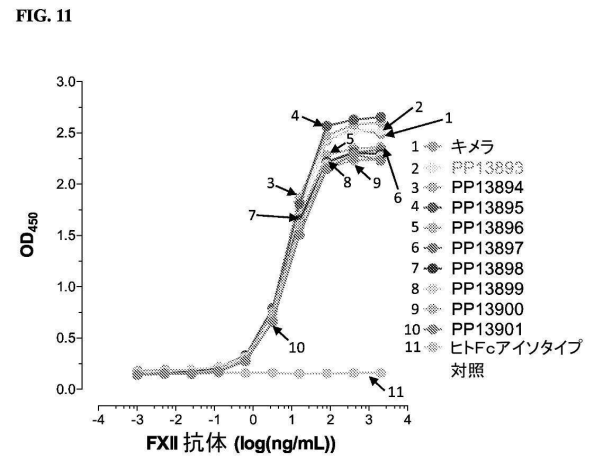
10

20

【 図 10 A - 10 F 】



【 図 11 】



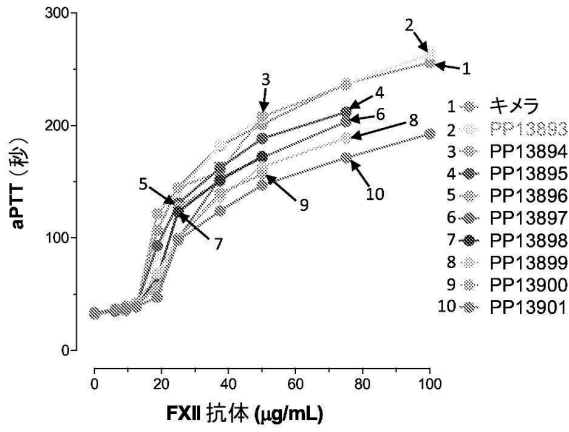
30

40

50

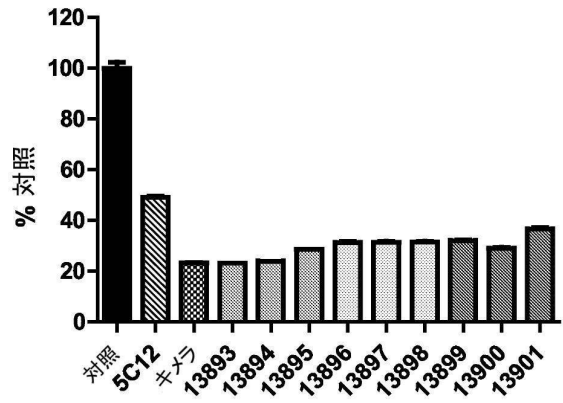
【 図 1 2 】

FIG. 12



【 図 1 3 】

FIG. 13



10

【 図 1 4 A - 1 4 B 】

FIG. 14A

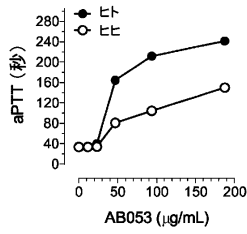
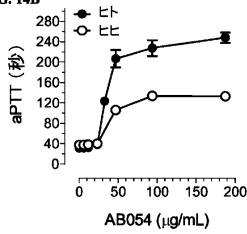


FIG. 14B



【 図 1 5 A - 1 5 C 】

FIG. 15A

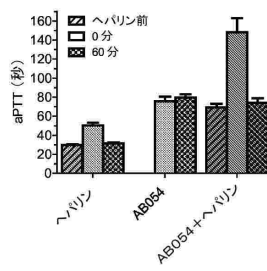
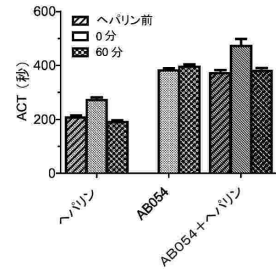
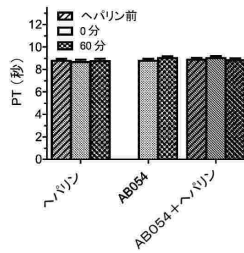


FIG. 15B



20

FIG. 15C



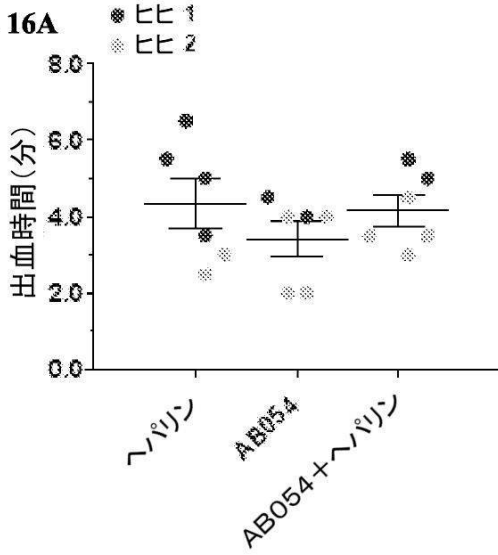
30

40

50

【図 16 A】

FIG. 16A



【図 16 B - 16 C】

FIG. 16B

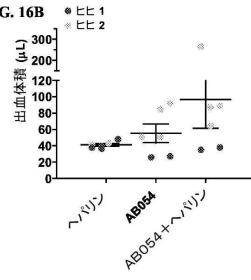
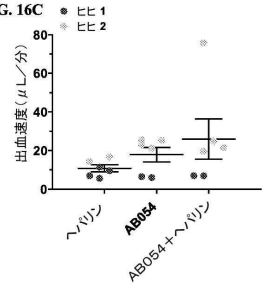


FIG. 16C



10

【図 17 A - 17 B】

FIG. 17A

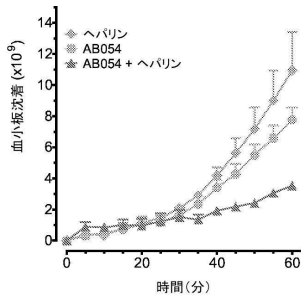
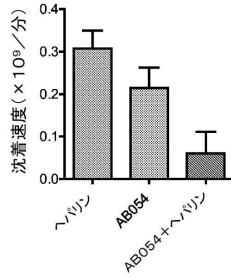


FIG. 17B



【図 18 A - 18 B】

FIG. 18A

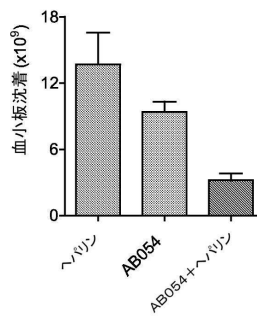
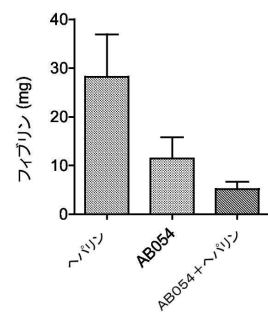


FIG. 18B



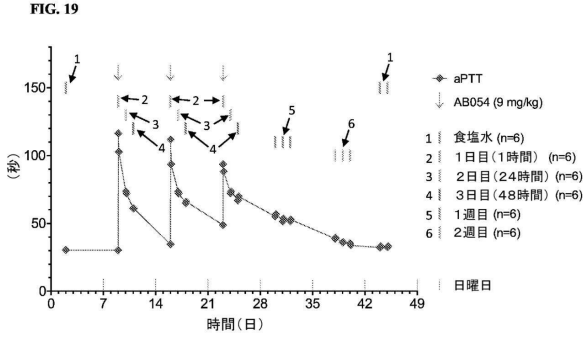
20

30

40

50

【 図 19 】



【 図 20 A - 20 D 】

FIG. 20A

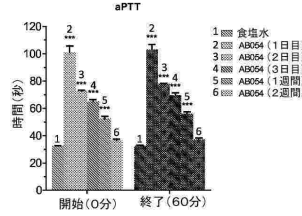


FIG. 20B

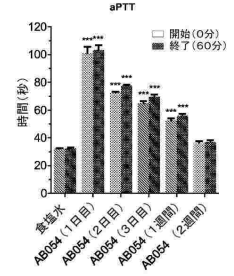


FIG. 20C

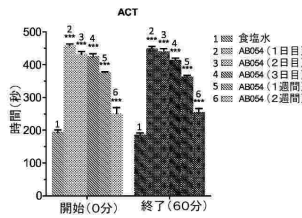
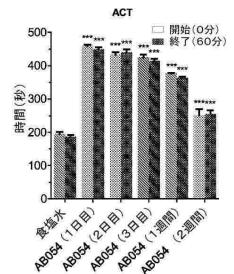


FIG. 20D



10

20

【 図 21 A - 21 B 】

FIG. 21A

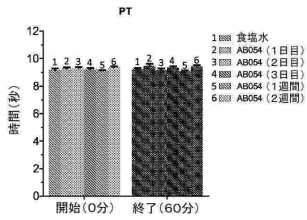
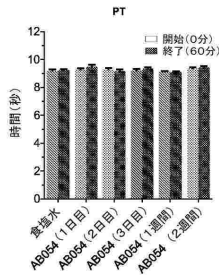
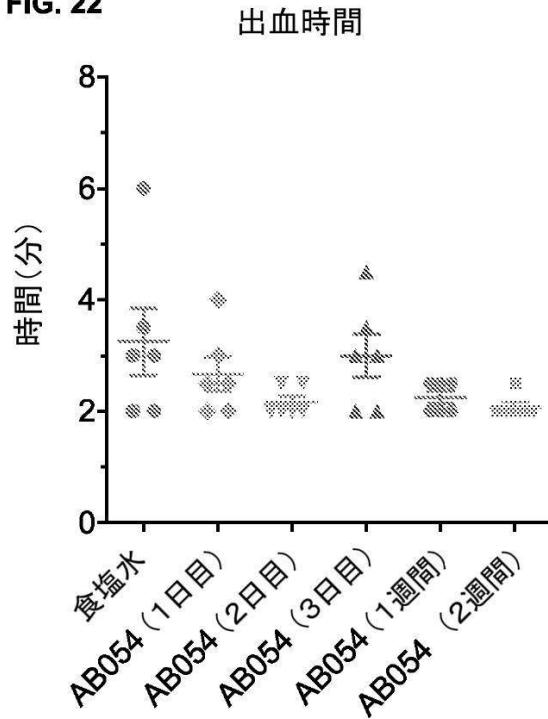


FIG. 21B



【 図 22 】

FIG. 22



30

40

50

【 2 3 A - 2 3 D 】

FIG. 23A コラーゲン グラフ

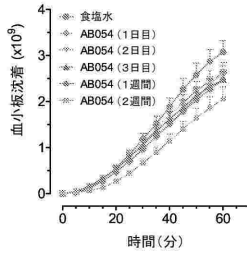
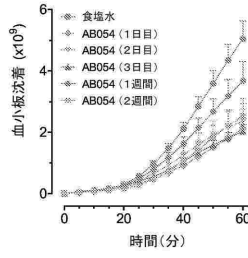


FIG. 23B コラーゲン テール



【 2 4 A - 2 4 D 】

FIG. 24A 組織因子 グラフ

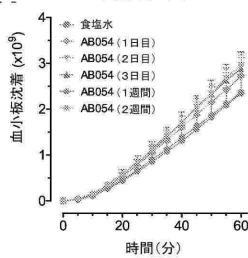


FIG. 24B 組織因子 テール

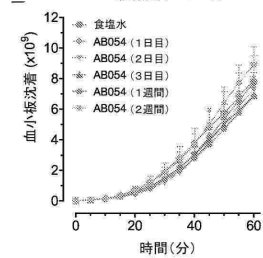


FIG. 23C コラーゲン 血栓

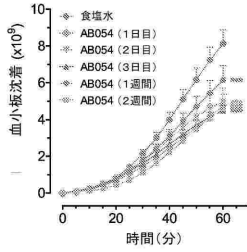


FIG. 23D コラーゲン 血栓

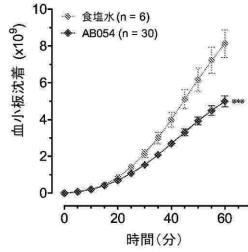


FIG. 24C 組織因子 血栓

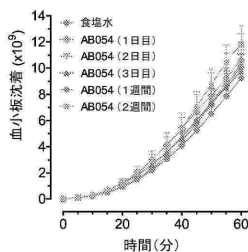
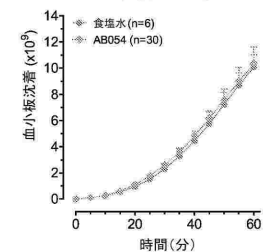
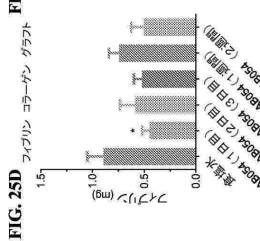
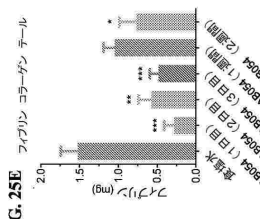
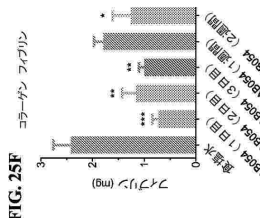
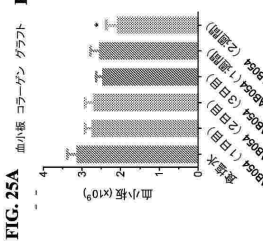
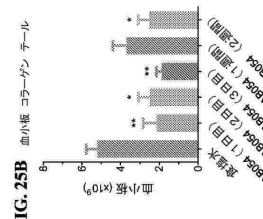
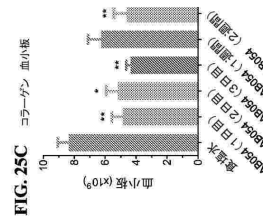


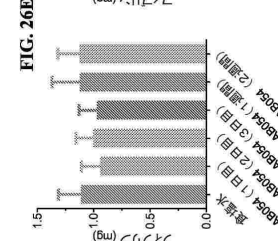
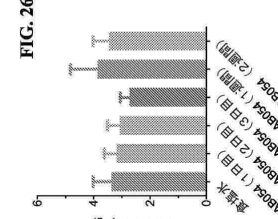
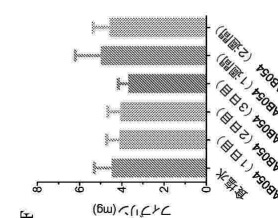
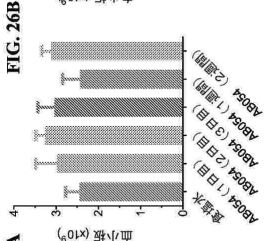
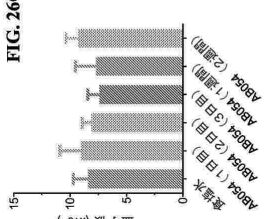
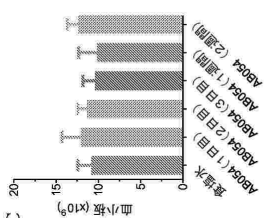
FIG. 24D 組織因子 血栓



【 2 5 A - 2 5 F 】



【 2 6 A - 2 6 F 】




10

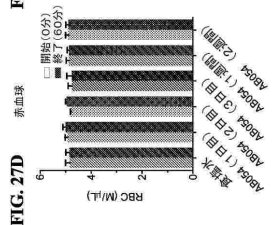
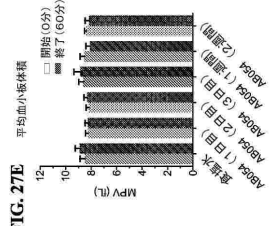
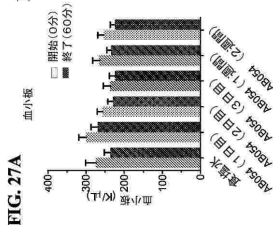
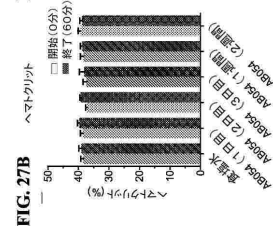
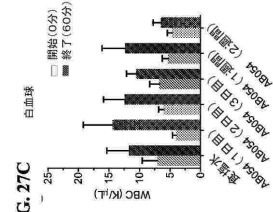
20

30

40

50

【 27A - 27E】



10

20

【配列表】

0007478149000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 1 2 N 1/21 (2006.01)  
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)  
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)  
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)  
 A 6 1 K 51/10 (2006.01)  
 A 6 1 P 7/02 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/536 (2006.01)  
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)  
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)

## F I

C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 N 1/19  
 C 1 2 N 5/10  
 A 6 1 K 39/395 N  
 A 6 1 K 51/10 2 0 0  
 A 6 1 P 7/02  
 G 0 1 N 33/53 D  
 G 0 1 N 33/536 C  
 G 0 1 N 33/536 B  
 G 0 1 N 33/536 D  
 C 1 2 P 21/08  
 A 6 1 K 47/68

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 グルーバー, アンドラス

アメリカ合衆国 オレゴン 9 7 2 2 1, ポートランド, エスダブリュー ブライドルマイル レ  
 ーン 3 5 0 0

(72)発明者 タッカー, エリック アイ.

アメリカ合衆国 オレゴン 9 7 2 0 1, ポートランド, エスダブリュー パーク アベニュー 1  
 5 1 1, アpartment 1 3 0 7

(72)発明者 ウオリッシュ, マイケル

アメリカ合衆国 オレゴン 9 7 2 3 9, ポートランド, エスダブリュー マカダム アベニュー  
 4 6 4 0, 스위트 2 0 0 エー 気付

(72)発明者 ローレンツ, クリスティーナ ユー.

アメリカ合衆国 オレゴン 9 7 2 3 9, ポートランド, エスダブリュー マカダム アベニュー  
 4 6 4 0, 스위트 2 0 0 エー 気付

審査官 大久保 元浩

(56)参考文献 特表 2 0 1 4 - 5 2 3 2 5 3 ( J P , A )

米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 3 1 5 2 9 2 ( U S , A 1 )

ARTERIOSCLER. THROMB. VASC. BIOL., 2018年08月, 38, 1748-1760

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N

C 0 7 K

A 6 1 K

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T  
 N )