

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6348900号
(P6348900)

(45) 発行日 平成30年6月27日(2018.6.27)

(24) 登録日 平成30年6月8日(2018.6.8)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 07 K 16/36	(2006.01)	C 07 K	16/36	
C 12 P 21/08	(2006.01)	C 12 P	21/08	

請求項の数 4 (全 84 頁)

(21) 出願番号	特願2015-510818 (P2015-510818)
(86) (22) 出願日	平成25年5月8日(2013.5.8)
(65) 公表番号	特表2015-517305 (P2015-517305A)
(43) 公表日	平成27年6月22日(2015.6.22)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2013/059618
(87) 國際公開番号	W02013/167669
(87) 國際公開日	平成25年11月14日(2013.11.14)
審査請求日	平成28年4月28日(2016.4.28)
(31) 優先権主張番号	12167438.6
(32) 優先日	平成24年5月10日(2012.5.10)
(33) 優先権主張国	欧州特許庁(EP)
(31) 優先権主張番号	12181697.9
(32) 優先日	平成24年8月24日(2012.8.24)
(33) 優先権主張国	欧州特許庁(EP)

(73) 特許権者	300049958 バイエル ファーマ アクチエングゼルシ ヤフト ドイツ連邦共和国 テーー 13353 ベ ルリン ミューラーシュトラーセ 178
(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明
(74) 代理人	100129713 弁理士 重森 一輝
(74) 代理人	100137213 弁理士 安藤 健司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】凝固因子X I および/またはその活性化形態である因子X I Aに結合しうる抗体ならびにその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

可変軽鎖ドメインのアミノ酸配列として配列番号19および可変重鎖ドメインのアミノ酸配列として配列番号20を含む、FX I aに結合しうるヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 2】

C D R H 1としての配列番号21、C D R H 2としての配列番号22、およびC D R H 3としての配列番号23、ならびにC D R L 1としての配列番号24、C D R L 2としての配列番号25、およびC D R L 3としての配列番号26を含む、FX I aに結合しうるヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメント。

10

【請求項 3】

可変軽鎖ドメインのアミノ酸配列として配列番号27および可変重鎖ドメインのアミノ酸配列として配列番号20を含む、FX I aに結合しうるヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 4】

C D R H 1として配列番号21を含み、C D R H 2として配列番号22を含み、C D R H 3として配列番号23を含み、C D R L 1として配列番号24を含み、C D R L 2として配列番号25を含み、C D R L 3として配列番号28を含む、FX I aに結合しうるヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、凝固因子XIおよび/またはその活性化形態因子であるXIaに結合しうる抗体、ならびにその使用方法、特に、血小板凝集を抑制し、これにより血栓形成を抑制する物質としての使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

1964年に、MacfarlaneおよびDavie & Ratnoff [Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964; 202: 498-9. ; Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964; 145: 1310-2.] は血液凝固の過程に関する彼らのカスケード仮説を紹介した。それ以来、インビボでの凝固の機能の我々の知見は増大した。過去数年において、最終的にトロンビン生成およびフィブリン沈着を引き起こす、共通の経路に収束していく2つの異なる凝固開始経路の学説、すなわち、いわゆる、外因性経路および内因性経路の学説が修正された。現在のモデルにおいては、凝固の開始は、血漿プロテアーゼ活性化因子VIIが組織因子(TF)と接触し、これにより組織因子との複合体を形成する際に生じる。この組織因子-FVIIa複合体はチモーゲンFXをその活性形態FXaへと活性化し、これは、その働きにより、プロトロンビン(凝固因子II)をトロンビン(IIa)に変換しうる。そして、凝固における中心的作用因子であるトロンビンはフィブリノーゲンからフィブリンへの変換を触媒しうる。また、トロンビンは、血小板により発現される特異的受容体を活性化し、これは血小板の活性化を引き起こす。活性化された血小板はフィブリンと共に血餅形成に不可欠であり、したがって、正常な止血の基本的作用因子である。第2の増幅経路は凝固因子XI(FXI)により生じる。FXIは、凝固カスケードのその他のメンバーと同様に、インビボの血液凝固の開始段階と増幅段階との橋渡しにおける中心的役割を有する血漿セリンプロテアーゼチモーゲンであることが、十分に確認されている [Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 1991; 30: 10363-70; Gailani D, Broze Jr GJ. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* 1991; 253: 909-12; Kravtsov DV, Matafonov A, Tucker EI, Sun MF, Walsh PN, Gruber Aら. Factor XI contributes to thrombin generation in the absence of factor XIII. *Blood* 2009; 114: 452-8. 3-5] 。 FXI欠損症は、通常、特発性出血を引き起こさないが、止血困難を伴う出血のリスクの増加に関連しており、一方、出血の重症度とFXIの血漿レベルの相関性は低い。ヒトにおける重篤なFXI欠損症は血栓性疾患からの一定の防御効果を有する [Salomon O, Steinberg DM, Zucker M, Varon D, Zivelin A, Seligshon U. Patients with severe factor XI deficiency have a reduced incidence of deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost* 2011; 105: 269-73; Salomon O, Steinberg DM, Koren-Morag N, Tanne D, Seligsohn U. Reduced incidence of ischemic stroke in patients with severe factor XI deficiency. *Blood* 2008; 111: 4113-7] 。さらに、高レベルのFXIは血栓事象に関連 10 20 30 40 50

づけられている [Meijers JC, Tekel enburg WL, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med* 2000; 342: 696-701]。したがって、FXIの抑制は、利益-リスク比の改善を達成するための新規抗血栓症物質の開発における新規アプローチとして提示されている。したがって、止血を妨げることなく血管内血栓症を有効に阻止する抗血栓症、抗血小板薬に対する高い医学的必要性が尚も存在する。

【発明の概要】

【0003】

発明の簡潔な概要

近年、新規抗血栓症物質の開発は大きな進歩を遂げている。それでも、これらの物質により引き起こされる望ましくない出血事象は尚も重大な問題である。したがって、血栓症を理想的に抑制するが止血を維持する最適な抗血栓化合物が見出される必要がある。凝固因子XI (FXI / FXIa) は血小板受容体apoE受容体2と相互作用する。本発明は、せん断流条件下でのFXI / FXIa活性阻害が病的血小板活性化および血小板凝集の過程を妨げることを初めて実証するものである。エクスピボ血栓症モデルにおいては、FXI / FXIaの抑制はCD62Pのような血小板活性化マーカーの有意な低減およびコラーゲン表面上の生理的流動条件下の全血中の下流微小凝集の減少を招く。したがって、FXIaの抑制は、血小板依存性動脈型血栓形成の靈長類モデルにおいて、血小板依存性一次止血を妨げることなく血小板沈着を減少させる。顕著な抗血小板作用にもかかわらず、組織因子依存性一次止血血栓形成に必要な血管外マトリックスタンパク質と血小板の初期相互作用は、驚くべきことに、影響を受けなかった。したがって、FXI / FXIa活性の抑制は、出血関連副作用を引き起こすことなく抗血栓活性を示す理想的な薬理学的原理を表現する。明瞭化のために、止血を妨げることなくとは、凝固因子XIおよび/またはXIaの抑制が、他の抗凝固化合物および/または抗血小板化合物の存在下であっても、望ましくない測定可能な出血事象を引き起こさないことを意味する。血友病C患者に関して示されているとおり、出血は集中的な手術および/または重度の外傷の場合のみに生じる。

【0004】

チモーゲン形態および/または活性化形態である凝固因子XIaの形態の凝固因子XIに対する、抗体または抗原結合性フラグメントまたはそれらの変異体が、血小板の凝集を抑制または低減することにより、およびこれにより微小凝集物および/または血栓凝塊の生成を抑制または低減することにより、抗血小板活性を示すことを明らかにするための組成物および方法を提供する。これらの抗凝固因子XI抗体および/または抗凝固因子XIa抗体、抗原結合性抗体フラグメント、ならびに本発明の抗体およびフラグメントの変異体の使用は血小板凝集を抑制し、これにより、止血を妨げることなく血栓を抑制する。また、本明細書には、該抗凝固因子XI抗体および/または抗凝固因子XIa抗体の投与は中和抗体であること、ならびにこれらの抗体、抗原結合性抗体フラグメント、および本発明の抗体およびフラグメントの変異体は、抗凝固抗血栓療法として、望ましくない出血事象のリスクの増加を引き起こさないことも記載されている。本発明は、血漿因子XIの活性化形態FXIaに選択的に結合し、それにより、止血を妨げることなく血小板凝集および関連血栓症を抑制しうるヒトモノクローナル抗体を提供する。組成物は、凝固因子XIの重鎖および/または凝固因子XIaの軽鎖の一定のエピトープに結合しうる抗凝固因子XI抗体および/または抗凝固因子XIa抗体を含む。これらの抗体は、凝固因子XIaのタンパク質分解活性を阻止することにより、および/または凝固因子FXIIfaおよび/またはトロンビンを介した凝固因子XIからその活性化形態凝固因子XIaへの変換の抑制により、中和活性を示す。好ましい実施形態においては、本発明は更に、ヒト以外の他の種、主にウサギからの凝固因子XIおよび/またはXIaに対する抗体の交差反応性を含み、広範な薬理学的および毒物学的分析を可能にする。もう1つの好ましい実施形態

10

20

30

40

50

においては、抗薬物抗体の発生のリスクを低減するために本発明の組成物の免疫原性を最適化し低減するための方法を用いる。本発明は更に、本明細書に記載されている抗体の1つと競合するヒト抗体を含む。また、組成物は、抗原結合性抗体フラグメント、ならびに本発明の抗体およびフラグメントの変異体、これらの抗体を産生する細胞系、ならびにこれらの抗体のアミノ酸をコードする単離された核酸を含む。本発明はまた、抗凝固因子X Iおよび/または抗凝固因子X I a抗体、あるいは抗原結合性抗体フラグメント、ならびに本発明の抗体およびフラグメントの変異体を、医薬上許容される担体および/または溶液中に含む医薬組成物を含む。本発明の方法は、血小板凝集を抑制し、これにより、血栓症を抑制し、血栓症の治療におけるいずれかの他の抗凝固物質または抗血栓症物質の必要用量を減少させ、急性炎症反応を治療し、または癌を治療し、または凝固カスケードの活性化に関連したいずれかの他の疾患を治療するために、前記組成物を、その投与を要する対象に投与することを含む。抗凝固因子X Iおよび/または抗F X I a抗体、または抗原結合性抗体フラグメント、ならびに本発明の抗体およびフラグメントの変異体の製造方法も提供する。

【0005】

発明の詳細な説明

定義

止血：止血なる語は、損傷部位における血液の流動を停止させるための、および創傷治療中に血管開通性を回復させるための主要メカニズムを表す。正常止血および病的血栓症中に、以下の3つのメカニズムが同時に活性化される：血管壁との活性化血小板の相互作用を意味する一次止血、フィブリンの形成、およびフィブリン溶解と称される過程 [Arthur A. Sasahara, Joseph Loscalzo (2002) *New Therapeutic Agents for Thrombosis and Thrombolysis* (2nd Edition) Marcel Dekker Inc. New York, NY, ISBN 0-8247-0795-8]。

【0006】

凝固および凝固カスケード：凝固カスケードと称される、タンパク質に基づく系は、形成した血餅を安定化し、更に創傷を閉じるように働く。凝固経路はタンパク質分解カスケードである。該経路の各酵素はチモーゲン（不活性化形態）として血漿中に存在し、これは、活性化されると、タンパク質分解切断を受けて、該前駆体分子から活性因子を放出する。該凝固カスケードは、活性化過程を制御する一連の正および負のフィードバックループとして機能する。該経路の最終的な目的は、トロンビンを産生させることであり、ついでトロンビンは可溶性フィブリノーゲンを、血餅を形成するフィブリンに変換しうる。トロンビンの生成の過程は以下の3つの段階に分けられる：活性凝固因子F X a（活性化因子X）の生成のための代替経路を与える内因性および外因性経路、ならびにトロンビン形成をもたらす最終共通経路 [Hoffman M. M. および Monroe D. M. (2005) *Rethinking the coagulation cascade* . Curr Hematol Rep. 4: 391-396; John J, Blume C, Benz PM, Pozgajova M, Ullrich M, Schuh K, Nieswandt B, Walter U, Renne T. (2006) *Platelets promote coagulation factor XII-mediated proteolytic cascade systems in plasma* . Biol Chem. 387: 173-178]。

【0007】

血小板凝集：血管の破壊が生じたら、通常は血流に直接接觸していない物質が露出される。これらの物質（主にコラーゲンおよびフォンビルプラント因子）は、血小板が破壊表面に付着することを可能にする。血小板が該表面に付着したら、それは、追加的血小板を損傷領域に誘引する化学物質を放出する（これは血小板凝集と称される）。これらの2つの過程は、出血を停止させるための最初の応答である。

【0008】

10

20

30

40

50

凝固因子XIおよび凝固因子XIa

凝固因子XI(FXI)は肝臓内で合成され、高分子量キニノーゲンと複合体形成したジスルフィド結合二量体として血漿中に循環する。この二量体の各ペプチド鎖は約80kDである。チモーゲン因子XIは、血液凝固の接触段階により、または血小板表面上のトロンビン媒介性活性化により、その活性形態である凝固因子XIa(FXIa)に変換される。因子XIのこの活性化中に、それらの2つの鎖のそれぞれにおいて内部ペプチド結合が切断されて活性化因子XIaを与え、これは、ジスルフィド結合により結合した2本の重鎖および2本の軽鎖から構成されるセリンプロテアーゼである。このセリンプロテアーゼFXIaは凝固因子IXをIXaに変換し、ついでこれは凝固因子X(Xa)を活性化する。ついでXaは凝固因子II/トロンビンの活性化を引き起こしうる。この因子の欠損はローゼンタール症候群(血友病Cとしても公知である)を招き、これは、損傷からの長時間の出血、頻繁な又は重度の鼻血、尿中の微量の血液、および女性における重度の月経出血により特徴づけられる血液凝固異常である。本明細書中で用いる「凝固因子XI」、「因子XI」または「FXI」は、該タンパク質を発現するいずれかの哺乳類種からのいずれかのFXIを意味する。例えば、FXIは、ヒト、非ヒト靈長類(例えば、ヒヒ)、マウス、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ウサギ、ならびに血流の調節、凝固および/または血栓症に関する凝固因子XIを示すいずれかの他の種のものでありうる。凝固因子XIaによる凝固因子XIの活性化のための切断部位は各ペプチド鎖内のArg-369とIle-370との間の内部ペプチド結合である[Fujikawa K, Chung DW, Hendrickson LE, Davie EW. (1986) Amino acid sequence of human factor XI, a blood coagulation factor with four tandem repeats that are highly homologous with plasma prekallikrein. Biochemistry 25:2417-2424]。凝固因子XIaの各重鎖(369アミノ酸)は、Appleドメイン(A1~A4と称される)と呼ばれる、90~91アミノ酸の、4つの縦列反復配列と、短い接続ペプチドとを含有する[Fujikawa K, Chung DW, Hendrickson LE, Davie EW. (1986) Amino acid sequence of human factor XI, a blood coagulation factor with four tandem repeats that are highly homologous with plasma prekallikrein. Biochemistry 25:2417-2424; Sun MF, Zhao M, Gailani D. (1999) Identification of amino acids in the factor XI apple domain required for activation of factor IX. J Biol Chem. 274:36373-36378]。凝固因子XIaの軽鎖(それぞれ238アミノ酸)は、セリンプロテアーゼのトリプシンファミリーに典型的な配列を有する、該酵素の触媒部分を含有する[Fujikawa K, Chung DW, Hendrickson LE, Davie EW. (1986) Amino acid sequence of human factor XI, a blood coagulation factor with four tandem repeats that are highly homologous with plasma prekallikrein. Biochemistry 25:2417-2424]。活性化因子XIaは、因子IXを活性化することにより、血液凝固の内因的経路の中間段階を誘発する。

【0009】

保存的アミノ酸変異体

本明細書に記載されている抗体ペプチド配列の全体的分子構造を保存しているポリペプチド変異体が製造されうる。個々のアミノ酸の特性を考慮すると、幾つかの合理的置換が当業者により認識されるであろう。アミノ酸置換、すなわち、「保存的置換」は、例えば

10

20

30

40

50

、関与する残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性および／または両親媒性における類似性に基づいて行われうる。例えば、(a)無極性(疎水性)アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが含まれ、(b)極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンが含まれ、(c)正荷電(塩基性)アミノ酸には、アルギニン、リシンおよびヒスチジンが含まれ、(d)負荷電(酸性)アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。置換は、典型的には、グループ(a)～(d)内で行われうる。また、グリシンおよびプロリンは、それらがヘリックスを破壊しうることに基づいて、別のアミノ酸の代わりに用いられうる。同様に、あるアミノ酸、例えばアラニン、システイン、ロイシン、メチオニン、グルタミン酸、グルタミン、ヒスチジンおよびリシンは、ヘリックスにおいて、より一般的に見出され、一方、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびトレオニンは、プリーツシートにおいて、より一般的に見出される。グリシン、セリン、アスパラギン酸、アスパラギンおよびプロリンはこの順でよく見出される。幾つかの好ましい置換は以下のグループ内で行われうる：(i) SおよびT、(ii) PおよびS、ならびに(iii) A、V、LおよびI。既知遺伝暗号ならびに組換えおよび合成DNA技術を用いて、当業者は、保存的アミノ酸変異体をコードするDNAを容易に構築することが可能である。本明細書中で用いる、2つのポリペプチド配列間の「配列同一性」は、それらの配列間で同一であるアミノ酸の百分率を示す。「配列相同性」は、同一であるか又は保存的アミノ酸置換を表すアミノ酸の百分率を示す。本発明の好ましいポリペプチド配列は、少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%または80%、より一層好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の、CDR領域内の配列同一性を有する。好ましい抗体はまた、少なくとも80%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%の、CDR領域内の配列相同性を有する。

【0010】

本発明のDNA分子

本発明はまた、本発明の抗体をコードするDNA分子に関する。これらの配列は、配列番号1～18に記載されているDNA分子を含むが、これらに限定されるものではない。本発明のDNA分子は、本明細書に開示されている配列に限定されず、それらの変異体をも含む。本発明におけるDNA変異体は、ハイブリダイゼーションにおけるそれらの物理的特性を示すことにより記載されうる。DNAは、その相補体を特定するために、そしてDNAは二本鎖であるため、その等価体またはホモログを特定するために、核酸ハイブリダイゼーション技術を用いて使用されうる、と当業者は認識するであろう。ハイブリダイゼーションは100%未満の相補性でも生じうると認識されるであろう。しかし、条件を適当に選択すれば、ハイブリダイゼーション技術は、DNA配列を特定のプローブに対するその構造的関連性に基づいて区別するために用いられうる。そのような条件についての指針については、Sambrookら, 1989 [Sambrook, J., Fritsch, E. F. および Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA] および Ausubelら, 1995 [Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhel, K. 編 (1995). Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley and Sons] を参照されたい。2つのポリヌクレオチド配列間の構造的類似性は、それらの2つの配列が互いにハイブリダイズする条件の「ストリングジェンシー」の関数として表されうる。本明細書中で用いる「ストリングジェンシー」なる語は、その条件がハイブリダイゼーションを妨げる度合を意味する。ストリングジェント条件はハイブリダイゼーションを強く妨げ、そのような条件下では、最も構造的に関連した分子だけが互いにハイブリダイズするであろう。逆に、非ストリングジェント条件は、構

10

20

30

40

50

造的関連性がより低い分子のハイブリダイゼーションを促進する。したがって、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーは2つの核酸配列の構造的関連性に直接的に相關する。ハイブリダイゼーションおよび関連性を相關させる際には以下の関係が有用である(ここで、 T_m は核酸二本鎖の融解温度である)。

【0011】

a. $T_m = 69.3 + 0.41(G + C)\%$

b. 二本鎖DNAの T_m はミスマッチ塩基対の数における1%の増加ごとに1低下する。

【0012】

c. $(T_m)_{\mu_2} - (T_m)_{\mu_1} = 18.5 \log_{10} \mu_2 / \mu_1$

(ここで、 μ_1 および μ_2 は2つの溶液のイオン強度である)。

10

【0013】

ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーは、全DNA濃度、イオン強度、温度、プローブサイズおよび水素結合を破壊する物質の存在を含む多数の因子の関数である。ハイブリダイゼーションを促進する因子には、高いDNA濃度、高いイオン強度、低い温度、より長いプローブサイズおよび水素結合を破壊する物質の非存在が含まれる。ハイブリダイゼーションは、典型的には、2つの段階、すなわち、「結合」段階および「洗浄」段階で行われる。第1に、結合段階においては、ハイブリダイゼーションを促進する条件下、プローブが標的に結合する。ストリンジエンシーは、通常、温度を変化させることにより、この段階で制御される。高いストリンジエンシーの場合、温度は、短い($< 20\text{ nt}$)オリゴヌクレオチドプローブが使用されない限り、通常、65 ~ 70である。代表的なハイブリダイゼーション溶液は $6 \times \text{SSC}$ 、0.5% SDS、5×デンハルト液および $100\mu\text{g}$ の非特異的担体DNAを含む[15を参照されたい]。勿論、多数の異なるが機能的には等価なバッファー条件が公知である。関連性の度合がより低い場合、より低い温度が選択されうる。低いストリンジエンシーの結合温度は約25 ~ 40である。中等度のストリンジエンシーは少なくとも約40 ~ 約65未満である。高いストリンジエンシーは少なくとも約65である。第2に、過剰なプローブを洗浄により除去する。通常、よりストリンジエントな条件が適用されるのは、この段階である。したがって、ハイブリダイゼーションによる関連性の決定において最も重要なのは、この「洗浄」段階である。洗浄溶液は、典型的には、より低い塩濃度を含有する。1つの典型的な中等度ストリンジエンシー溶液は $2 \times \text{SSC}$ および0.1% SDSを含有する。高いストリンジエンシーの洗浄溶液は約0.2×SSC未満の(イオン強度における)等価体を含有し、好ましいストリンジエント溶液は約0.1×SSCを含有する。種々のストリンジエンシーに関連した温度は、「結合」に関する前記で説明したものと同じである。また、該洗浄溶液は、典型的には、洗浄中に数回交換される。例えば、典型的な高いストリンジエンシーの洗浄条件は55で30分間の2回の洗浄および60で15分間の3回の洗浄を含む。したがって、本発明の対象は、本発明の抗体および/または抗原結合性フラグメントをコードする単離された核酸配列である。本発明のもう1つの実施形態は、本発明の抗体をコードする前記の単離された核酸配列である。したがって、本発明は、高いストリンジエンシーの結合および洗浄条件において、記載されている分子にハイブリダイズする核酸分子を含み、ここで、そのような核酸分子は、本明細書に記載されている特性を有する抗体またはその機能的フラグメントをコードする。(mRNAの観点から)好ましい分子としては、本明細書に記載されているDNA分子の1つに対して少なくとも75%または80%(好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%)の配列同一性を有するものが挙げられる。該DNAは、凝固因子XIからその活性形態因子XIaへの変換を低減および/もしくは抑制する、ならびに/または凝固因子XIaの触媒活性を直接的に阻止する分子をコードする。

20

【0014】

組換えDNA構築物および発現

本発明は更に、本発明のヌクレオチド配列の1以上を含む組換えDNA構築物を提供す

30

40

50

る。本発明の組換え構築物は、本発明の抗体をコードするDNA分子が挿入されるベクター、例えばプラスミド、ファジミド、ファージまたはウイルスベクターと共に使用される。コードされる遺伝子は、Sambrookら, 1989およびAusubelら, 1989 [Sambrook, J., Fritsch, E. F. およびManiatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA; Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. 編(1995). Current Protocols in Molecular Biology. New York 10: John Wiley and Sons]に記載されている技術により製造されうる。あるいは、該DNA配列は、例えば合成装置を使用して化学合成されうる。例えば、OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS [Gait, M. J. (1984) "An introduction to modern methods of DNA Synthesis" In Oligonucleotide Synthesis a Practical Approach. M. J. Gait 編, IRL Press Oxford UK] (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に記載されている技術を参照されたい。当業者は、可変ドメインをコードするDNAを、種々のヒトIgG1ソタイプまたはそれらの誘導体(突然変異体または非突然変異体)の定常領域をコードする遺伝子フラグメントと融合させることが可能である。当業者は、グリシン-グリシン-グリシン-セリンを3回含有する15アミノ酸伸長のようなリンカーを使用して可変ドメインの両方を一本鎖形態に融合させるために、組換えDNA技術を適用することが可能である。本発明の組換え構築物は、コード化DNAのRNAおよび/またはタンパク質産物を発現しうる発現ベクターに組込まれる。該ベクターは更に、オープンリーディングフレーム(ORF)に機能的に連結されたプロモーターを含む調節配列を含みうる。該ベクターは更に、選択マーカー配列を含みうる。挿入標的遺伝子コード配列の効率的な翻訳には、特異的な開始および細菌分泌シグナルも要求されうる。本発明は更に、本発明のDNAの少なくとも1つを含有する宿主細胞を提供する。該宿主細胞は、対応発現ベクターが利用可能な実質的にあらゆる細胞でありうる。それは、例えば、高等真核宿主細胞、例えば哺乳類細胞、下等真核宿主細胞、例えば酵母細胞であることが可能であり、原核細胞、例えば細菌細胞であることが可能である。宿主細胞内への組換え構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE、デキストラン媒介トランスフェクション、エレクトロポレーションまたはファージ感染により行われうる。

【0015】

細菌発現

細菌での使用のための有用な発現ベクターは、所望のタンパク質をコードする構造DNA配列を、適当な翻訳開始および終結シグナルと共に、機能的プロモーターに対する機能的な読取相で挿入することにより構築される。該ベクターは1以上の表現型選択マーカー、ならびに該ベクターの維持を確保するための及び所望により宿主内の増幅をもたらすための複製起点を含むであろう。形質転換のための適当な原核宿主には、大腸菌(E. coli)、バシラス・サチリス(Bacillus subtilis)、サルモネラ・ティフィムリウム(Salmonella typhimurium)ならびにシュードモナス(Pseudomonas)、ストレプトマイセス(Streptomyces)およびスタヒロコッカス(Staphylococcus)属内の種々の種が含まれる。細菌ベクターは、例えば、バクテリオファージ、プラスミドまたはファジミドに基づくものでありうる。これらのベクターは、よく知られたクローニングベクターpBR322(ATCC 37017)の要素を典型的に含有する商業的に入手可能なプラスミドからの細菌複製起点および選択マーカーを含有しうる。適当な宿主株の形質転換および適当な細胞密度までの該宿主株の増殖の後、選択されたプロモーターを適当な手段(たとえば、温度

30

10

20

40

50

変化または化学的誘導)により脱抑制/誘導し、更なる期間にわたって細胞を培養する。細胞を典型的には遠心分離により集め、物理的または化学的手段により破壊し、得られた粗抽出物を更なる精製のために取っておく。細菌系においては、発現されるタンパク質に意図される用途に応じて、幾つかの発現ベクターが有利に選択されうる。例えば、抗体の製造のために又はペプチドライブライアリーナーをスクリーニングするために、大量のそのようなタンパク質を産生させたい場合には、例えば、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を導くベクターが望ましいかもしれない。したがって、本発明の目的は、本発明の新規抗体をコードする核酸配列を含む発現ベクターである。

【0016】

哺乳類発現およびタンパク質精製

10

哺乳類宿主細胞発現のための好ましい調節配列には、哺乳類細胞における高レベルのタンパク質発現を導くウイルス要素、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)に由来するプロモーターおよび/またはエンハンサー(例えば、CMVプロモーター/エンハンサー)、シミアンウイルス40(SV40)に由来するプロモーターおよび/またはエンハンサー(例えば、SV40プロモーター/エンハンサー)、アデノウイルスに由来するプロモーターおよび/またはエンハンサー(例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP))ならびにポリオーマに由来するプロモーターおよび/またはエンハンサーが含まれる。ウイルス調節要素およびその配列の更なる説明に関しては、Stinski, U.S.5,168,062; Bellら, U.S.4,510,245; Schaffnerら, U.S.4,968,615を参照されたい。組換え発現ベクターは複製起点および選択マーカーをも含みうる[Bellら, U.S.4,510,245; Schaffnerら, U.S.4,968,615; Axelら, U.S.4,399,216]。適当な選択マーカーは、G418、ヒグロマイシンまたはメトトレキセートのような薬物に対する耐性を、該ベクターが導入された宿主細胞に付与する遺伝子を含む。例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子はメトトレキセートに対する耐性を付与し、neo遺伝子はG418に対する耐性を付与する。

20

【0017】

宿主細胞内への該発現ベクターのトランスフェクションは、標準的な技術、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿およびDEAE-デキストラントransフェクションを用いて行われうる。

30

【0018】

本発明において提供される抗体、抗原結合性部分またはそれらの誘導体を発現させるための適当な哺乳類宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO細胞)[例えば、Axelら, U.S.5,179,017に記載されているDHFR選択マーカーと共に使用される、Axel, U.S.4,634,665に記載されているdhfr-CHO細胞、NSO骨髄腫細胞、COS細胞およびSP2細胞を含む]が含まれる。幾つかの実施形態においては、該発現ベクターは、宿主細胞を増殖させる培地内に発現タンパク質が分泌されるように設計される。該抗体、その抗原結合性部分または誘導体は、標準的なタンパク質精製法を用いて、培地から回収されうる。

40

【0019】

本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、プロテインAクロマトグラフィー、プロテインGクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホ-セルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ヒドロキシアバタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィー(これらに限定されるものではない)を含むよく知られた方法により、組換え細胞培養から回収され精製されうる。高速液体クロマトグラフィー(「HPLC」)も精製に用いられうる[Urbaub G, Chasin LA. (1980) Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. Proc Natl Acad

50

d Sci USA. 77: 4216 - 4220; 例えば第1, 4, 6, 8, 9, 10章(それぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい]。本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントには、天然精製産物、化学合成法の産物、ならびに例えば酵母、高等植物、昆虫および哺乳類細胞を含む真核宿主から組換え技術により製造された産物が含まれる。組換え製造法において使用される宿主に応じて、本発明の抗体はグリコシル化されることが可能であり、あるいはグリコシル化されないことが可能である。そのような方法は多数の標準的な実験マニュアルに記載されている [Sambrook, J., Fritsch, E. F. および Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA); Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. 編(1995). Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley and Sons, 第10, 12, 13, 16, 18および20章を参照されたい]。したがって、本発明の目的は該ベクターまたは核酸分子を含む宿主細胞でもあり、ここで、該宿主細胞は、高等真核宿主細胞、例えば哺乳類細胞、下等真核宿主細胞、例えば酵母細胞であることが可能であり、また、原核細胞、例えば細菌細胞でありうる。本発明のもう1つの目的は、該宿主細胞を適当な条件下で培養し、該抗体を回収することを含む、抗体および抗原結合性フラグメントを製造するための、該宿主細胞の使用方法である。したがって、本発明のもう1つの目的は、本発明の宿主細胞で製造され、少なくとも95重量%の均一性まで精製された抗体005-C04である。

【0020】

アフィニティ

「アフィニティ」または「結合アフィニティ」 K_D は、しばしば、平衡会合定数(K_a)および平衡解離定数(k_d)を測定し、 k_d 対 k_a の商($K_D = k_d / k_a$)を計算することにより決定される。「免疫特異的」または「特異的に結合する」なる語は、該抗体が、 10^{-6} M(一価アフィニティ)以下のアフィニティ K_D で、凝固因子XIおよび/またはその活性化形態である凝固因子XIaに結合することを意味する。「高いアフィニティ」なる語は、該抗体が、 10^{-7} M(一価アフィニティ)以下のアフィニティ K_D で、凝固因子XIおよび/またはその活性化形態である凝固因子XIaに結合することを意味する。該抗体は、他の無関係な分子と比較して標的抗原に対して実質的により大きなアフィニティを有しうる。該抗体は、ホモログと比較して標的抗原に対して実質的により大きなアフィニティ、例えば、標的抗原に対して少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、100倍、 10^{-3} 倍、 10^{-4} 倍、 10^{-5} 倍、 10^{-6} 倍以上の相対アフィニティを有しうる。そのようなアフィニティは、通常の技術を用いて、例えば、平衡透析により、BIAcore 2000装置を使用して、製造業者により概説されている一般的手法を用いて、放射能標識標的抗原を使用するラジオイムノアッセイにより、または当業者に公知の別の方により、容易に決定されうる。該アフィニティデータは、例えば、Kaufman RJ, Sharp PA. (1982) Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary dna gene. J Mol Biol. 159: 601-621に記載されている方法により分析されうる。

【0021】

抗体

本明細書中で用いる「凝固因子FXIおよび/またはその活性化形態である凝固因子XIaを遮断する抗体」なる表現は、凝固因子FXIおよび/またはFXIa活性の完全または部分的な抑制を招く、本発明の抗体によるFXIおよび/またはFXIaの遮断を示す意である。そのアミノ酸配列には、配列番号19~36に記載されているアミノ酸配列

10

20

30

40

50

が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0022】

「抗体」なる語は最も広い意味で用いられ、完全に構築された抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異的抗体（例えば、二重特異性抗体）、該抗原に結合する抗体フラグメント（例えば、 Fab' 、 $F' (ab)2$ 、 Fv 、一本鎖抗体、ジアボディ）、カメル・ボディ（camel body）、および所望の生物活性を示す前記のものを含む組換えペプチドを含む。抗体は、好ましくはIgG1、IgG2またはIgG4イソタイプ（後記を参照されたい）に由来するその重鎖上の異なる定常ドメイン（Fcドメイン）を保持しうる。エフェクター機能の修飾のための突然変異が導入されうる。補体タンパク質C1qおよびFc受容体との相互作用において主要な役割を果たすFc-ドメイン内のアミノ酸残基が特定されており、エフェクター機能に影響を及ぼす突然変異が記載されている〔総説としては、Colligan, Current Protocols in ImmunologyまたはCurrent Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001)を参照されたい〕。特に、IgG1のアグリコシル化（glycosylation）は、アミノ酸297位のアスパラギンをアラニンに、またはアスパラギンをグルタミンに突然変異させることにより達成可能であり、これは抗体誘導性細胞性細胞傷害（ADCC）を損なうと報告されている〔Labrijn AF, Aalberse RC, Schuurman J. (2008) When binding is enough: nonactivating antibody formats. Curr Opin Immunol. 20: 479-485〕。322位におけるアラニンによるリシンの置換はADCCの低下および補体誘導性細胞傷害性（CDC）の排除を招き、一方、234および235位における2つのロイシンの、アラニンによる同時置換は、ADCCおよびCDCの回避を引き起こす〔Sazinsky SL, Ott RG, Silver NW, Tidor B, Ravetch JV, Wittrup KD. (2008) Glycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc receptors. Proc Natl Acad Sci USA. 105: 20167-20172〕。アビディティを保有するインビボ二価治療剤としてIgG4イソタイプを適用するために、「コアヒンジ領域」〔Schuurman J, Van Ree R, Perdok GJ, Van Doorn HR, Tan KY, Aalberse RC. (1999) Normal human immunoglobulin G4 is bispecific: it has two different antigen-combining sites. Immunology. 97: 693-698〕内のセリンからプロリンへの置換のような修飾が導入されうる。異種共有結合二量体を形成するヒトIgG2分子の傾向は、127、232および233位のシスティンの1つをセリンに置換することにより妨げられうる〔Simmons LC, Reilly D, Klimowski L, Raju TS, Meng G, Sims P, Hong K, Shields RL, Damico LA, Rancatore P, Yansura DG. (2002) Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: rapid and efficient production of glycosylated antibodies. J Immunol Methods. 263: 133-147〕。エフェクター機能の低下を伴うもう1つの形態は、4つのIgG4特異的アミノ酸残基変化を含有するIgG2に由来するIgG2m4形態でありうる〔Hezareh M, Hessel AJ, Jensen RC, van de Winkel JG, Parren PW. (2001) Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1. J Virol. 75: 10441-10448〕。

. 75 : 12161 - 1218]。抗体フラグメントは組換えDNA技術により、または完全抗体の酵素的もしくは化学的切断により製造可能であり、後記に更に詳しく記載されている。モノクローナル抗体の非限定的な例には、マウスモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体およびHuman Engineered(商標)免疫グロブリン、抗体、免疫グロブリンから誘導された配列を有するキメラ融合タンパク質、またはそれらのムテインもしくは誘導体(それぞれは後記に更に詳しく記載されている)が含まれる。化学的誘導体化抗体を含む、無傷分子および/またはフラグメント(断片)の多量体または凝集物も想定される。

【0023】

本明細書中で用いる「モノクローナル抗体」なる語は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体を意味し、すなわち、該集団を構成する個々の抗体は、少量で存在しうる可能な天然で生じる突然変異以外は同一である。モノクローナル抗体は単一抗原部位に対して高特異的である。更に、種々の決定基(エピトープ)に対する種々の抗体を典型的に含む通常の(ポリクローナル)抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらが、種々の特異性および特性を有する他の免疫グロブリンにより汚染されずに均一培養により合成される点で、有利である。

【0024】

「モノクローナル」なる修飾語は、実質的に均一な抗体集団から得られた抗体の特性を示し、いずれかの特定の方法による該抗体の製造を要すると解釈されるべきではない。例えば、使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら[Allen MJ, Guo A, Martinez T, Han M, Flynn GC, Wypych J, Liu YD, Shen WD, Dillon TM, Vezina C, Balland A. (2009) Interchain disulfide bonding in human IgG2 antibodies probed by site-directed mutagenesis. Biochemistry. 48: 3755-3766]により最初に記載されたハイブリドーマ法により製造可能であり、あるいは組換えDNA法により製造可能である[An Z, Forrest G, Moore R, Cukran M, Haytko P, Huang L, Vitelli S, Zhao JZ, Lu P, Hua J, Gibson CR, Harvey BR, Montgomery D, Zallier D, Wang F, Strohl W. (2009) IgG2 m4, an engineered antibody isotype with reduced Fc function. Mabs. 1: 572-579を参照されたい]。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、組換えモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、Human Engineered(商標)、または抗体フラグメントでありうる。

【0025】

「免疫グロブリン」または「天然抗体」は四量体糖タンパク質である。天然に存在する免疫グロブリンにおいては、各四量体は、ポリペプチド鎖の、2つの同一ペアから構成され、各ペアは1つの「軽」鎖(約25kDa)および1つの「重」鎖(約50~70kDa)を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識をもたらす約100~110個またはそれ以上のアミノ酸の「可変」領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能をもたらす定常領域を定める。免疫グロブリンは、その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて種々のクラスに帰属されうる。重鎖はミュー(μ)、デルタ(Δ)、ガンマ(γ)、アルファ(α)およびイプシロン(ε)として分類され、それぞれ、IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEとして、抗体のイソタイプを定める。イソタイプが異なれば、それが有するエフェクター機能も異なる。例えば、IgG1およびIgG3イソタイプは、しばしば、ADC/C活性を有する。ヒト軽鎖はカッパ(κ)およびラムダ(λ)軽鎖として分類される。軽鎖および重鎖においては、可変領域と定常領域とが約12個以上のアミノ酸の「J」領域により結合しており、重鎖は約10個以上のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸の「D」領域をも含む[一般的には、Kohler G, Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256: 495 - 497]。本明細書における抗体/免疫グロブリンの「機能的フラグメント」または「抗原結合性抗体フラグメント」は、抗原結合性領域を保有する、抗体/免疫グロブリンのフラグメント(例えば、IgGの可変領域)として定義される。抗体の「抗原結合性領域」は、典型的には、抗体の、1以上の超可変領域、すなわち、CDR-1、-2および/または-3において見出されるが、可変「フレームワーク」領域も、例えば、CDRにスカフォールド(骨格)を提供することにより、抗原結合において重要な役割を果たしうる。好ましくは、「抗原結合性領域」は、少なくとも、可変軽(VL)鎖のアミノ酸残基4~103および可変重(VH)鎖のアミノ酸残基5~109、より好ましくは、VLのアミノ酸残基3~107およびVHのアミノ酸残基4~111を含み、特に好ましいのは完全なVLおよびVH鎖である[VLのアミノ酸1~109位およびVHの1~113位;アミノ酸位置の番号づけはKabatデータベース(米国特許第4,816,567号)によっている]。本発明において使用される免疫グロブリンの好ましいクラスはIgGである。

【0026】

「超可変」領域なる語は、抗原結合をもたらす、抗体または機能的フラグメントの可変ドメインVHおよびVLのアミノ酸残基を意味する。超可変領域は、「相補性決定領域」またはCDRからのアミノ酸残基、すなわち、軽鎖可変ドメイン内の残基24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)および88-97(LCDR3)、および重鎖可変ドメイン内の残基29-36(HCDR1)、48-66(HCDR2)および93-102(HCDR3)、および/または超可変ループからの残基、すなわち、軽鎖可変ドメイン内の残基26-32(LCDR1内)、50-52(LCDR2内)および91-96(LCDR3内)、および重鎖可変ドメイン内の残基26-32(HCDR1)、53-55(HCDR2内)および96-101(HCDR3内)[Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W. 編, 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)に記載されているとおり]を含む。抗体フラグメントの非限定的な例には、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、ドメイン抗体(dAb)、相補性決定領域(CDR)フラグメント、一本鎖抗体(scFv)、一本鎖抗体フラグメント、ジアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、直鎖状抗体[Johnson G, Wu TT. (2000) Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. *Nucleic Acids Res.* 28: 214-218];キレート化組換え抗体、トリボディまたはビボディ、イントラボディ、ナノボディ、スマールモジュラー免疫医薬(small modular immunopharmaceuticals)(SMIPs)、抗原結合性ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、ラクダ化抗体、VHH含有抗体、またはそれらのムテインもしくは誘導体、および特異的抗原結合をもたらすのに十分な、免疫グロブリンの少なくとも一部を含有するポリペプチド、例えばCDR配列(ただし、該抗体は所望の生物活性を保有していないければならない);ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体[Chothia C, Lesk AM. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol.* 196: 901-917; Zapata G, Ridgway JB, Mordenti J, Osaka G, Wong WL, Bennett GL, Carter P. (1995) Engineering linear F(ab')2 fragments for efficient production in *Escherichia coli* and enhanced antiproliferative activity. *Protein Eng.* 8: 1057-1062]が含まれる。「二重特異性」または「二官能性」抗体以外の抗

10

20

30

40

50

体は、同一であるその結合部位のそれぞれを有すると理解される。 $F(ab') または Fab は、 C_{H1} および C_L ドメイン間で生じる分子間ジスルフィド相互作用を最小化または完全に除去するように操作されうる。抗体のパバイン消化は 2 つの同一の抗原結合性フラグメント（これらは「 Fab 」フラグメントと称され、それぞれは単一の抗原結合部位を有する）と、残りの「 Fc 」フラグメント（その名称は、それが容易に結晶化しうることを表している）とを生成する。ペプシン処理は、2 つの「 Fv 」フラグメントを有する $F(ab') フラグメントを与える。「 Fv 」フラグメントは、完全な抗原認識および結合部位を含有する最小抗体フラグメントである。この領域は、強固に非共有結合した 1 つの重鎖可変ドメインと 1 つの軽鎖可変ドメインとの二量体からなる。 $VH - VL$ 二量体の表面上の抗原結合部位を定めるように各可変ドメインの 3 つの CDR が相互作用するのは、この立体配置においてである。合せて 6 個の CDR が抗原結合特異性を抗体にもたらす。しかし、単一の可変ドメイン（または抗原に特異的な 3 つのみの CDR を含む、 Fv の半分）でさえも、抗原を認識し結合する能力を有する。$$

【0027】

「一本鎖 Fv 」または「 sFv 」または「 $scFv$ 」抗体フラグメントは抗体の VH および VL ドメインを含み、ここで、これらのドメインは単一ポリペプチド鎖内に存在する。

【0028】

好ましくは、 Fv ポリペプチドは更に、 Fv が抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする、 VH および VL ドメイン間のポリペプチドリンカーを含む。 sFv の総説としては、C. A. K. Borrebaeck 編, (1995) *Antibody Engineering (Breakthroughs in Molecular Biology)*, Oxford University Press を参照されたい。

【0029】

Fab フラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第 1 定常ドメイン ($CH1$) を含有する。 Fab フラグメントは、抗体ヒンジ領域からの 1 以上のシステインを含む重鎖 $CH1$ ドメインのカルボキシ末端における数個の残基の付加により、 Fab' フラグメントとは異なる。 $Fab' - SH$ は、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を含有する Fab' を表す本明細書における名称である。 $F(ab')_2$ 抗体フラグメントは、元々は、ヒンジシステインを相互間に有する Fab' フラグメントのペアとして得られた。

【0030】

「フレームワーク」または FR 残基は超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0031】

「定常領域」なる語は、エフェクター機能をもたらす、抗体分子の部分である。

【0032】

「ムテイン」または「変異体」なる語は互換的に用いられることが可能であり、可変領域または可変領域と等価な部分における少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、欠失または挿入を含有する抗体のポリペプチド配列を意味し、ただし、ムテインまたは変異体は所望の結合アフィニティまたは生物活性を保有する。

【0033】

ムテインは親抗体に実質的に相同または実質的に同一でありうる。

【0034】

「誘導体」なる語は、ユビキチン化、治療用または診断用物質へのコンジュゲート化、標識（例えば、放射性核種または種々の酵素での標識）、重合体の共有結合、例えばペグ化（ポリエチレングリコールでの誘導体化）、および非天然アミノ酸の化学合成による挿入または置換のような技術により、共有結合により修飾された抗体を意味する。

【0035】

「ヒト」抗体または機能的ヒト抗体フラグメントは、本明細書においては、キメラ体でも「ヒト化体」でもなく、（全体的または部分的に）非ヒト種からのものでないものと定

10

20

30

40

50

義される。ヒト抗体または機能的抗体フラグメントはヒトから誘導可能であり、あるいは合成ヒト抗体でありうる。「合成ヒト抗体」は、本明細書においては、既知抗体配列の分析に基づいて合成配列から全体的または部分的にインシリコで誘導された配列を有する抗体と定義される。ヒト抗体配列またはそのフラグメントのインシリコ設計は、例えば、ヒト抗体または抗体フラグメント配列のデータベースを分析し、それから得られたデータを利用してポリペプチド配列を案出することにより達成されうる。ヒト抗体または機能的抗体フラグメントのもう1つの例は、ヒト由来の抗体配列のライブラリーから単離された核酸によりコードされるものである（すなわち、そのようなライブラリーは、ヒト天然源から採取された抗体に基づく）。ヒト抗体の例には、Kontermann R. および Duebel S. 編, (2001) *Antibody Engineering* (Springer Laboratory Manual), Springer Verlag; Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg ならびに Moore 編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Carlsson R, Soderlind E. (2001) n-CODER concept: unique types of antibodies for diagnostic use and therapy. Expert Rev Mol Diagn. 1:102-108 に記載されている、n-CODERに基づく抗体が含まれる。

【0036】

「ヒト化抗体」または機能的ヒト化抗体フラグメントは、本明細書においては、(I) 非ヒト（例えば、異種免疫系を有するトランスジェニックマウス）に由来し、ヒト生殖系列に基づくもの、または (II) CDR グラフト化体（ここで、可変ドメインの CDR は非ヒト由来であり、一方、可変ドメインの 1 以上のフレームワークはヒト由来であり、定常ドメインは（存在する場合には）ヒト由来である）として定義される。

【0037】

本明細書中で用いる「キメラ抗体」なる語は、典型的には異なる種に由来する 2 つの異なる抗体から誘導された配列を含有する抗体を意味する。最も典型的には、キメラ抗体はヒト抗体フラグメントおよびマウス抗体フラグメント、一般的には、ヒト定常領域およびマウス可変領域を含む。

【0038】

本発明の抗体は組換え抗体遺伝子ライブラリーから誘導されうる。組換えヒト抗体遺伝子のレパトワの作製、および纖維状バクテリオファージの表面上のコード化抗体フラグメントの提示のための技術の開発は、ヒト抗体を直接的に製造し、選択するための組換え手段を提供しており、これはヒト化抗体、キメラ抗体、マウス抗体またはムテイン抗体にも適用されうる。ファージ技術により製造される抗体は、通常は Fv または Fab フラグメント抗原結合性フラグメントとして、細菌において製造され、したがってエフェクター機能を欠く。エフェクター機能は以下の 2 つの方法の 1 つにより導入されうる。該フラグメントは、哺乳類細胞内での発現のために完全抗体へと、あるいはエフェクター機能を誘発しうる第 2 の結合部位を有する二重特異性抗体フラグメントへと操作されうる。典型的には、Fd フラグメント (VH - CH1) および抗体の軽鎖 (VL - CL) を PCR により別々にクローニングし、組合せ (コンビナトリアル) ファージディスプレイライブラリーにおいてランダムに組換え、ついでそれを特定の抗原への結合に関して選択することが可能である。Fab フラグメントは、ファージ表面上で、すなわち、それらをコードする遺伝子に物理的に連結されて発現される。したがって、抗原結合による Fab の選択は Fab コード配列を同時選択し、ついで該配列は増幅されうる。パンニングと称される数ラウンドの抗原結合および再増幅により、該抗原に特異的な Fab が富化され、最終的に単離される。

【0039】

ファージディスプレイライブラリーからヒト抗体を誘導するための種々の方法が記載さ

10

20

30

40

50

れている。そのようなライブラリーは単一マスターフレームワーク上で構築されることが可能であり、米国特許第6,989,250号、米国特許第4,816,567号に記載されているとおり、それに対して、多様なインビオ形成（すなわち、ヒト誘導）CDRが組換え可能となる。あるいは、そのような抗体ライブラリーは、合成的に作製される核酸によりコードされるインシリコで設計されたアミノ酸配列に基づくものでありうる。抗体配列のインシリコ設計は、例えば、ヒト配列のデータベースを分析し、それから得られたデータを利用してポリペプチド配列を案出することにより達成される。インシリコ作製配列を設計し、入手するための方法は記載されており、以下のものを参照されたい：Car
lsson R, Soderlind E. (2001) n-CODER concept: unique types of antibodies for diagnostic use and therapy. Expert Rev Mol Diagn. 1:102-108; 米国特許第6,989,250号; Knappik A, Ge
L, Honegger A, Pack P, Fischer M, Wellnhofer
G, Hoess A, Wolle J, Pluckthun A, Virnekas
B. (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. J Mol Biol. 296: 57-86。 ファージディスプレイ技術の総説としては、Krebs B, Rauch
chenberger R, Reiffert S, Rothe C, Tesar M, Thomassen E, Cao M, Dreier T, Fischer D, Hoss A, Inge L, Knappik A, Marget M, Pack P, Meng XQ, Schier R, Sohlemann P, Winter J, Wolle J, Kretzschmar T. (2001) High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. J Immunol Methods. 254: 67-84を参照されたい。

【0040】

あるいは、本発明の抗体は動物に由来しうる。そのような抗体はヒト化またはヒト操作 (Human Engineered) されうる [Krebs B, Rauch
chenberger R, Reiffert S, Rothe C, Tesar M, Thomassen E, Cao M, Dreier T, Fischer D, Hoss A, Inge L, Knappik A, Marget M, Pack P, Meng XQ, Schier R, Sohlemann P, Winter J, Wolle J, Kretzschmar T. (2001) High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. J Immunol Methods. 254: 67-84に要約されている]。 そのような抗体はトランスジェニック動物に由来しうる [Krebs B, Rauch
chenberger R, Reiffert S, Rothe C, Tesar M, Thomassen E, Cao M, Dreier T, Fischer D, Hoss A, Inge L, Knappik A, Marget M, Pack P, Meng XQ, Schier R, Sohlemann P, Winter J, Wolle J, Kretzschmar T. (2001) High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. J Immunol Methods. 254: 67-84を参照されたい]。 本明細書中で用いる異なる「形態」の抗原、例えば、凝固因子XIおよび/または凝固因子XIaは、本明細書においては、異なる翻訳および翻訳後修飾、例えば、一次FXI転写産物のスプライシングにおける相違、グリコシル化における相違および翻訳後タンパク質分解切断における相違（これらに限定されるものではない）により生じた異なるタンパク質分子として定義される。

【0041】

本明細書中で用いる「エピトープ」なる語は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に特異的に結合しうるいずれかのタンパク質決定基を含む。エピトープ決定基は、通常、化学的に活性な表面分子群、例えばアミノ酸または糖側鎖からなり、通常、特異的な三次元構造特性および特異的な電荷特性を有する。2つの抗体が「同一エピトープに結合する」と言えるのは、1つの抗体が、当業者によく知られた方法のいずれかによる競合結合アッセイにおいて、もう1つの抗体と競合することが示される場合、そして好ましくは、該エピトープの全アミノ酸がそれらの2つの抗体に結合する場合である。「成熟抗体」または「成熟抗原結合フラグメント」(例えば、成熟F_ab変異体)なる語は、より強力な、および/または改善された、所定抗原(例えば、F_{XI})への結合(すなわち、増加したアフィニティでの結合)を示す、抗体または抗体フラグメントの誘導体を含む。成熟は、このアフィニティ増加を招く、抗体または抗体フラグメントの6個のCDRにおける少数の突然変異を特定するプロセスである。成熟プロセスは、抗体内への突然変異の導入のための分子生物学的方法と、改善された結合体を特定するためのスクリーニングとの組合せである。

10

【0042】

医薬組成物および投与

本発明はまた、F_{XI}/F_{XI}a抗体を、単独で、または少なくとも1つの他の物質、例えば安定化化合物と共に含みうる医薬組成物に関する。これは、塩類液、緩衝塩類液、デキストロースおよび水(これらに限定されるものではない)を含むいずれかの無菌生体適合性医薬担体中で投与されうる。これらの分子はいずれも、それが賦形剤または医薬上許容される担体と混合された医薬組成物中で、単独で、または他の物質、薬物またはホルモンと共に、患者に投与されうる。本発明の1つの実施形態においては、医薬上許容される担体は医薬上不活性である。本発明はまた、医薬組成物の投与に関する。そのような投与は非経口的に行われる。非経口的運搬の方法には、局所、動脈内(腫瘍へ直接的に)、筋肉内、皮下、脊髄内、鞘内、心室内、静脈内、腹腔内、子宮内または鼻腔内投与が含まれる。有効成分に加えて、これらの医薬組成物は、医薬上使用されうる製剤への活性化合物の加工を促進する賦形剤および補助剤を含む適當な医薬上許容される担体を含有しうる。製剤化および投与のための技術に関する更なる詳細はRemington's Pharmaceutical Sciences(Ed. Maack Publishing Co, Easton, Pa.)の最新版において見出されうる。

20

【0043】

非経口投与用の医薬製剤には、活性化合物の水溶液が含まれる。注射の場合には、本発明の医薬組成物は、水溶液中、好ましくは、生理的に許容されるバッファー、例えば、ハニクス液、リンガー液または生理緩衝塩類液(生理緩衝食塩水)中で製剤化されうる。水性注射懸濁剤は、懸濁液の粘度を増加させる物質、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランを含有しうる。また、活性化合物の懸濁剤は適當な油性注射懸濁剤として製造されうる。適當な親油性溶媒またはビヒクルには、脂肪油、例えばゴマ油、または合成脂肪酸エステル、例えばオレイン酸エチルもしくはトリグリセリド、またはリポソームが含まれる。所望により、該懸濁剤は、適當な安定剤、または高濃縮溶液の製造を可能にする、該化合物の溶解度を増加させる物質をも含有しうる。局所または鼻腔内投与の場合には、浸透すべき個々のバリヤに適した浸透剤が製剤中で使用される。そのような浸透剤は一般に当技術分野で公知である。非経口投与はまた、動脈内、筋肉内、皮下、骨髄内、鞘内および心室内、静脈内、腹腔内、子宮内、腔内または鼻腔内投与をも含む非経口運搬の方法を含む。

30

【0044】

キット

本発明は更に、本発明の前記組成物の成分の1以上が充填された1以上の容器を含む医薬パックおよびキットに関する。そのような容器には、ヒトへの投与のための製品の製造、使用または販売の機関による承認を示す、医薬または生物学的製品の製造、使用または

40

50

販売を規制する政府機関により定められた通知が添付されている。

【0045】

もう1つの実施形態においては、該キットは、本発明の抗体をコードするDNA配列を含有しうる。好ましくは、これらの抗体をコードするDNA配列は、宿主細胞内へのトランسفエクションおよび宿主細胞による発現に適したプラスミド中で提供される。該プラスミドは、宿主細胞における該DNAの発現を調節するプロモーター（しばしば、誘導プロモーター）を含有しうる。該プラスミドは、種々の抗体を製造するための該プラスミド内への他のDNA配列の挿入を促進する適当な制限部位をも含有しうる。該プラスミドはまた、コード化タンパク質のクローニングおよび発現を促進する多数の他の要素を含有しうる。そのような要素は当業者によく知られており、例えば、選択マーカー、開始コドン、終結コドンなどを含む。 10

【0046】

製造および貯蔵

本発明の医薬組成物は、例えば、通常の混合、溶解、顆粒化、糖剤製造、水ひ、乳化、カプセル化、捕捉または凍結乾燥法による、当技術分野で公知の方法で製造されうる。該医薬組成物は、使用前にバッファーと一緒にされる、4.5～5.5のpH範囲の1mM～50mMヒスチジン、0.1%～2%スクロース、2%～7%マンニトール中の凍結乾燥粉末として提供されうる。許容される担体中で製剤化された本発明の化合物を含む医薬組成物が製造されたら、それらは適当な容器内に配置され、適応状態の治療についてラベル表示されうる。抗凝固因子XIおよび/または抗凝固因子XIa抗体の投与の場合、そのようなラベル表示は投与の量、頻度および方法を含むであろう。 20

【0047】

IC50/Ec50

FDAによれば、IC50は、与えられた生物学的プロセスの50%抑制に必要な化合物の濃度を表す。本発明の抗体は100μM、好ましくは1μM、より好ましくは0.1μM、より好ましくは0.01μM、より好ましくは0.001μM、より好ましくは0.0001μMのIC50値を示す。

【0048】

治療的有効量

本発明における使用に適した医薬組成物には、意図される目的、すなわち、凝固因子XIおよび/または凝固因子XIaにより特徴づけられる個々の病態の治療を達成するための有効量の有効成分を含有する組成物が含まれる。有効量の決定は十分に当業者の技量の範囲内である。 30

【0049】

治療的有効量は、症状または状態を改善する、タンパク質またはその抗体、アンタゴニストまたはインヒビターの量を意味する。そのような化合物の治療効力および毒性は細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手法、例えば、ED₅₀（集団の50%において治療的に有効な用量）およびLD₅₀（集団の50%に致死的な用量）により決定されうる。治療効果と毒性効果との用量比は治療係数であり、それは比ED₅₀/LD₅₀として表されうる。大きな治療係数を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のための投与量の範囲の設定において用いられる。そのような化合物の投与量は、好ましくは、毒性をほとんど又は全く伴わないED₅₀を含む循環濃度の範囲内である。投与量は、用いられる投与量、患者の重症度および投与経路に応じて、この範囲内で変動する。 40

【0050】

厳密な投与量は、使用される患者を考慮して、個々の医師により選択される。投与量および投与は、十分なレベルの活性部分を与えるように、または所望の効果を維持するように調節される。考慮されうる追加的な因子には、病態の重症度、患者の年齢、体重および性別、食事、投与の時間および頻度、薬物の組合せ、反応感受性、ならびに療法に対する耐性/応答が含まれる。長時間作用性医薬組成物は、個々の製剤の半減期およびクリアラ 50

ンス速度に応じて、3～4日ごとに、毎週、または2週間に1回、または1カ月に1回投与されうるであろう。

【0051】

通常の投与量は、投与経路に応じて、約2gまでの合計用量で、0.1～100,000マイクログラムで変動しうる。個々の投与量および運搬方法に関する指針は文献に記載されている[米国特許第6,300,064号を参照されたい]。当業者は、ポリヌクレオチドの場合には、タンパク質またはそれらのインヒビターの場合とは異なる製剤を使用するであろう。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの運搬は個々の細胞、状態、位置などに特異的であろう。放射能標識抗体に関する好ましい比活性は0.1～10mCi/mgタンパク質の範囲でありうる[WO 08/022295, US. 4,657,760; US 5,206,344; US 5,225,212; Riva P, Franceschi G, Frattarelli M, Lazzari S, Riva N, Giuliani G, Casi M, Sartori G, Guiducci G, Giorgetti G, Gentile R, Santimaria M, Jermann E, Maeke HR. (1999) Loco-regional radioimmunotherapy of high-grade malignant glioma using specific monoclonal antibodies labeled with 90Y: a phase I study. Clin Cancer Res. 5 (10 Suppl): 3275s-3280s]。

【0052】

本発明は以下の実施例により更に詳細に説明される。該実施例は、特定の実施形態に関して本発明を例示するものであるに過ぎない。これらの例示は、本発明の或る特定の態様を例示するものであり、限定を示すものではなく、また、開示されている本発明の範囲を制限するものでもない。

【0053】

全ての実施例は、詳細に特記されていない限り、当業者によく知られており常套的である標準的な技術を用いて行った。以下の実施例の通常の分子生物学的技術は、標準的な実験マニュアル、例えばSambrook, J., Fritsch, E. F. およびManiatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USAに記載されているとおりに行われうる。

【0054】

バッファー中の凝固因子XIおよび/または凝固因子XIaの阻害の測定

前記の物質の因子XIa阻害を決定するために、ヒト因子XIaの酵素活性を決定するために因子XIa基質の変換を用いる生物学的試験系を構築する。該決定はマイクロタイタープレート内で行われる。

【0055】

抗凝固活性の決定

試験物質の抗凝固活性をヒト血漿および/またはウサギ血漿および/またはラット血漿においてインビトロで決定する。この目的のために、0.11モル濃度のクエン酸ナトリウムを受容物として使用して、血液を1/9のクエン酸ナトリウム/血液の混合比で採取する。血液採取の直後に、それを十分に混合し、約4000gで15分間遠心分離する。上清をピペットで除去する。

【0056】

市販の試験キット(Roche(かつては、Boehringer Mannheim)のNeoplastin(登録商標)またはInstrumentation LaboratoryのHemoliance(登録商標)RecombiPlastin)を使用して、種々の濃度の試験物質または対応溶媒の存在下、プロトロンビン時間(PT, 同義語: トロンボプラスチン時間、迅速試験)を決定する。試験化合物を該血漿と共に3

7 で 3 分間インキュベートする。ついでトロンボプラスチンの添加により凝固を開始させ、凝固が生じる時間を決定する。プロトロンビン時間の倍加をもたらした試験物質の濃度を決定する。

【0057】

市販の試験キット (R o c h e のトロンビン試薬) を使用して、種々の濃度の試験物質または対応溶媒の存在下、トロンビン時間 (TT) を決定する。試験化合物を該血漿と共に 37 で 3 分間インキュベートする。ついで該トロンビン試薬の添加により凝固を開始させ、凝固が生じる時間を決定する。トロンビン時間の倍加をもたらす試験物質の濃度を決定する。

【0058】

市販の試験キット (R o c h e の PTT 試薬) を使用して、種々の濃度の試験物質または対応溶媒の存在下、活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) を決定する。試験化合物を該血漿および該 PTT 試薬 (セファリン、カオリン) と共に 37 で 3 分間インキュベートする。ついで 25 mM 塩化カルシウムの添加により凝固を開始させ、凝固が生じる時間を決定する。aPTT の倍加をもたらす試験物質の濃度を決定する。本発明の抗体の濃度は 100 μM の濃度、好ましくは 1 μM の濃度、より好ましくは 0.1 μM の濃度、より好ましくは 0.01 μM の濃度、より好ましくは 0.001 μM の濃度、より好ましくは 0.0001 μM の濃度、より好ましくは 0.00001 μM の濃度で aPTT の倍加を招く。

【0059】

治療用途

本発明の抗凝固因子 X I 抗体および / または抗凝固因子 X I a 抗体は、凝固カスケードの阻害および血小板凝集の抑制および血栓症の抑制が有益である任意の対象に投与される。したがって、本発明の抗凝固因子 X I 抗体および / または抗凝固因子 X I a 抗体はヒトおよび動物における凝固関連疾患の治療および / または予防に適している。「血栓塞栓疾患」なる語は、心筋梗塞 (MI) または急性心筋梗塞 (AMI) (ECG 上の ST 上昇を伴う及び伴わないもの) (STEMI および非STEMI) 、安定狭心症および不安定狭心症、血管形成術後または冠状動脈バイパス移植 (CABG) のような冠状動脈介入後の再閉塞および再狭窄、末梢血管塞栓症 (PAD) 、肺塞栓症 (PE) 、深在性静脈血栓症 (DVT) および腎静脈血栓症、一過性虚血発作 (TIA) 、血栓性卒中および血栓塞栓性卒中のような疾患を含む。

【0060】

これらの抗体は、脳虚血、卒中発作および全身性血栓塞栓症のような心原性血栓塞栓症の治療および予防、不規則心拍または異常心リズムを有する患者、例えば心房細動を有する患者、人工心臓弁を有する心臓弁膜症を有する患者の治療にも有用である。更に、これらの抗体は、播種性血管内凝固 (DIC) を有する患者の治療に役立ちうるであろう。

【0061】

血栓塞栓性合併症は、急性血栓性閉塞を招きうる、血管壁のアテローム性動脈硬化病変、特に、内皮機能の障害により引き起こされうる。アテローム性動脈硬化症は、多数の心血管リスク因子に基づく多因性障害である。臨床研究は、抗凝固物質での予防が動脈血管障害の経過に明確には影響を及ぼさないことを示している。したがって、抗血栓療法と組合されたリスク因子の標的化治療は有利である。冠状動脈、末梢および脳血管障害のリスク因子は、例えば、血清コレステロールレベルの上昇、動脈高血圧、喫煙および糖尿病である。予防医学の原理はこれらのリスク因子の排除に基づいている。生活習慣の改変に加えて、薬理学的手段、例えば、抗高血圧療法、脂質低下薬または血栓症予防も含まれる。また、冠状動脈治療剤との組合せは、冠状動脈心疾患の既に存在する場合の治療に適している。

【0062】

血栓塞栓性合併症は、細血管障害性溶血性貧血 (MAHA) 、血液透析および大動脈弁置換術のような体外血液循環に関わっている。

10

20

30

40

50

【0063】

また、本発明の抗体は関節リウマチ（R A）のような炎症疾患、またはアルツハイマー病（A D）のような神経疾患の治療または予防に有用である。更に、これらの抗体は、癌および転移、血栓性微小血管症（T M A）、加齢黄斑変性、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎障害および他の微小血管疾患の治療に有用でありうるであろう。

【0064】

本発明の抗体は、腫瘍患者の手術後の、あるいは化学療法および／または放射線療法を受けている腫瘍患者における血栓塞栓性合併症の治療にも有用である。

【0065】

本発明の抗体は、透析患者の治療および／または予防、特に、血液透析におけるシャント血栓症のチミノ（C imino）フィステルの予防にも有用である。血液透析は、天然動脈フィステル、合成ループ移植片、大きな内径の中心静脈カテーテル、または人工表面からなる他の装置を使用して行われうる。本発明の抗体の投与は、透析中およびその後の両方における、フィステル内の血餅の形成（および肺動脈内の塞栓血餅の伝達）を妨げるであろう。本発明の抗体は、心肺バイパス手術（例えば、E C M O：体外膜型肺）後の心臓内および肺内血栓症の患者の治療および／または予防にも有用である。全身抗凝固ならびに装置の機械的安定性および持続が要求されるなかで、心室補助人工心臓の大きな欠点は高頻度の血栓閉塞事象である。したがって、本発明の抗体は、左心補助循環装置を装着している患者の治療および／または予防にも有用である。透析患者においては、この集団における静脈血栓閉塞（V T E）および心房細動（例えば、血液透析患者における最終段階の腎疾患）の頻度が高く、望ましくない出血事象のリスクを増加させない抗凝固が大いに必要とされている。本発明の抗体はこれらのタイプの患者の治療および／または予防にも有用である。本発明の抗体は、特発性血小板減少性紫斑病（I P T）に冒された患者の治療および／または予防にも有用である。これらの患者は、一般集団と比較して増加した血栓症リスクを有する。凝固因子F X Iの濃度は、I T P患者においては、対照と比較して有意に高く、a P T Tは、I T P患者においては、有意に、より長い。本発明の抗体は肺高血圧の治療および／または予防にも有用である。

10

20

30

40

【0066】

「肺高血圧」なる語は、世界保健機関WHO（C linical C lassification of P ulmonary H ypertension, V enice 2003）により定義された指針に従い、例えば、肺動脈高血圧、左室疾患により引き起こされる肺高血圧、肺疾患および／または低酸素症により、血餅、動脈狭窄および慢性血栓塞栓肺高血圧（C T E P H）のような他の疾患により引き起こされる肺高血圧を含む。

【0067】

「肺高血圧」なる語は、特発性肺動脈高血圧I P A H、家族性肺動脈高血圧（F P A H）、関連肺動脈高血圧（A P A H）のような疾患をも含み、これらは、甲状腺疾患、グリコーゲン蓄積病（G S D）、ゴーシエ病（M orbus G aucher）、遺伝性出血性毛細血管拡張および／または骨髄増殖性障害のような疾患と共に、膠原病、先天性全身性肺シャントビチア（shunt v itia）、H I V感染または或る薬物の投与に関連づけられうるであろう。

30

40

【0068】

本発明の抗体は、肺静脈閉塞病、肺毛細血管血管腫症（P C H）、および新生児遷延性肺高血圧症のような疾患の治療および／または予防に有用である。

【0069】

「肺高血圧」なる語はまた、慢性閉塞性肺疾患（C O D P）、間質性肺疾患（I L D）、睡眠時無呼吸、肺胞過換気、高山病および体質性異形成のような疾患を含む。

【0070】

慢性血栓塞栓性肺高血圧（C T E P H）により引き起こされる疾患は、近位および／または遠位肺動脈閉塞、あるいは癌、寄生生物または汚染物のような非血栓性肺閉塞に関連づけられうる。

50

【0071】

更に、本発明の抗体は、サルコイドーシス、組織球症Xおよびリンパ管腫症により引き起こされる肺高血圧の治療および/または予防に使用されうる。

【0072】

また、本発明の抗体は肺および/または肝線維症の治療および/または予防に有用でありうる。

【0073】

本発明の抗体は、敗血症、全身性炎症症候群(SIRS)、臓器機能不全、多臓器機能不全症候群(MODS)、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、急性肺損傷(ALI)、播種性血管内凝固(DIC)の治療および/または予防にも有用である。

10

【0074】

「敗血症」なる語は、感染の、または全身性炎症応答症候群(SIRS)の発生を意味する。SIRSは主に感染により誘発されるが、損傷、熱傷、ショック、手術、虚血、臍炎、蘇生または腫瘍疾患の後でも生じうる。敗血症の経過中、播種性血管内凝固または略してDICと称される過程である凝固カスケードが活性化されうる。これは微小血栓の形成および二次合併症を招きうる。

【0075】

また、敗血症またはSIRSは内皮機能不全を招いて、血管透過性の増加を招きうる。敗血症またはSIRSの経過中、幾つかの臓器の合併不全、例えば腎不全、肝不全、肺不全、心血管系の不全が生じうる。

20

【0076】

敗血症またはSIRSを誘発する病原性生物としては、グラム陽性およびグラム陰性細菌、真菌、ウイルスならびに/または真核性病原体が挙げられる。

【0077】

DICおよび/またはSIRSは敗血症と共に生じうるが、手術、腫瘍疾患、熱傷または他のタイプの損傷によっても生じうる。

【0078】

DIC中に、損傷血管または他のタイプの組織の表面において凝固カスケードの活性化が生じる。これは微小血栓の形成を招き、それにより小血管の閉塞が生じる。

30

【0079】

1つの実施形態においては、該抗凝固因子XI抗体および/または抗凝固因子XIa抗体は、前記疾患の治療および/または予防のための他の薬物と組合せて使用される。

【0080】

以下に、適当な組合せの例を一覧する。したがって、これらは好ましい例が記載されている。

【0081】

・脂質低下化合物、特に、3-ヒドロキシ-3-メチル-グルタリル-CoAレダクターゼのインヒビター、例えば、ロバスタチン(Lovastatin)(メバコール(Mevacor); US 4,231,938)、シンバスタチン(Simvastatin)(ゾコール(Zocor); US 4,444,784)、プラバスタチン(Pravastatin)(プラバコール(Pravachol); US 4,346,227)、フルバスタチン(Fluvastatin)(レスコール(Lescol); US 5,354,772)およびアトルバスタチン(Atorvastatin)(リピトール(Lipitor; US 5,273,995)との組合せ。

40

【0082】

・冠状動脈疾患の治療に適した化合物および/または血管拡張活性を示す化合物、特に、アンジオテンシン変換酵素のインヒビター、例えば、カブトプリル(Captopril)、リシノプリル(Lisinopril)、エナラプリル(Enalapril)、ラミプリル(Ramipril)、シラザプリル(Cilazapril)、ベナゼプリル(Benazepril)、フォシノプリル(Fosinopril)、キナプリル(

50

Quinapril) およびペリンドプリル (Perindopril)、またはアンジオテンシンII受容体のアンタゴニスト、例えば、エンブサルタン (Embutsartan) (US 5,863,930)、ロサルタン (Losartan)、バルサルタン (Valsartan)、イルベサルタン (Irbesartan)、カンデサルタン (Candesartan)、エプロサルタン (Eprosartan) およびテミサルタ (Temissartan)、または -アドレナリン作動性受容体のアンタゴニスト、例えば、カルベジロール (Carvedilol)、アルブレノロール (Alprenolol)、ビソプロロール (Bisoprolol)、アセブトロール (Acebutolol)、アテノロール (Atenolol)、ベタキソロール (Betaxolol)、カルテオロール (Carteolol)、メトプロロール (Metoprolol)、ナドロール (Nadolol)、ベンブトロール (Penbutolol)、ピンドロール (Pindolol)、プロパンオロール (Propanolol) およびチモロール (Timolol) との組合せ、あるいはアルファ1アドレナリン作動性受容体のアンタゴニスト、例えば、プラゾシン (Prazosin)、ブナゾシン (Bunazosin)、ドキサゾシン (Doxazosin) およびテラゾシン (Terazosin) との組合せ。
。

【0083】

・利尿剤ヒドロクロロチアジド (Hydrochlorothiazide)、フロセミド (Furosemide)、ブメタニド (Bumetanide)、ピレタニド (Piretanide)、トラセミド (Torasemide)、アミロリド (Amiloride) およびジヒドララジン (Dihydralazine) との組合せ。
。

【0084】

・カルシウムチャネルのインヒビター、例えば、ベラパミル (Verapamil) およびジルチアゼム (Diltiazem)、ジヒドロピリジン誘導体、例えば、ニフェジピン (Nifedipine) (アダラート (Adalat))、ニトレンドラジピン (Nitrendipine) (バヨテンシン (Bayotensin))、イソソルビド-5-モノニトарат、イソソルビド-ニジトаратおよびグリセロルトリニトарат (Glyceroltrinitrate) との組合せ。

【0085】

・環状グアノシンモノホスファート (cGMP) の濃度の増加を招く化合物、例えば、可溶性グアニラートシクラーゼの刺激物質 (WO 98/16223, WO 98/16507, WO 98/23619, WO 00/06567, WO 00/06568, WO 00/06569, WO 00/21954, WO 00/66582, WO 01/17998, WO 01/19776, WO 01/19355, WO 01/19780, WO 01/19778, WO 07/045366, WO 07/045367, WO 07/045369, WO 07/045370, WO 07/045433) との組合せ。
。

【0086】

・凝固カスケードの他のインヒビター、例えば、プラスミノーゲンアクチベーター (血栓溶解物質 / フィブリン溶解物質)、ならびに血栓溶解および / またはフィブリン溶解を増強する化合物、またはプラスミノーゲンアクチベーターのインヒビターまたはトロンビン活性化フィブリン溶解インヒビター (TAFIインヒビター) のインヒビター、例えば組織プラスミノーゲンアクチベーター (t-PA)、ストレプトキナーゼ、レテプラーゼ (Reteplase) およびウロキナーゼとの組合せ。
。

【0087】

・抗凝固物質、例えば、非分画ヘパリン、低分子量ヘパリン、ヘパリノイド、ヒルジン、ビバリルジン (Bivalirudin) および / またはアルガトロバン (Argatrobant) との組合せ。
。

【0088】

更なる組合せ療法としては、抗生物質療法、抗真菌療法剤および抗ウイルス療法剤との

10

20

30

40

50

抗凝固因子 X I 抗体および / または抗凝固因子 X I a 抗体の共投与が挙げられる。

【 0 0 8 9 】

更なる抗凝固因子 X I 抗体および / または抗凝固因子 X I a 抗体の組合せ。

【 0 0 9 0 】

・昇圧薬、例えば、ノルエピネフリン (Norepinephrine) 、ドーパミン (Dopamine) およびバソプレッシン (Vasopressin) との組合せ。

【 0 0 9 1 】

・変力療法、例えば、ドブタミン (Dobutamine) 。

【 0 0 9 2 】

・コルチコステロイド、例えば、ヒドロコルチゾン (hydrocortisone) またはフルドロコルチゾン (fludrocortisone) 。

【 0 0 9 3 】

・組換え発現された活性化プロテイン C 。

【 0 0 9 4 】

・血液製剤、例えば、新鮮凍結血漿、赤血球濃縮物および / または血小板濃縮物。

【 0 0 9 5 】

本発明のもう 1 つの実施形態は、凝固因子 X I および / または凝固因子 X I a を含有する血液プローブ、血液保存、他の血漿製品または生物学的サンプルのための抗凝固物質としての、抗凝固因子 X I 抗体および / または抗凝固因子 X I a 抗体の使用である。これらのサンプルは、インビトロ凝固を回避するために有効濃度の該抗体が加えられていることにより特徴づけられる。

【 0 0 9 6 】

本発明の抗凝固因子 X I 抗体および / または抗凝固因子 X I a 抗体は、エクスピボ凝固の抑制のために、例えば、血液カテーテルまたは他の医学的添加物もしくは装置の調製のため、インビボの人工表面のコーティングのために、ならびに凝固因子 X I および / または凝固因子 X I a を含有する、エクスピボで使用される医学的添加物、装置または他の生物学的サンプルにも使用されうる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 9 7 】

【 図 1 】ヒト F X I a を抑制する、可変軽鎖ドメインのアミノ酸配列として配列番号 19 および可変重鎖ドメインのアミノ酸配列として配列番号 20 を含む抗 F X I a 抗体 0 7 6 D - M 0 0 7 - H 0 4 の用量反応曲線 (E C 5 0 は I C 5 0 と同一である)。この抗体は C D R H 1 としての配列番号 2 1 、 C D R H 2 としての配列番号 2 2 、および C D R H 3 としての配列番号 2 3 を含む。この抗体は更に、 C D R L 1 としての配列番号 2 4 、 C D R L 2 としての配列番号 2 5 、および C D R L 3 としての配列番号 2 6 を含む。パンニング / スクリーニング法において特定された抗体を、ヒト F X I a のタンパク質分解活性を抑制するその能力に関して、示されている濃度において試験した。関連 D N A 配列を配列番号 1 ~ 配列番号 8 として示す。

【 図 2 】ウサギ F X I a を抑制する抗 F X I a 抗体 0 7 6 D - M 0 0 7 - H 0 4 の用量反応曲線。パンニング / スクリーニング法において特定された抗体を、ウサギ F X I a のタンパク質分解活性を抑制するその能力に関して、示されている濃度において試験した。

【 図 3 】ヒト F X I a を抑制する、可変軽鎖ドメインのアミノ酸配列として配列番号 2 7 および可変重鎖ドメインのアミノ酸配列として配列番号 2 0 を含む抗 F X I a 抗体 0 7 6 D - M 0 0 7 - H 0 4 - C D R L 3 - N 1 1 0 D の用量反応曲線。パンニング / スクリーニング法において特定された抗体を、ヒト F X I a のタンパク質分解活性を抑制するその能力に関して、示されている濃度において試験した。

【 図 4 】抗 F X I a 抗体 0 7 6 D - M 0 0 7 - H 0 4 - C D R L 3 - N 1 1 0 D の用量反応曲線。パンニング / スクリーニング法において特定された抗体を、ウサギ F X I a のタンパク質分解活性を抑制するその能力に関して、示されている濃度において試験した。

【 図 5 】凝固因子 X I I a を介したヒト F X I から F X I a への変換を抑制する、可変軽

10

20

30

40

50

鎖ドメインのアミノ酸配列として配列番号29および可変重鎖ドメインのアミノ酸配列として配列番号30を含む抗FXI抗体076D-M028-H17の用量反応曲線。この抗体は、CDRH1としての配列番号31、CDRH2としての配列番号32、およびCDRH3としての配列番号33を含む。この抗体は更に、CDRL1としての配列番号34、CDRL2としての配列番号35、およびCDRL3としての配列番号36を含む。パンニング/スクリーニング法において特定された抗体を、チモーゲンFXIからその活性形態FXIaへの変換を抑制するそれらの能力に関して、示されている濃度において試験した。関連DNA配列を配列番号11～配列番号18として示す。

【図6】凝固因子IIaによるヒトFXIからFXIaへの変換を抑制する抗FXI抗体076D-M028-H17の用量反応曲線。パンニング/スクリーニング法において特定された抗体を、チモーゲンFXIからその活性形態FXIaへの変換を抑制するそれらの能力に関して、示されている濃度において試験した。
10

【図7】凝固因子XIaによるウサギFXIからFXIaへの変換を抑制する抗FXI抗体076D-M028-H17の用量反応曲線。パンニング/スクリーニング法において特定された抗体を、チモーゲンFXIからその活性形態FXIaへの変換を抑制するそれらの能力に関して、示されている濃度において試験した。

【図8】凝固因子IIaによるウサギFXIからFXIaへの変換を抑制する抗FXI抗体076D-M028-H17の用量反応曲線。パンニング/スクリーニング法において特定された抗体を、チモーゲンFXIからその活性形態FXIaへの変換を抑制するそれらの能力に関して、示されている濃度において試験した。
20

【図9】ヒトFXIaの触媒ドメインへの076D-M007-H04の結合および遮断活性。076D-M007-H04はヒトFXIaのタンパク質分解活性を抑制するが、076D-M028-H17はそのような活性を示さない。このことは、076D-M007-H04がFXIaの触媒ドメインに結合することを示している。

【図10】ラインウィーバー-バーカプロットを用いる076D-M007-H04の結合様式の特徴づけは、この抗体が競合型阻害活性を示すことを示している。

【図11】CD62P発現および血小板微小凝集物形成に関するフローサイトメトリー分析。光散乱とFITC-CD41/CD61(GPIIb/IIa)蛍光との組合せにより、単一血小板が検出された。(A) FITC-CD41およびPE-CD62P蛍光でのドットプロットによるCD62P発現の決定。灌流の前(左)および後(右)のゲートされた血小板を示す。(B) 血小板微小凝集物形成が、円内に示されているサイズ増加(前方散乱)により特徴づけられた。灌流の前(左)および後(右)に集められたサンプルのドットプロットを示す。
30

【図12】血小板CD62P発現がFXI(a)抗体により減少した。全血を(A)076D-M007-H04および(B)076D-M028-H17で処理し、再石灰化の直後にコラーゲン被覆表面上で灌流した。並行して、全血サンプルをビヒクルまたはインヒビターで処理した後に集め、TRAP6(10μg/ml)の存在下または非存在下で5分間インキュベートした。図11に示されているとおり、血小板CD62P発現をフローサイトメトリーにより分析した。データは、少なくとも5つの実験のゲートされた集団におけるCD62P陽性血小板の平均±SEM%として示されている。各処理における5分間の灌流中の最大CD62P発現レベルがグラフに示されている。
40

【図13】血小板微小凝集物形成はFXI(a)抗体により抑制された。全血を(A)076D-M007-H04および(B)076D-M028-H17で処理し、再石灰化の直後にコラーゲン被覆表面上で灌流した。血小板微小凝集物を、図13に示されているとおりにフローサイトメトリーにより分析し、表示した。データは、少なくとも5つの実験の10⁴個のゲートされた単一血小板に対する平均±SEM凝集物数として示されている。各処理における5分間の灌流中の最大凝集物数がグラフに示されている。

【図14】塩化第二鉄誘発性血栓症(a)および耳出血時間(b)に対する076D-M007-H04のインピボ効果。076D-M007-H04は、耳出血時間を増加させることなく血栓重量を用量依存的に減少させることを示すことができた。
50

【図15】塩化第二鉄誘発性血栓症(a)および耳出血時間(b)に対する076D-M007-H04-CDRL3-N110Dのインビボ効果(実施例×××に記載されている)。076D-M007-H04-CDRL3-N110Dは、耳出血時間を増加させることなく血栓重量を用量依存的に減少させることを示すことができた。

【図16】インビボ効果は、塩化第二鉄誘発性血栓症(a)および耳出血時間(b)に対する076D-M028-H17の効果(実施例×××に記載されている)を示している。076D-M028-H17は、耳出血時間を増加させることなく血栓重量を用量依存的に減少させることを示すことができた。

【図17】この図は、FXIa(上部)と複合体形成したFab 076D-M007-H04(下部)のポンチ絵表示を示す。 10

【図18a】この図はFXIa C500Sに対するFab 076D-M007-H04(ポンチ絵)の結合エピトープの詳細図を示す。FXIa C500Sは表面表示として示されている。

【図18b】この図は、表面表示として示されたFXIa C500Sの重ね合せペプチドX線構造を伴うFab 076D-M007-H04を示す。活性部位間隙が赤色楕円形で強調されている。

【図19a】この図は、重ね合されたFab 076D-M007-H04を伴うチモーゲンFXI(codbエントリー2F83)の結晶構造を示す。

【図19b】この図は同じ図を示すが、チモーゲンのFXIの触媒ドメインがFab 0 20 76D-M007-H04:FXIa C500S複合体構造のFXIa C500Sの触媒ドメインにより置換されている。FXIおよびFXIa C500Sの触媒ドメインは表面表示として示されており、全ての他のドメインはポンチ絵として示されている。Fab 076D-M007-H04との境界における適切に秩序だっていないループが図19において強調されている。

【図20】076D-M007-H04の投与の後にヒビから集められた血漿サンプルにおいて決定されたインビトロaPTT血餅形成時間の増加。

【図21】2.5mg/kg 076D-M007-H04の投与(i.v.ボーラス)の後の、投与後5分から投与後504時間までのACT測定値。

【図22】2.5mg/kg 076D-M007-H04の投与(i.v.ボーラス)の最初の24時間のACT測定値。 30

【図23】2.5mg/kg 076D-M007-H04の投与(i.v.ボーラス)の後の、投与後5分から投与後504時間までのaPTT測定値。

【図24】2.5mg/kg 076D-M007-H04の投与(i.v.ボーラス)の最初の24時間のaPTT測定値。

【図25】2mm i.d.コラーゲン被覆ePTFE血管移植片における血小板沈着。

【図26】実施例12に記載されているコラーゲン被覆ePTFE血管移植片における血小板沈着。

【図27】実施例12に記載されている静脈成長チャンバー(およびコラーゲン被覆移植片とシリコンチャンバーとの間の連結部)における血小板沈着。

【図28】076D-M007-H04の投与の後でヒビ血漿において測定されたTATレベル。 40

【図29】0.5mg/kg 076D-M007-H04および2mg/kg 076D-M007-H04(24時間後)単独で、あるいはチュアブル・アスピリンを32mg/kgの濃度で与えた後に処理されたヒビにおける出血時間。

【0098】

実施例1:抗体の特定

ファージ選択に使用される手段:

本発明のヒト抗体の単離に使用したタンパク質は、表1に一覧されている種々の入手源から入手した。約2倍モル過剰のビオチン-LC-NHS(Pierce; Cat. No: 21347)を製造業者の説明に従い使用して、タンパク質をビオチン化し、ゼバ(Z 50

e b a) 脱塩カラム (P i e r c e ; C a t . N O : 8 9 8 8 9) を使用して、脱塩した。

【表 1】

表 1: ファージ選択およびスクリーニングにおいて使用したタンパク質の一覧:

タンパク質	起源	供給業者(Cat. No:)
hFX	ヒト	Haematologic Technologies Inc. (HCX-0050)
hFXa	ヒト	Haematologic Technologies Inc. (HCXA-0060)
rbFX	ウサギ	社内
rbFXa	ウサギ	社内
h プレカリクレイン	ヒト	Enzyme Research Laboratories HPK 2640 AL
h カリクレイン	ヒト	Enzyme Research Laboratories HPKA 1303
アプロチニン	ウシ	Sigma (A1153)

10

【 0 0 9 9 】

ファージ選択 :

本発明のヒト抗体またはその抗原結合性フラグメントの単離は、天然多様性および合成多様性を併せ持つ F a b ライブラリーである D Y A X のヒト F a b 抗体ライブラリー F A B - 3 1 0 (D Y A X C o r p . , C a m b r i d g e , M A ; H o e t ら , N a t . B i o t e c h . 2 0 0 5 , 2 3 : 3 4 4 - 8 に記載されている) を使用するファージディスプレイ技術により行った。表 2 ~ 6 は、複数のエピトープをカバーする抗体を選択するために用いた種々の方法を要約する。

20

【表 2】

表 2: 選択方法 I: 各ラウンドの選択の前に、ビオチン化カリクレイン／プレカリクレイン (500nM) に対する枯渇工程を含めた。

選択のラウンド:	方法 IA	方法 IB
1	500 nM ビオチン化 hFXI	
2	200 nM ビオチン化 hFXI	200 nM ビオチン化 rbFXI
3	100 nM ビオチン化 hFXI	200 nM ビオチン化 hFXI
4		100 nM ビオチン化 rbFXI

30

【表 3】

表 3: 選択方法 II: 方法 I に記載されているとおりに、各ラウンドの選択の前に、ビオチン化カリクレイン／プレカリクレイン (500nM) に対する枯渇工程を含めた。また、複合体 hFXIa (500nM)／アプロチニン (25 μ M) の存在下で選択を行った。

40

選択のラウンド:	方法 IIA	方法 IIB
1	500 nM ビオチン化 hFXI	
2	200 nM ビオチン化 hFXI	200 nM ビオチン化 rbFXI
3	100 nM ビオチン化 hFXI	200 nM ビオチン化 hFXI
4		100 nM ビオチン化 rbFXI

【表4】

表4: 選択方法 III: 各ラウンドの選択の前に、ビオチン化カリクレイン／プレカリクレイン (500nM) に対する枯渇工程を含めた。

選択のラウンド:	方法 IIIA	方法 IIIB
1	500 nM ビオチン化 hFXIa	
2	200 nM ビオチン化 hFXIa	200 nM ビオチン化 rbFXIa
3	100 nM ビオチン化 hFXIa	200 nM ビオチン化 hFXIa
4		100 nM ビオチン化 rbFXIa

10

【表5】

表5: 選択方法 IV: 方法 III に記載されているとおりに、各ラウンドの選択の前に、ビオチン化カリクレイン／プレカリクレイン (500nM) に対する枯渇工程を含めた。また、複合体 hFXIa(500nM)/アプロチン(25 μM) の存在下で選択を行った。

選択のラウンド:	方法 IVA	方法 IVB
1	500 nM ビオチン化 hFXIa	
2	200 nM ビオチン化 hFXIa	200 nM ビオチン化 rbFXIa
3	100 nM ビオチン化 hFXIa	200 nM ビオチン化 hFXIa
4		100 nM ビオチン化 rbFXIa

20

【表6】

表6: 各ラウンドの選択の前に、ビオチン化カリクレイン／プレカリクレイン (500nM) 及びビオチン化 hFXI (500nM) に対する枯渇工程を含めた。

選択のラウンド:	方法 V
1	500 nM ビオチン化 hFXIa
2	200 nM ビオチン化 rbFXIa
3	200 nM ビオチン化 hFXIa
4	100 nM ビオチン化 rbFXIa

30

【0100】

この実施例において使用した標準的なバッファーは以下のものである：

1 × PBS : Sigma (D5652-501) から入手

PBST: 0.05% Tween 20 (Sigma, P7949) で補足された 1 × PBS

プロッキングバッファー：3% BSA (Sigma A4503) で補足された PBS

沈殿バッファー：2.5M NaCl 中の 20% PEG 6000 (Calbiochem, 528877)

細胞パンニングバッファー：3% FBS (GIBCO, 10082) および 0.01% NaN₃ (Sigma, 71289) で補足された PBS。

【0101】

ライプラリー選択に用いた一般的方法は Ho et al (Ho et al, Cohen E

40

50

H, Kent RB, Rookey K, Schoonbroodt S, Hogan S, Rem L, Frans N, Daukandt M, Pieters H, van Hegelsom R, Neer NC, Nastri HG, Rondon IJ, Leeds JA, Hutton SE, Huang L, Kashin I, Devlin M, Kuang G, Steukers M, Viswanathan M, Nixon AE, Sexton DJ, Hoogenboom HR, Ladner RC. (2005) Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. *Nat Biotechnol.* 23: 344-348)により記載されている。簡潔に説明すると、1/5体積の沈殿バッファーを加え、ついで氷上での1時間のインキュベーションおよび遠心分離工程(5500 rpmで1時間)を行うことにより、Fab抗体ライブラリーを沈殿させる。ついで該沈殿ライブラリーを1mlのブロッキングバッファーに再懸濁させ、室温で30分間インキュベートする。その間、ストレプトアビシン被覆ダイナビーズ(Dynabeads)M280(Invitrogen, 11206D)のアリコートを、PBSTで3回洗浄することにより調製した。その後、表2~6に示されているとおり、幾つかのアリコートをビオチン化カリクレイン/プレカリクレイン(500 nM)またはビオチン化hFXI(500 nM)と混合し、一方、残りをビオチン化標的タンパク質と混合した。該混合物をエンド・ツー・エンド(end to end)ローテーター上で4でインキュベートし、ついで1mlのPBST中で5回洗浄した。最後に被覆ビーズを、1mlのブロッキングバッファー中の再懸濁によりブロッキングし、5つのチューブにアリコート化し、ついで該ビーズを集め、上清を除去した。
10

【0102】

ビオチン化カリクレイン/プレカリクレイン(500 nM)またはビオチン化hFXI(500 nM)で被覆されたブロッキングされたダイナビーズに、ブロッキングされたライブラリー(前記)を加えることにより、示されているとおりに5回の連続的な枯渇工程を行い、それを回転させながら室温で10分間インキュベートした。該ビーズを磁気ラック上で集めた後、遠心分離により上清を清澄化し、標的タンパク質で被覆されたブロッキングされたダイナビーズと混合した。エンド・ツー・エンド・ローテーターでの30分間のインキュベーションの後、該サンプルをブロッキングバッファーで3回洗浄し、ついでPBSTで9回洗浄した。ついで、表2~6に記載されている方法に従い、次の選択ランドにおいて使用する新たなファージストックを調製するために、富化ファージを含有する再懸濁ビーズの半分を使用して、指數関数的に増殖している大腸菌(E. coli)TG1(Stratageneから入手)に感染させた。より詳細に説明すると、6mlのTG1培養に500 μlのダイナビーズ/ファージ懸濁液を、振とうすることなく37で30分間感染させた。その後、出力滴定のためにアリコートを採取した。残りの培養を5000 rpmで15分間遠心分離し、得られたペレットを2mlの2×YTに再懸濁させ、寒天プレート(2×YT、100 μg/ml アンピシリン、2% グルコース)上でプレーティングした。37で一晩のインキュベーションの後、細胞を5mlの2×YT中に擦り落とし、0.05のOD600で、20mlの2×YT(100 μg/ml Amp)の新鮮培養に感染させるために、およびグリセロースストックの調製のために、それを使用した。0.5~0.8のOD600に達するまで、該新鮮液体培養を37で約2時間振とうさせ、ついで5mlの培養を約20の感染多重度(MOI)でM13ヘルペラージM123K07(Invitrogen 420311)と混合した。37で30分間、ゆっくり振とうした後、予め加温された30mlの2×YT(100 μg/ml アンピシリン、20 μg/ml カナマイシン、f.c.)を加え、該培養を30で振とうした。翌朝、上清を6000 rpmの遠心分離により集め、Steriflip(0, 22 μm; Millipore SCGP00525)での濾過により清澄化した。ついでファージを前記のとおりに沈殿させ、次の選択ランドにおける使用のために1
20
30
40
50

m1のプロッキングバッファー（または細胞パンニングバッファー）に再懸濁させた。入力力価の決定のためにアリコートを使用した。

【0103】

酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）：

ファージELISA：

種々のラウンドの選択の後のファージプールを、ビオチン化標的タンパク質に関するELISAにより、特異的結合体の富化に関して分析した。簡潔に説明すると、グリセロールストックからのアリコートを2×YT（100mg/ml アンピシリン、1% グルコース）上で37℃でプレーティングした。単一コロニーを、100μlの培地（2×YT、100μg/ml アンピシリン、1% グルコース）を含有するMTPのウェル内に拾い入れ、37℃で一晩振とうした。10μlの一晩の培養を、ヘルパー・ファージM123K07（Invitrogen 420311）を含有する190μlの新鮮培養（100μg/ml アンピシリンで補足された2×YT）に加え、~0.5のOD600に達するまで96ウェルMTP内で200rpm、37℃でインキュベートすることにより、ファージ発現を行った。

【0104】

ストレプトアビシン（ Pierce, 15500）で予め被覆された96ウェルELISAプレートを1μg/ml ビオチン化標的タンパク質で4℃で一晩被覆した。翌日、プレートをPBSTで7回洗浄し、プロッキング試薬で処理し、再びPBSTで3回洗浄した。その間に、ONファージ培養を100μlのプロッキングバッファーと混合した。その後、100μlの該プロッキングファージをウェルごとに移し、室温で1時間インキュベートした。PBSTで7回洗浄した後、HRP（GE Healthcare, 27-9421-01；PBST中で1:2500希釈）に結合した抗M13抗体を加え、室温で1時間インキュベートし、ウェルを再び7回洗浄した。発色反応を、100μlのTMB（Invitrogen, 2023）を加えることにより現像し、100μlのH₂SO₄（Merck, 1120801000）を加えることにより5~15分後に停止させた。比色反応をプレートリーダー（Tecan）において450nmにおいて記録した。

【表7】

表7: Fab/ファージELISAにおける種々の方法からのプールのヒット率: 数字は、それぞれ、ヒト/ウサギ/両方の抗体(交差反応性)に対するヒット率(%)を意味する。
n.a.: 適用不能

	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVB	V
第2ラウンド	3/1/0	1/0/0	6/5/4	0/1/0	1/1/0	1/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
第3ラウンド	77/20/18	22/18/16	80/30/31	41/28/32	35/8/3	11/18/9	35/3/0	10/13/10	13/23/9
第4ラウンド	n.a.	74/72/63	n.a.	80/84/67	n.a.	42/72/34	n.a.	86/90/73	65/70/53

【0105】

sFabスクリーニングのためのGen III除去によるsFabの再クローニング

30

40

50

可溶性 Fab フラグメント (s Fab) の作製のために、選択ラウンド 2、3 および 4 からのファジミド DNA を単離し、制限酵素 Mlu I (New England Biolabs, R0198L) で供給業者の説明に従い消化した。遺伝子 III 含有断片を取り出すために、該ベクターを遺伝子抽出し、Nde I (New England Biolabs, R0111S) での切断に付した。EtOH 沈殿後、得られた断片を再連結させ、標準的な方法を用いて、化学的にコンピテントな大腸菌 (E. coli) Top10 内に構築物を形質転換した。

【0106】

実施例 2：抗凝固因子 X I 抗体および / または抗凝固因子 X I a 抗体

本発明の抗体、抗原結合性抗体フラグメントならびに該抗体およびフラグメントの変異体は軽鎖可変領域および重鎖可変領域から構成される。本発明において想定される抗体または抗原結合性フラグメントの変異体は、凝固因子 X I および / または凝固因子 X I a に対する該抗体または抗原結合性フラグメントの結合活性が維持されている分子である。

【0107】

本発明は、

・可変重鎖および軽鎖領域のアミノ酸配列が、可変軽鎖ドメインに関しては、DNA 配列としては配列番号 1 およびアミノ酸配列としては配列番号 19 に対して、そして可変重鎖ドメインに関しては、DNA 配列としては配列番号 2 およびアミノ酸配列としては配列番号 20 に対して、少なくとも 60%、より好ましくは 70%、より好ましくは 80% または 90%、より一層好ましくは 95% 同一である、あるいは

・これらの抗体の成熟形態に関しては、可変重鎖および軽鎖ドメインのアミノ酸配列が、それらに対して、少なくとも 60%、より好ましくは 70%、より好ましくは 80% または 90%、より一層好ましくは 95% 同一である、

・CDR のアミノ酸配列が、重鎖ドメインに関しては、DNA 配列としては配列番号 3、4 および 5 ならびにアミノ酸配列としては配列番号 21、22 および 23 に対して、そして可変軽鎖ドメインに関しては、DNA 配列としては配列番号 6、7 および 8 ならびにアミノ酸配列のとしては配列番号 24、25 および 26 に対して、少なくとも 60%、より好ましくは 70%、より好ましくは 80%、より好ましくは 90%、より一層好ましくは 95% 同一である、抗体または抗原結合性フラグメントを提供する。

【0108】

更に、本発明は、

・可変重鎖および軽鎖領域のアミノ酸配列が、可変軽鎖に関しては、DNA 配列としては配列番号 9 およびアミノ酸配列としては配列番号 27 に対して、そして可変重鎖ドメインに関しては、DNA 配列としては配列番号 2 およびアミノ酸配列としては配列番号 20 に対して、少なくとも 60%、より好ましくは 70%、より好ましくは 80% または 90%、より一層好ましくは 95% 同一である；あるいは

・これらの抗体の成熟形態に関しては、可変重鎖および軽鎖ドメインのアミノ酸配列が、それらに対して、少なくとも 60%、より好ましくは 70%、より好ましくは 80% または 90%、より一層好ましくは 95% 同一である；

・CDR のアミノ酸配列が、可変軽鎖ドメインに関しては、DNA 配列としては配列番号 10 およびアミノ酸配列としては配列番号 28 に対して、少なくとも 60%、より好ましくは 70%、より好ましくは 80%、より好ましくは 90%、より一層好ましくは 95% 同一である、抗体または抗原結合性フラグメントを提供する。

【0109】

本発明はまた、

・可変重鎖および軽鎖領域のアミノ酸配列が、可変軽鎖ドメインに関しては、DNA 配列としては配列番号 11 およびアミノ酸配列としては配列番号 29 に対して、そして可変重鎖ドメインに関しては、DNA 配列としては配列番号 12 およびアミノ酸配列としては配列番号 30 に対して、少なくとも 60%、より好ましくは 70%、より好ましくは 80% または 90%、より一層好ましくは 95% 同一である、あるいは

10

20

30

40

50

・これらの抗体の成熟形態に関しては、可変重鎖および軽鎖ドメインのアミノ酸配列が、それらに対して、少なくとも 60%、より好ましくは 70%、より好ましくは 80% または 90%、より一層好ましくは 95% 同一である。

・ C D R のアミノ酸配列が、重鎖ドメインに関しては、D N A 配列としては配列番号 1 3、1 4 および 1 5 ならびにアミノ酸配列としては配列番号 3 1、3 2 および 3 3 に対して、そして可変軽鎖ドメインに関しては、D N A 配列としては配列番号 1 6、1 7 および 1 8 ならびにアミノ酸配列としては配列番号 3 4、3 5 および 3 6 に対して、少なくとも 60%、より好ましくは 70%、より好ましくは 80%、より好ましくは 90%、より一層好ましくは 95% 同一である、抗体または抗原結合性フラグメントを提供する。

【0110】

10

実施例 3：活性化部分トロンボプラスチン時間 (a P T T) アッセイを用いる抗凝固活性の決定

活性化部分トロンボプラスチン時間 (a P T T) アッセイを用いることにより、抗体 0 7 6 D - M 0 0 7 - H 0 4、0 7 6 D - M 0 0 7 - H 0 4 - C D R L 3 - N 1 1 0 D および 0 7 6 D - M 0 2 8 - H 1 7 の抗凝固活性を試験した。ヒトおよびウサギ血漿における a P T T の倍加に必要な濃度の値を表 8 に示す。

【表 8】

表 8：ヒトおよびウサギ血漿の aPTT の倍加に要した抗体濃度

20

	2xaPTT ヒト [μM]	2xaPTT ウサギ [μM]
076D-M028-H17	0,3	0,003
M076D-M007-H04	0,9	0,178
076D-M007-H04-CDRL3-N110D	0,3	0,063

【表9】

表9: 本発明の抗体の具体例および配列を示す。

説明	配列番号	タイプ	配列
H04-VI	1	DNA	GATATTAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGAACATTACCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGAACCTGGTATC AGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGATGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCGTCCGAGCCG CTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCCGAAGATATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGCGAACAGCTTCCGGTGACCTT TGGCGCGGCACCAAAGTGGAAATTAAA
H04-Vh	2	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCCCTGGT CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCCAGTATGGCATGGATTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTGGCCCGAGCGGCGGCAGCACCGTGTA TGC GGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATTA GATAACAGCAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCA CCCGCGCGGCCGTATTATTATGGCATGGATGT GTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACCGTGAGCAGC
H04 CDR H1	3	DNA	GGCTTACCTTAGCCAGTATGGCATGGAT
H04 CDR H2	4	DNA	GGCATTGGCCCGAGCGGCCAGCACCGTG
H04 CDR H3	5	DNA	ACCCGCGGCGGCCGTATTATTATGGCATGGATG TG
H04 CDR L1	6	DNA	CAGGCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGAAC
H04 CDR L2	7	DNA	GATGCGAGCAACCTGGAAACC
H04 CDR L3	8	DNA	CAGCAGGCGAACAGCTTCCG

10

20

30

40

N11 0D- VI	9	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCAG GCGAGGCCAGGATATTAGCAACTATCTGAACCTGGTATC AGCAGAAAACCAGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATTAA TGATGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCGTGCCGAGCCG CTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGGCGGATAGCTTCCGGTGACCTT TGGCGGGGGCACCAAAGTGGAAATTAAA
N11 0D- CDRL3	10	DNA	CAGCAGGCGGATAGCTTCCG
H17- VI	11	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCGC GCGAGGCCAGGGCATTAGCAGCTGGCTGGCGTGGTAT CAGCAGCGCCCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TATGATGCGAGCACCTGCAGAGCGGGCGTGCCGAGC CGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTAC CTGACCATTAAACAGCCTGCAGCCGAAACTTGC CCTATTATTGCCAGCAGGCGGATAGCTTCCGATTGC GTTGGCCAGGGCACCCGCCTGGAAATTAAA
H17- Vh	12	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGCGGCTGGT CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCGATTATGAAATGGCGTGG GTGCGCCAGGCAGGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCAGCATTGTGCCGAGCGGGCTGGACCCCTGA TGC GGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGCAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCAGCGGTGTATTATTGCG CGACCTGGGGCGATAGCTGGGGCTTGATTGGGG GCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC
H17 CDR H1	13	DNA	GGCTTACCTTAGCGATTATGAAATGGCG
H17 CDR H2	14	DNA	AGCATTGTGCCGAGCGGGCGGCTGGACCCCTG
H17 CDR H3	15	DNA	GCGACCTGGGGCGATAGCTGGGGCTTGATT
H17 CDR L1	16	DNA	CGCGCGAGCCAGGGCATTAGCAGCTGGCTGGCG
H17 CDR L2	17	DNA	GATGCGAGCACCCCTGCAGAGC
H17 CDR L3	18	DNA	CAGCAGGCGGATAGCTTCCGATTGCGTTGGC

10

20

30

40

50

H04-VI aa	19	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSQGTDFTFISSLQ PEDIATYYCQQANSFPVTFGGGTKVEIK
H04-Vh aa	20	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMWDWV RQAPGKGLEWVSGIGPSGGSTVYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGGPYGGYGMWDVWGQ GTTVTVSS
H04 CDR H1 aa	21	PRT	GFTFSQYGM
H04 CDR H2 aa	22	PRT	GIGPSGGSTV
H04 CDR H3 aa	23	PRT	TRGGPYGGYGMWDV
H04 CDR L1 aa	24	PRT	QASQDISNYLN
H04 CDR L2 aa	25	PRT	DASNLET
H04 CDR L3 aa	26	PRT	QQANSFP
N11 0D-VI aa	27	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSQGTDFTFISSLQ PEDIATYYCQQADSFPVTFGGGTKVEIK
N11 0D-CDRL3 aa	28	PRT	QQADSFP
H17-VI aa	29	PRT	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITCRAASQGISSWLAWYQQ RPGKAPKLLIYDASTLQSGVPSRFSGSQGTDFTLTINSL QOPENFATYYCQQADSFPIAFGQQGTRLEIK
H17-Vh aa	30	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYEMAWV RQAPGKGLEWVSSIVPSGGWTLYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATWGDSWGFDFWGQGT LTVSS

10

20

30

40

50

H17 CDR H1 aa	31	PRT	GFTFSDYEMA
H17 CDR H2 aa	32	PRT	SIVPSGGWTL
H17 CDR H3 aa	33	PRT	ATWGDSWGFDF
H17 CDR L1 aa	34	PRT	RASQGISSWLA
H17 CDR L2 aa	35	PRT	DASTLQS
H17 CDR L3 aa	36	PRT	QQADSFPIAFG
M00 9- G02- Vh	37	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCCGGCGGCCTGGTG CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCCGCTATATTATGCATTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCAGCATTAGCCCGAGCGGCCGCTGACCAGCTA TGCAGATAGCGTGAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCG CGCGCGAATTGAAAACCGCGTATCATTATTATTAT GGCATGGATGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACC GTGAGCAGC</p>
M00 9- G02- VI	38	DNA	<p>GATATTAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCGC GCGAGCGCGATATTGGCAACCGCGCTGGCTGGTAT CAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGCCCTGCTGATT AGCGATGCGAGCACCCCTGCAGAGCGGGCGTGCCTG CGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGAATTAC CTGACCATAGCAGCCTGCAGCCGGAAAGATTTGCGA CCTATTATTGCCTGCAGGGCTATAACTATCCGCGCAC CTTGGCCAGGGCACCAAACGGAAATTTCGC</p>

G16-Vh	39	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCCCTGGTGCAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGCAGCGGCTTACCTTAGCTGGTATCCGATGCAGTGGGTGCGCCAGGCAGCGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGAGCGGCATTAGCAGCAGCGCGGCCACCTATTATGCAGATGCCCTGCGATAGCGTGAAGAGCCGCTTACCATAGCCGCGATAACAGCAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGGATTGGGCTATAGCAACTATGTGATGGATCTGGCCTGGATTATTGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC</p>
G16-VI	40	DNA	<p>GATATTCAAGATGACCCAGAGGCCGGCGACCCCTGAGCCTGAGCGCGCGGGCGAACGCGCGACCCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGACCGTGAAGCAGCAGCCCTGGCGTGGTATCAGCATAAACCGGGCCAGGGCGCCGCGCCTGCTGATTTATGAAACAGCAACCGCGCGACCCGGCATTCCGGCGCGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGGATTTACCTGACCATTAGCAGCCTGGAAACCGGAAGATTTGCGGTGTATTATTGCCAGCATCGCAGCAACTGGCCGCCGA</p> <p>CCTTGGCCCCGGCACCAAAGTGGATATTAAA</p>
G11-Vh	41	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCCCTGGTGCAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGCAGCGGCTTACCTTAGCACCTATAGCATGGGCTGGTGCAGCCAGGCAGCGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGAGCAGCATTAGCCCGAGCGCGCCGATACCGATTAATGCAGATAGCGTGAAGAGCCGCTTACCATAGCCGCGATAACAGCAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGGAACGCACCATGGTGCAGCGCAGCCGCTATTATGGCATGGATGTGTGGGCCAGGGCACCCACCGTACCGTGAGCAGC</p>
G11-VI	42	DNA	<p>GATATTCAAGATGACCCAGAGGCCGGCGACCCCTGAGCCTGAGCGCGCGGGCGAACGCGCGACCCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCGTGAAGCAGCTATCTGGCGTGGTATCAGCAGCGCCTGGGCCAGAGGCCGGCGCCTGCTGATTTATGATGCGAGCAGCCCGCGACCCGGCATTCCGGCGCGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGGATTTACCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAAGATTTGCGACCTATTATTGCCAGCGAGCAGAGCTATAGCAACCTGGTACCTTGGCCAGGGCACCCGCTGGAAATTAAA</p>

10

20

30

40

50

M01 4- G02- Vh	43	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGCGGCTGGTG CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCCTGTATTATATGAAATGGG TGCGCCAGGCGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGA GCAGCATTAGCCCCAGCGGGCTTACCACTAGCCCGA CGGATAGCGTGAAGGCCGCTTACCACTAGCCCGA TAACAGCAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACAGC CTGCGCGCGAAGATAACCGCGGTGTATTATTGCGCG CGCGAATTGAAAACCGCGTATCATTATTATTATTATGG CATGGATGTGTGGGCCAGGGCACCAACCGTGACCGT GAGCAGC
M01 4- G02- VI	44	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCGTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGACCAATTACCTGCCGC GCGAGCCAGGATATTAACATTGGCTGGCGTGGTATC AGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATTA GCGCGCGAGCACCGTGCAGAGCGGGCGTGGCAGC CGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTACCG CTGACCATTAACACCCCTGCAGCCGGATGATTTGCGA CCTATTATTGCCAGCAGCGGGCAGCTTCCGCTGAC CTTGGCGCGGCCACCAAAGTGGAAATGAAA
M01 3- J04- Vh	45	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGCGGCTGGTG CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCACCTATAGCATGGGCTGG GTGCGCCAGGCGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCAGCATTAGCCCCAGCGGGCGGCGATACCGATTA TGCGGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCACTAGCCGC GATAACAGCAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGAAGATAACCGCGGTGTATTATTGCG CGCGCGAACGCACCATGGTGCACGATCCCGCGCTATT ATGGCATGGATGTGTGGGCCAGGGCACCAACCGTGA CCGTGAGCAGC
M01 3- J04- VI	46	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGGCGACCCCTGAGC CTGAGCCCAGGGCGAACCGCGCGACCCCTGAGCTGCCG CGCGAGCCAGAGCGTGAGCAGCTATCTGGCGTGGTA TCAGCAGCGCCTGGGCCAGAGCCCGCGCCTGCTGAT TTATGATGCGAGCAGCCCGCGCAGCGGCATTCCGGC GCGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTAC CCTGACCATTAAGCAGCCTGCAGCCGAAAGATTTGCG ACCTATTATTGCCAGCAGAGCTATAGCAACCTGGTGA CTTTGGCCAGGGCACCCGCGCTGGAAATTAAA

A10-Vh	47	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCCCTGGTGCAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCTGGTATCCGATGCAGTGGTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTAGCAGCAGCGGCCGGCACCTATTATCGGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGGCCGGAAAGATACCGCGGTGATTATTGCG CGCGCGATTGGGGCTATAGCAACTATGTGATGGATCTGGCCTGGATTATTGGGGCAGGGCACCCCTGGTAC CGTGAGCAGC</p>
A10-VI	48	DNA	<p>GATATTCAAGATGACCCAGAGGCCGGGACCCCTGAGCCTGAGCGCGCGGCCCTGAGCTGCGCGGC CGCGAGCCAGACCGTGAGCAGCAGCCTGGCGTGGTA TCAGCATAAACCGGGCCAGGCAGCCGCGCCTGCTGAT TTATGAAACCAGCAACCGCGCGACCCGGCATTCCGGC GCGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCCGGCACCGATTTCAC CCTGACCATTAGCAGCCTGGAAACCGGAAGATTTGCG GTGTATTATTGCCAGCATCGCAGCAACTGGCCGCCGA CCTTGCCCCGGGACCAAAGTGGATATTAAC</p>
M10-Vh	49	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCCCTGGTGCAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCTGGTATCCGATGCAGTGGTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTAGCAGCAGCGGCCGGCACCTATTATCGGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGGCCGGAAAGATACCGCGGTGATTATTGCG CGCGCGATTGGGGCTATAGCAACTATGTGATGGATCTGGCCTGGATTATTGGGGCAGGGCACCCCTGGTAC CGTGAGCAGC</p>
M10-VI	50	DNA	<p>GATATTCAAGATGACCCAGAGGCCGGGACCCCTGAGCCTGAGCGCGCGGCCCTGAGCTGCGCGGC CGCGAGCCAGACCGTGAGCAGCAGCCTGGCGTGGTA TCAGCATAAACCGGGCCAGGCAGCCGCGCCTGCTGAT TTATGAAACCAGCAACCGCGCGACCCGGCATTCCGGC GCGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCCGGCACCGATTTCAC CCTGACCATTAGCAGCCTGGAAACCGGAAGATTTGCG GTGTATTATTGCCAGCATCGCAGCAACTGGCCGCCGA CCTTGCCCCGGGACCAAAGTGGATATTAAC</p>

10

20

30

40

H15-Vh	51	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGCCCTGGTGCAGCCGGCGGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCACCTATAAGCATGGCTGGTGCGCCAGCGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGAGCAGCATTAGCCCAGCAGCGGGCGGATACCGATTA TGCGGATAGCGTGAAGAGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGCAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGGAACGCACCATGGTGCGCATCCCGCTATT ATGGCATGGATGTGTGGGCCAGGGCACCACCGTGA CCGTGAGCAGC</p>
H15-VI	52	DNA	<p>GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGGGACCCCTGAGCCTGAGCGCCGGCGAACCGCTGCGCG CGCGAGCCAGAGCGTGAAGCAGCTATCTGGCGTGGTA TCAGCAGCGCCTGGGCCAGAGCCCCGGCCTGCTGAT TTATGATGCGAGCAGCCGCGCAGCCGGCATTCCGGC GCGCTTAGCGGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTCAC CCTGACCATTAGCAGCCTGCAAGCCGGAAAGATTTGCG ACCTATTATTGCCAGCAGAGCTATAGCAACCTGGTGA CCTTGGCCAGGGCACCCGCTGGAAATTAAA</p>
F11-Vh	53	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGCCCTGGTGCAGCCGGCGGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCAACTATATGATGACCTGGTGCGCCAGCGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGAGCAGCATTATCCGAGCGCGGCTTACCCAGTAT GCGGATAGCGTGAAGAGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGCAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGACCTATTATTGCGCGCGCGATGCGAGCGATGTGTGGCTGCGCTTCGCG GCGCGGGCGCGTTGATATTGGGCCAGGGCACCA TGGTGACCGTGAGCAGC</p>
F11-VI	54	DNA	<p>GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGACCGCCTGAGCCTGAGCGCGTGGCGATCGCGTGGCGATTACCTGCCGC GCGAGCCAGAGCATTGATACCTATCTGAACCTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATTATGAGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCGTGCAGCG CTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTACCTTACCTTACCATAGCAGCCTGCAAGCCGGAAAGATATTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTTGATCTGCCGCTGACCTTGGCCAGGGCACCCGCGTGGATATTAAA</p>

10

20

30

40

50

K12-Vh	55	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCCGGCCTGGTGCAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCCGCTATATTATGCATTGGTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCCTGGAATGGGTGAGCAGCATTAGCCCAGCAGCGGCCCTGACCAAGCTATGCGGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGCAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGGAAGATACCGCGGTGATTATTGCGCGCGCGAATTGAAAACCGCGTATCATTATTATTATTGGCATGGATGTGTGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGAGCAGC 10</p>
K12-VI	56	DNA	<p>GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGAGCGTGGCGATCGCGTGAACCATACCTGCCGC GCGAGCGGGCGATATTGGCAACCGCGCTGGCTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGCGCCTGCTGATTAGCGATGCGAGCACCCCTGCAGAGCGCGCGTGCCGCTCGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGAATTACCTGACCGACATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAAGATTTGCGACCTTATTATTGCTGCAGGGCTATAACTATCCGCGCAC 20</p>
O15-Vh	57	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCCGGCCTGGTGCAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCCGCTATATTATGCATTGGTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCCTGGAATGGGTGAGCAGCATTAGCCCAGCAGCGGCCCTGACCAAGCTATGCGGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGCAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGGAAGATACCGCGGTGATTATTGCGCGCGCGAATTGAAAACCGCGTATCATTATTATTATTGGCATGGATGTGTGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGAGCAGC 30</p>
O15-VI	58	DNA	<p>GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGAGCGTGGCGATCGCGTGAACCATACCTGCCGC GCGAGCGGGCGATATTGGCAACCGCGCTGGCTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGCGCCTGCTGATTAGCGATGCGAGCACCCCTGCAGAGCGCGCGTGCCGCTCGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGAATTACCTGACCGACATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAAGATTTGCGACCTTATTATTGCTGCAGGGCTATAACTATCCGCGCAC 40</p>

A08-Vh	59	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCCCTGGT CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCGAATATGGCATATTGG GTGCGCCAGGCGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCTTATTAGCCCCAGCGCGGCCACCACCTTTAT GCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACTTAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACAG CCTGCGCGCGGAAGATAACCGCGGTGTATTATTGCGC GCGCGCGGGCAACTGGAACCATCGCCGCGC TGAACGATGCGTTGATATTGGGCCAGGGCACCAC GGTGACCGTGAGCAGC	10
A08-VI	60	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCATTACCATACCTGCCGC GCGAGCCAGGCATTGCGATGATTTGGCTGGTATC AGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGCGGCGAGCAGCCTGCAGAGCGGGGTGCCGAGCC GCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTACCC TGACCAATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTGCGAC CTATTATTGCCAGCAGAGCTATAGCACCCGCTGACC TTTGGCGCGGCACCAAAGTGGAAATTAAA	20
E12-Vh	61	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCCCTGGT CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCACCTATAGCATGGGCTGG GTGCGCCAGGCGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCAGCATTAGCCCCAGCGGGCGGCGATACCGATTA TGC GGATAGCGTGAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATAACCGCGGTGTATTATTGCG CGCGCGAACGCACCATGGTGC CGCAGTCCCGCGCTATT ATGGCATGGATGTGTGGGCCAGGGCACCACCGTGA CCGTGAGCAGC	30
E12-VI	62	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGGCGACCCCTGAGC CTGAGCCCAGGCAGCGCGACCCCTGAGCTGCCG CGCGAGCCAGAGCGTGAGCAGCTATCTGGCGTGGTA TCAGCAGCGCCTGGCCAGAGCCCCGCGCCTGCTGAT TTATGATGCGAGCAGCCGCGACCGGCAATTCCGGC GCGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCCACCGATTTAC CCTGACCAATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTGCG ACCTATTATTGCCAGCAGAGCTATAGCAACCTGGTGA CCTTGGCCAGGGCACCCGCTGGAAATTAAA	40

Y11 1W- Vh	63	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCCGGCCTGGTG CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCCAGTATGGCATGGATTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTGGCCGAGCGGCCAGCACCCTGTA TGCGGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGCAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGATTATTGCA CCCGCGGCCGGCCGTATTATTATGGCATGGATGT GTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC
Y11 1W- VI	64	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGAACATTACCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGAACCTGGTATC AGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGATGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCGTGCCTGAGCC CTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAAGATATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGGGAAACAGCTTCCGGTGACCTT TGGCGCGGGACCAAAGTGGAAATTAAA
N11 0D- S11 1N- Vh	65	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCCGGCCTGGTG CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCCAGTATGGCATGGATTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTGGCCGAGCGGCCAGCACCCTGTA TGCGGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGCAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGATTATTGCA CCCGCGGCCGGCCGTATTATTATGGCATGGATGT GTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC
N11 0D- S11 1N- VI	66	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGAACATTACCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGAACCTGGTATC AGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGATGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCGTGCCTGAGCC CTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAAGATATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGGGGATAACCTGCCGGTGACCTT TGGCGCGGGACCAAAGTGGAAATTAAA

10

20

30

40

Y10 9W- Vh	67	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGCCCTGGTG CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCCAGTATGGCATGGATTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTGGCCCAGCAGCGGCGGCAGCACCGTGT TGC GGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGC CGCGGAAAGATACCGCGGTGTATTATTGCA CCC CGGGCGGCCGTATTGGTATTATGGCATGGATGT GTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC</p>
Y10 9W- VI	68	DNA	<p>GATATT CAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGT GACCATTACCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGA ACTGGTATC AGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGATGC GAGCAACCTGGAAACCGGGCGT GCGGAGCC CTTAGCGGCAGCGGCAGCGG CACCGATTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAAGATATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGGGAAACAGCTTCCGGTGACCTT TGGCGGCGGCACCAAGTGGAAATTAAA</p>
Y11 0S- Vh	69	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGCCCTGGTG CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCCAGTATGGCATGGATTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTGGCCCAGCAGCGGCGGCAGCACCGTGT TGC GGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGC CGCGGAAAGATACCGCGGTGTATTATTGCA CCC CGGGCGGCCGTATTATAGCTATGGCATGGATGT GTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC</p>
Y11 0S- VI	70	DNA	<p>GATATT CAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGT GACCATTACCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGA ACTGGTATC AGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGATGC GAGCAACCTGGAAACCGGGCGT GCGGAGCC CTTAGCGGCAGCGGCAGCGG CACCGATTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAAGATATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGGGAAACAGCTTCCGGTGACCTT TGGCGGCGGCACCAAGTGGAAATTAAA</p>

10

20

30

40

S11 1N- F11 2L- Vh	71	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCCCTGGTG CAGCCGGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCCAGTATGGCATGGATTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTGGCCCAGCGGCAGCACCCTGTGA TGCGGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGCAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCA CCCGCGGCGGCCGTATTATTATTATGGCATGGATGT GTGGGGCCAGGGACCCACCGTGACCGTGAGCAGC
S11 1N- F11 2L- VI	72	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCGCCAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTACCCATTACCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGAACCTGGTATC AGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGATGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCGTGCAGCG CTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCGGAAGATATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGCGAACACCTGCCGGTGACCTT TGGCGCGGCCACCAAAGTGGAAATTAAA
P10 7G- Vh	73	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCCCTGGTG CAGCCGGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCCAGTATGGCATGGATTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTGGCCCAGCGGCAGCACCCTGTGA TGCGGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGCAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCA CCCGCGGCGGCCGTATTATTATTATGGCATGGATGT GTGGGGCCAGGGACCCACCGTGACCGTGAGCAGC
P10 7G- VI	74	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCGCCAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTACCCATTACCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGAACCTGGTATC AGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGATGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCGTGCAGCG CTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCGGAAGATATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGCGAACACGCTTCCGGTGACCTT TGGCGCGGCCACCAAAGTGGAAATTAAA

Y11 0R- Vh	75	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGCCCTGGT CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCCAGTATGGCATGGATTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTGGCCCAGCGGCCAGCACCGTGT TGCGGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTATTATTGCA CCCGCGGCGGCCGTATTATGGCATGGATG TGTGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC
Y11 0R- VI	76	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGAACCTGGTATC AGCAGAAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGATGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCGTGCAGGCC CTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCCACCGATTTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCGGAAGATATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGCGAACAGCTTCCGGTGACCTT TGGCGCGGCCACCAAAGTGGAAATTAAA
Y11 0W- Vh	77	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGCCCTGGT CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCCAGTATGGCATGGATTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTGGCCCAGCGGCCAGCACCGTGT TGCGGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTATTATTGCA CCCGCGGCGGCCGTATTATGGCATGGATG GTGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC
Y11 0W- VI	78	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGAACCTGGTATC AGCAGAAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGATGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCGTGCAGGCC CTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCCACCGATTTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCGGAAGATATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGCGAACAGCTTCCGGTGACCTT TGGCGCGGCCACCAAAGTGGAAATTAAA

10

20

30

40

Y11 0N- Vh	79	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGCGGCTGGTG CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCCAGTATGGCATGGATTGG GTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTGGCCCAGCAGCGGGCAGCACCGTGT TGCAGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCA CCCGCGGCGGCCGTATTATAACTATGGCATGGATGT GTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC 10
Y11 0N- VI	80	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGCACCATACCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGAACCTGGTATC AGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATTAA TGATGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCGTGCAGGCC CTTAGCGGCAGCGGGCAGCGGCACCGATTTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAAGATATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGCGAACAGCTTCCGGTGACCTT TGGCGCGGGCACCAAAGTGGAAATTAAA 20
Y11 1Q- Vh	81	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGCGGCTGGTG CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCCAGTATGGCATGGATTGG GTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTGGCCCAGCAGCGGGCAGCACCGTGT TGCAGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCA CCCGCGGCGGCCGTATTATTACAGGGCATGGATGT GTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC 30
Y11 1Q- VI	82	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGCACCATACCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGAACCTGGTATC AGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATTAA TGATGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCGTGCAGGCC CTTAGCGGCAGCGGGCAGCGGCACCGATTTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAAGATATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGCGAACAGCTTCCGGTGACCTT TGGCGCGGGCACCAAAGTGGAAATTAAA 40

Y11 1K- Vh	83	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCCCTGGTG CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCCAGTATGGCATGGATTGG GTGCGCCAGGCAGGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTGGCCCAGCGGGCAGCACCGTGTA TGCGGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATAACCGCGGTGTATTATTGCA CCCGCGGCGGCCCGTATTATTATAAAGGCATGGATGT GTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC
Y11 1K- VI	84	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCGCCAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTACCATCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGAACGGTATC AGCAGAAACCAGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGATGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCGTGCAGCG CTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCGGAAGATAATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGCGAACAGCTTCCGGTGACCTT TGGCGCGGCCACCAAAGTGGAAATTAAA
Y11 1V- Vh	85	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCCCTGGTG CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCCAGTATGGCATGGATTGG GTGCGCCAGGCAGGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTGGCCCAGCGGGCAGCACCGTGTA TGCGGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATAACCGCGGTGTATTATTGCA CCCGCGGCGGCCCGTATTATTATGTGGGCATGGATGT GTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC
Y11 1V- VI	86	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCGCCAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTACCATCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGAACGGTATC AGCAGAAACCAGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGATGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCGTGCAGCG CTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCGGAAGATAATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGCGAACAGCTTCCGGTGACCTT TGGCGCGGCCACCAAAGTGGAAATTAAA

Y11 0A- Vh	87	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGCGGCCTGGTG CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCCAGTATGGCATGGATTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCGGCATTGGCCCAGCAGCGGCGAGCACCGTGT TGCAGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCA CCCGCGGCGGCCGTATTATGCGTATGGCATGGATG TGTGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC</p>
Y11 0A- VI	88	DNA	<p>GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGAACCTACCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGAACCTGGTATC AGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGATGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCGTGCAGGCC CTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTACCTTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCGGAAGATATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGCGAACAGCTTCCGGTGACCTT TGGCGCGGCCACCAAAGTGGAAATTAAA</p>
M00 1- G16- Vh	89	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGCGGCCTGGTG CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC GAGCGGCTTACCTTAGCACCTATTGGATGACCTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCAGCATTGGAGCAGCGGGCGTGGACCCCTGT TGCAGATAGCGTAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTATTATTGCG CGCGCGAACGTGGCGCGGGCGTTGCGTTGATA TTTGGGCCAGGGCACCATGGTGACCGTGAGCAGC</p>
M00 1- G16- VI	90	DNA	<p>GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGAACCTACCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCAACTATCTGAACCTGGTATC AGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGATGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCGTGCAGGCC CTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTACCTTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCGGAAGATATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGCGAACAGCAGCACCCGCTGACCTT TGGCGCGGCCACCAAATGGAAATTAAA</p>

M00 1- J11- Vh	91	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGCCTGGTG CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCACCTATGAAATGAAGTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCTGGATTGGCCCAGCAGCGGGCTTACCTTTAT GCAGGATAGCGTGAAAGGCCCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCG CGAAAGATAAAGCGGTGGCGGGCATGGCGAAGCGT TTGATATTGGGCCAGGGCACCATGGTGACCGTGA GCAGC	10
M00 1- J11- VI	92	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGCACCATACCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTAGCATTATCTGAACCTGGTATC AGCAGAAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGATGCGAGCAACGTGGAAACCGGGCGTGCAGCCG CTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAAGATATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGTTTATAACCTGCCGCTGACCTT GGCGCGGCACCAAAGTGGAAATTAAA	20
M02 8- H17- Vh	93	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGCCTGGTG CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCGATTATGAAATGGCGTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCAGCATTGTGCCAGCGGGCGTGGACCCCTGTA TGCGGATAGCGTGAAAGGCCCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCG CGACCTGGGGCGATAGCTGGGCTTGATTGGGG GCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC	30
M02 8- H17- VI	94	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCAGCAGCGTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGCACCATACCTGCCAG GCGAGCCAGGGCATTAGCAGCTGGCTGGCGTGGTAT CAGCAGCGCCGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TATGATGCGAGCACCCCTGCAGAGCGCGTGCAGC CGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTACC CTGACCAATTAAACAGCCTGCAGCCGGAAAACCTTGCGA CCTATTATTGCCAGCAGCGGATAGCTTCCGATTGC GTTTGGCCAGGGCACCCGCCTGGAAATTAAA	40

M06 7- F04- Vh	95	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCCCTGGT CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCCGTATGATATGTATTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCTATATTGGAGCAGCGCGCATTACCCAGTAT GCGGATAGCGTGAAAGGCCCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGAAGATAACCGCGGTGATTATTGCG CGCGCCATGCGAGCTATTATGATAGCAGCGGCCGCC CGGATGCGTTGATATTGGGCCAGGGCACCATGGT GACCGTGAGCAGC
M06 7- F04- VI	96	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCGC GCGAGCCAGAGCATTAGCAGCTATGTGAACCTGGTATC AGCAGAAAACCGGGCAAAGCGCCGAACCTGCTGATT TGCAGCGAGCAGCCTGGAAAGCGGGCTGCGAGCC GCTTAGCGGCAGCGGAGCGGGCACCGATTACCC TGACCAATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAAGATTGCGAC CTATTATTGCCAGCAGAGCTATAGCACCCGTATACC TTTGGCCAGGGCACCAAACCTGGATATTAAA
M06 7- C04- Vh	97	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCCCTGGT CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCCATTATAGCATGCAGTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCAGCATTAGCCCGAGCGGGCTATACCATGTAT GCGGATAGCGTGAAAGGCCCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGAAGATAACCGCGATGTATTATTGCG CGCGCAGAAACAGCGAGCGATCTGAGCGGCCACCTATA GCGAAGCGCTGGATTATTGGGCCAGGGCACCTGG TGACCGTGAGCAGC
M06 7- C04- VI	98	DNA	GATATTCAAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCAG GCGAGCCAGGATATTGATTATTCTGAACCTGGTATCA GCAGCAGCCCCGCAAAGCGCCGCAGCTGCTGATT TGATGCGAGCAACCTGGAAACCGGGCTGCCAGCCG CTTAGCGGCAGCGGAGCGGGCACCGATTACCTT ACCATTAGCAGCCTGCATCCGGAAAGATTGCGACCT ATTATTGCCAGCAGTATCATAACCTGCCGCCCTGAC CTTGGCGGCCAGCAAAGTGGATATTAAA

M07 1- F17- Vh	99	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCCGGCCTGGTG CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCCGTATTGGATGCATTGG GTGCGCCAGGCGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCAGCATTATAGCAGCGGCTGGACCGATTAT GCGGATAGCGTAAAGGCCGTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCG CGCGCGAAGGCCTGGCGGGCACCAACGATGCGTTG ATATTGGGCCAGGGCACCATGGTACCGTGAGCA GC</p>	10
M07 1- F17- VI	100	DNA	<p>GATATTCAAGATGACCCAGAGGCCGCTGAGCCTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCGC GCGAGCCAGAGCATTAGCAGCTATCTGAACCTGGTATC AGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TGCGCGAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTGCAGGCC GCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTACCC TGACCAATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAAGATTTGCGAC CTATTATTGCCAGCAGAGCTATAGCACCCGCCGTGG ACCTTG GCCAGGGCACCAAAGTGGAAATTAAA</p>	20
H17- R47 K-Vh	101	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCCGGCCTGGTG CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCGATTATGAAATGGCGTGG GTGCGCCAGGCGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCAGCATTGTGCCAGCGGCGTGGACCCCTGTA TGCGGATAGCGTAAAGGCCGTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCG CGACCTGGGCCGATAGCTGGGCTTGATTGGGG GCCAGGGCACCCCTGGTACCGTGAGCAGC</p>	30
H17- R47 K-VI	102	DNA	<p>GATATTCAAGATGACCCAGAGGCCGAGCAGCGTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCGC GCGAGCCAGGGCATTAGCAGCTGGCTGGCGTGGTAT CAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT ATGATGCGAGCACCCTGCAGAGCGGCGTGCAGGCC GCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTACCC TGACCAATTACAGCCTGCAGCCGGAAAAGCTTGCGAC CTATTATTGCCAGCAGGGAGATAGCTTCCGATTGCG TTTGGGCCAGGGCACCCGCCCTGGAAATTAAA</p>	40

H17-T69 S-Vh	103	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCCGGCCTGGT CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCGATTATGAAATGGCGTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCAGCATTGTGCCGAGCGGCCGGCTGGACCCCTGTA TGCGGATAGCGTCAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCG CGACCTGGGGCGATAGCTGGGGCTTGATTGGGG GCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC 10
H17-T69 S-VI	104	DNA	GATATTCA GATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCGTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCGC GCGAGCCAGGGCATTAGCAGCTGGCTGGCGTGGTAT CAGCAGCGCCCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TATGATGCGAGCAGCCTGCAGAGCGCGTGCGCAGC CGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTACCG CTGACCATTAAACAGCCTGCAGCCGGAAAGATTTCG CCTATTATTGCCAGCAGCGGATAGCTTTCCGATTGC 20
H17-N10 0D-Vh	105	DNA	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCCGGCCTGGT CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCGATTATGAAATGGCGTGG GTGCGCCAGGCAGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCAGCATTGTGCCGAGCGGCCGGCTGGACCCCTGTA TGCGGATAGCGTCAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCG CGACCTGGGGCGATAGCTGGGGCTTGATTGGGG GCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC 30
H17-N10 0D-VI	106	DNA	GATATTCA GATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCGTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCGC GCGAGCCAGGGCATTAGCAGCTGGCTGGCGTGGTAT CAGCAGCGCCCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TATGATGCGAGCAGCCTGCAGAGCGCGTGCGCAGC CGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTACCG CTGACCATTAAACAGCCTGCAGCCGGAAAGATTTCG CCTATTATTGCCAGCAGCGGATAGCTTTCCGATTGC 40

H17-A11 5T-Vh	107	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCCGGCCTGGTG CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCGATTATGAAATGGCGTGG GTGCGCCAGGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCAGCATTGTGCCGAGCGGCCGGCTGGACCTGTA TGC GGATAGCGTGAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGCAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATAACCGCGGTGTATTATTGCG CGACCTGGGGCGATAGCTGGGGCTTGATTTGGG GCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC</p>	10
H17-A11 5T-VI	108	DNA	<p>GATATTCA GATGACCCAGAGCGCCGAGCAGCGTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGT GACCATTACCTGCCGC GCGAGCCAGGGCATTAGCAGCTGGCTGGCGTGGTAT CAGCAGCGCCGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT TATGATGCGAGCACCCTGCAGAGCGGCCGTGCCGAGC CGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATT TACC CTGACCATTAACAGCCTGCAGCCGGAAAACTTGC CCTATTATTGCCAGCAGGCCGGATAGCTTCCGATTAC CTTGGCCAGGGCACCCGCCTGGAAATTAAA</p>	20
H17-R47 K-Vh	109	DNA	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCCGGCCTGGTG CAGCCGGCGGCAGCCTGCGCTGAGCTGCGCGC GAGCGGCTTACCTTAGCGATTATGAAATGGCGTGG GTGCGCCAGGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGGT GAGCAGCATTGTGCCGAGCGGCCGGCTGGACCTGTA TGC GGATAGCGTGAAAGGCCGCTTACCATAGCCGC GATAACAGCAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATAACCGCGGTGTATTATTGCG CGACCTGGGGCGATAGCTGGGGCTTGATTTGGG GCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC</p>	30
H17-R47 K-VI	110	DNA	<p>GATATTCA GATGACCCAGAGCGCCGAGCAGCGTGAGC GCGAGCGTGGCGATCGCGT GACCATTACCTGCCGC GCGAGCCAGGGCATTAGCAGCTGGCTGGCGTGGTAT CAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATT ATGATGCGAGCACCCTGCAGAGCGGCCGTGCCGAGC GCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATT TACC TGACCATTAACAGCCTGCAGCCGGAAAGATT TGC CTATTATTGCCAGCAGGCCGGATAGCTTCCGATTGCG TTTGGCCAGGGCACCCGCCTGGAAATTAAA</p>	40
M00 9-G02-Vh	111	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYIMHWVR QAPGKGLEWVSSISPSSGLTSYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFENAYHYYYYGMDV WGQGTTVTVSS	

M00 9- G02- VI	112	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASGDIGNALGWYQQ KPGKAPRLLISDASTLQSGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSL QPEDFATYYCLQGYNPRTFGQGTKLEIR	
G16- Vh	113	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYPMQWV RQAPGKGLEWVSGISSSGGTYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGYSNYMDLGLD YWGQGTLTVSS	10
G16- VI	114	PRT	DIQMTQSPATLSLSAGERATLSCRASQTVSSLAWYQH KPGQAPRLLIYETSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYCQHRSNWPPTFGPGTKVDIK	
G11- Vh	115	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMGWV RQAPGKGLEWVSSISPSGGTDYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERTMVRDPRYYGMD VWGQGTTTVSS	20
G11- VI	116	PRT	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYAWYQQ RLGQSPRLLIYDASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSYSNLVTFGQGTRLEIK	
M01 4- G02- Vh	117	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLYMKWVR QAPGKGLEWVSSISPSGGFTSYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFENAYHYYYYGMDV WGQGTTTVSS	30
M01 4- G02- VI	118	PRT	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITCRASQDINIWLAWYQQK PGKAPKLLISAATVQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINTLQ PDDFATYYCQQAASFPLTFGGGTKEVK	
M01 3- J04- Vh	119	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMGWV RQAPGKGLEWVSSISPSGGTDYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERTMVRDPRYYGMD VWGQGTTTVSS	40
M01 3- J04- VI	120	PRT	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYAWYQQ RLGQSPRLLIYDASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL QPKDFATYYCQQSYSNLVTFGQGTRLEIK	

A10-Vh	121	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYPMQWVRQAPGKGLEVSGISSLGGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGYSNYVMDLGLD YWGQGTLTVSS	
A10-VI	122	PRT	DIQMTQSPATLSLSAGERATLSCRASQTVSSSLAWYQHKPGQAPRLLIYETSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYCQHRSNWPPTFGPGTKVDIK	10
M10-Vh	123	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYPMQWVRQAPGKGLEVSGISSLGGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGYSNYVMDLGLD YWGQGTLTVSS	
M10-VI	124	PRT	DIQMTQSPATLSLSAGERATLSCRASQTVSSSLAWYQHKPGQAPRLLIYETSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYCQHRSNWPPTFGPGTKVDIK	20
H15-Vh	125	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMGWVRQAPGKGLEVSSISPSGGTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERTMVRDPRYYGMD VWGQGTTTVSS	
H15-VI	126	PRT	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQRLGQSPRLLIYDASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSYSNLVTFGQQGTRLEIK	30
F11-Vh	127	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMMTWVRQAPGKGLEVSGIYPSGGFTQYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARDASDVWLRFRGGGAF DIWGQGTMVTVSS	
F11-VI	128	PRT	DIQMTQSPTSLASVGDRVAITCRASQSIDTYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQFDDLPLTFGPGTRVDIK	40

K12-Vh	129	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYIMHWVR QAPGKGLEWVSSISPSGGLTSYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFENAYHYYYYGMDV WGQGTTTVSS	
K12-VI	130	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASGDIGNALGWYQQ KPGKAPRLLISDASTLQSGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSL QPEDFATYYCLQGYNYPRTFGQGTKEIR	10
O15-Vh	131	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYIMHWVR QAPGKGLEWVSSISPSGGLTSYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFENAYHYYYYGMDV WGQGTTTVSS	
O15-VI	132	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASGDIGNALGWYQQ KPGKAPRLLISDASTLQSGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSL QPEDFATYYCLQGYNYPRTFGQGTKEIR	20
A08-Vh	133	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEYGMWVR QAPGKGLEWVFSFISPSGGTTFYADSVKGRFTISRDNFKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGGNWNHRRALNDAFDI WGQGTMVTVSS	
A08-VI	134	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQAIRDDFGWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKEIK	30
E12-Vh	135	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMGWV RQAPGKGLEWVSSISPSGGDTDYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERTMVRDPRYYGMD VWGQGTTTVSS	
E12-VI	136	PRT	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ RLGQSPRLLIYDASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSYNSLVTFGQGTREIK	40

Y11 1W- Vh	137	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMDWV RQAPGKGLEWVGIGPSGGSTVYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGGPYYYWGMDVWG QGTTVTVSS	
Y11 1W- VI	138	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSQGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQANSFPVTFGGGTKVEIK	10
N11 0D- S11 1N- Vh	139	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMDWV RQAPGKGLEWVGIGPSGGSTVYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGGPYYYWGMDVWGQ GTTVTVSS	
N11 0D- S11 1N- VI	140	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSQGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQADNLPVTFGGGTKVEIK	20
Y10 9W- Vh	141	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMDWV RQAPGKGLEWVGIGPSGGSTVYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGGPYWYYWGMDVWG QGTTVTVSS	
Y10 9W- VI	142	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSQGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQANSFPVTFGGGTKVEIK	30
Y11 0S- Vh	143	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMDWV RQAPGKGLEWVGIGPSGGSTVYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGGPYYSYGMDVWGQ GTTVTVSS	40
Y11 0S- VI	144	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSQGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQANSFPVTFGGGTKVEIK	

S11 1N- F11 2L- Vh	145	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMDWV RQAPGKGLEWVGIGPSGGSTVYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGGPYYYYGMDVWGQ GTTTVSS
S11 1N- F11 2L- VI	146	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQANNLPVTFGGGTKVEIK
P10 7G- Vh	147	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMDWV RQAPGKGLEWVGIGPSGGSTVYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGGGYYYYGMDVWGQ GTTTVSS
P10 7G- VI	148	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQANSFPVTFGGGTKVEIK
Y11 0R- Vh	149	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMDWV RQAPGKGLEWVGIGPSGGSTVYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGGPYYRYGMDVWGQ GTTTVSS
Y11 0R- VI	150	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQANSFPVTFGGGTKVEIK
Y11 0W- Vh	151	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMDWV RQAPGKGLEWVGIGPSGGSTVYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGGPYYWYGMDVWG QGTTTVSS
Y11 0W- VI	152	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQANSFPVTFGGGTKVEIK

Y11 0N- Vh	153	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMDWV RQAPGKGLEWVGIGPSGGSTVYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGGPYYNYGMDVWGQ GTTTVSS	
Y11 0N- VI	154	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSQGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQANSFPVTFGGGTKVEIK	10
Y11 1Q- Vh	155	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMDWV RQAPGKGLEWVGIGPSGGSTVYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGGPYYQGMDVWGQ GTTTVSS	
Y11 1Q- VI	156	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSQGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQANSFPVTFGGGTKVEIK	20
Y11 1K- Vh	157	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMDWV RQAPGKGLEWVGIGPSGGSTVYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGGPYYKGMDVWGQ GTTTVSS	
Y11 1K- VI	158	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSQGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQANSFPVTFGGGTKVEIK	30
Y11 1V- Vh	159	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMDWV RQAPGKGLEWVGIGPSGGSTVYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGGPYYVGMDVWGQ GTTTVSS	40
Y11 1V- VI	160	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSQGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQANSFPVTFGGGTKVEIK	

Y11 0A- Vh	161	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMDWV RQAPGKGLEWVSGIGPSGGSTVYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGGPYYAYGMDVWGQ GTTVTVSS
Y11 0A- VI	162	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSFGSGSGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQANSFPVTFGGGTKVEIK
M00 1- G16- Vh	163	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYWMTWV RQAPGKGLEWVSSIWSSGGWTLYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGAAGFAFDIWGQG TMVTVSS
M00 1- G16- VI	164	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSFGSGSGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQSSSTPLTFGGGKMEIK
M00 1- J11- Vh	165	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYEMNWV RQAPGKGLEWVSWIGPSGGFTFYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDKAVAGMGEAFDIWG QGTMVTVSS
M00 1- J11- VI	166	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISIYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSFGSGSGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQFYNLPLTFGGGKMEIK
M02 8- H17- Vh	167	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMA RQAPGKGLEWVSSIVPSGGWTLYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATWGDSWGDFWGQGT LTVSS
M02 8- H17- VI	168	PRT	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ RPGKAPKLLIYDASTLQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTINS QOPENFATYYCQQQADSFPIAFGQGTRLEIK

M06 7- F04- Vh	169	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYDMYWV RQAPGKGLEWVSYIWSSGGITQYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHASYYDSSGRPDAFD IWGQGTMVTVSS	
M06 7- F04- VI	170	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYVNWYQQK PGKAPNLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLDIK	10
M06 7- C04- Vh	171	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYSMQWV RQAPGKGLEWSSISPSSGGITMYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCAREKASDLSGTYSEALD YWGQGTLVTVSS	
M06 7- C04- VI	172	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCQASQDIDYYLNWYQQ QPGKAPQLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSL HPEDFATYYCQQYHTLPPLTFGGGTKVDIK	20
M07 1- F17- Vh	173	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYWMHWV RQAPGKGLEVVSSIYSSGGWTDYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGVAGTNDAFDIWGQ GTMVTVSS	
M07 1- F17- VI	174	PRT	DIQMTQSPLSLSASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQSYSTPPWTFGQGTKVEI	30
H17- R47 K-Vh	175	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMA RQAPGKGLEWSSIVPSGGWTLYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATWGDSWGDFWGQGT LTVSS	40
H17- R47 K-VI	176	PRT	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYDASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINS QOPENFATYYCQQQADSFPIAFGQGTRLEIK	

H17-T69 S-Vh	177	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMAWV RQAPGKGLEWVSSIVPSGGWTLYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATWGDSWGFDFWGQGT LTVSS	
H17-T69 S-VI	178	PRT	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITCRASQGISSWLAWYQQ RPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINS QOPENFATYYCQQQADSFPIAFGQGTRLEIK	10
H17-N10 0D-Vh	179	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMAWV RQAPGKGLEWVSSIVPSGGWTLYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATWGDSWGFDFWGQGT LTVSS	
H17-N10 0D-VI	180	PRT	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITCRASQGISSWLAWYQQ RPGKAPKLLIYDASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINS QPEDFATYYCQQQADSFPIAFGQGTRLEIK	20
H17-A11 5T-Vh	181	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMAWV RQAPGKGLEWVSSIVPSGGWTLYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATWGDSWGFDFWGQGT LTVSS	
H17-A11 5T-VI	182	PRT	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITCRASQGISSWLAWYQQ RPGKAPKLLIYDASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINS QOPENFATYYCQQQADSFPIFGQGTRLEIK	30
H17-R47 K-Vh	183	PRT	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMAWV RQAPGKGLEWVSSIVPSGGWTLYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATWGDSWGFDFWGQGT LTVSS	
H17-R47 K-VI	184	PRT	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITCRASQGISSWLAWYQQ RPGKAPKLLIYDASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINS QPEDFATYYCQQQADSFPIAFGQGTRLEIK	40

【 0 1 1 1 】

実施例 4 : F X I a 抗体の抗凝固活性の決定

流動条件下の血小板活性化の測定のために、ガラススライド (Menzel - Glass)

er SUPERFROST 76 x 26 mm ; Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Germany) をコラーゲン (150 µg / ml) で 4 で一晩被覆し、ついで BSA (5 mg / ml) でブロッキングした後、Zeiss Axiovert 135 顕微鏡 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) のステージ上の流動系内に組み入れた。クエン酸添加全血を GPRP (最終的に 3 mM) およびビヒクルまたは FXI 抗体と共に 37 度 10 分間インキュベートした。CaCl₂ (5 mM) の添加後、直ちに血液を 1000 秒⁻¹ の初期せん断速度で 5 分間にわたってコラーゲン被覆スライド上で灌流させた。前記のとおりの全血の灌流の後、それぞれ 1 分の時点でチャンバー後全血をクエン酸ナトリウム (1 : 10 vol / vol) 中に集めた。チャンバー前血液もサンプル採取し、陽性対照 (10 µg / ml) としての TRAP 6 の存在下または非存在下で 5 分間処理した。 10

【0112】

チャンバー前および後血液サンプルを Cell Wash (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) 中で希釈し、抗体と共に 4 度 20 分間インキュベートした。氷冷 Cell Wash を加えることにより抗体反応を停止させ、測定まで全サンプルを氷上で維持した。10000 個の単一血小板を FITC コンジュゲート化血小板マーカー (CD41a または CD61a) の陽性性およびフローサイトメトリー (FACSCalibur; BD Biosciences, Heidelberg, Germany) による特徴的光散乱パターンで決定した。CD62P 発現に関しては、単一血小板を、未標識対象サンプルで妥当性評価された PE-CD62P 蛍光閾値を用いて別の散乱プロットへゲートした。該閾値を超える血小板集団を活性化体とみなし、定量化した。血小板微小凝集は前方散乱 (FSC) および FITC - 蛍光に関する任意閾値で定められた。 20

【0113】

実施例 5 : ウサギにおける FeCl₂ 誘発性血栓および耳出血時間
076D-M007-H04、076D-M007-H04-CDRL3-N110D および 076D-M028-H17 の抗血栓活性を動脈血栓症モデルにおいて決定した。076D-M007-H04 (0.5 mg / kg, 1 mg / kg, 2 mg / kg)、076D-M007-H04-CDRL3-N110D (0.1 mg / kg, 0.3 mg / kg, 1 mg / kg) または 076D-M028-H17 (0.075 mg / kg, 0.15 mg / kg, 0.3 mg / kg) の静脈内ボーラス投与の 15 分後に、ウサギにおける塩化第二鉄による頸動脈の化学的損傷により血栓症を誘発させた。雄ウサギ (Cr1 : KBL (NZW) BR, Charles River) を、筋肉内注射により投与されたキシラジンとケタミンとの混合物 (ロンブン (Rompun), Bayer 5 mg / kg およびケタベット (Ketavet) Pharmacia & Upjohn GmbH, 40 mg / kg 体重) で麻酔した。右耳の縁静脈における該麻酔混合物の注入により、補足的麻酔薬を投与した。右総頸動脈の露出の後、血流が影響を受けないように、該右総頸動脈下の Parafilm (登録商標) (25 mm x 12 mm) の細片上に 1 枚の吸収紙 (10 mm x 10 mm) を配置することにより、血管損傷を引き起こさせた。該吸収紙を 100 µl の FeCl₂ (塩化鉄 (II) 四水和物、13% (A. dis 中)、Sigma) で飽和させた。5 分後、濾紙を除去し、該血管を 0.9% NaCl で 2 回洗浄した。該損傷の 30 分後、該頸動脈を除去し、血栓を取り出し、直ちに秤量した。各群に 5 ~ 7 匹の動物を使用した。該 FeCl₂ 損傷の 2 分後に耳出血時間を決定した。左耳を剃毛し、標準化された切開 (長さ 3 mm) を、耳の長軸に平行に、外科用ブレード (番号 10 - 150 - 10, Martin, Tuttlingen, Germany) で行った。視認可能な血管の損傷を避けるように注意した。該創傷との接触を注意深く避けながら、切開部位を 30 秒間隔で濾紙で吸収した。血液がもはや該濾紙に染みなくなるまでの該切開からの時間を測定することにより、出血時間を決定した。 30

【0114】

実施例 6 : ウサギにおける FeCl₂ 誘発性血栓症および耳出血時間の決定 50

図14に示されているとおり、076D-M007-H04は血栓重量を用量依存的に減少させ、耳出血時間を延長させない。図15は、耳出血時間の増加を伴わない076D-M007-H04-CDRL3-N110Dの抗血栓効果を示す。図16においては、076D-M028-H17の抗血栓効果および出血時間の非延長が示されている。

【0115】

実施例7：Fab 076D-M007-H04：FXIa複合体の複合体形成、結晶化およびX線構造決定

複合体形成および結晶化

FXIa C500S(アミノ酸388-625)がProteros Biostructuresにより購入された。精製されたFab 076D-M007-H04をFXIa C500Sと1:1の比で混合した。複合体形成を可能にするために、該溶液を氷上で18時間保存した。該複合体溶液をSuperdex 200 HR 16/60カラム上にローディングし、20mM Tris/HCl(pH 7.5)および75mM NaCl中の20mg/mlの最終濃度まで更に濃縮した。Fab 076D-M007-H04とFXIa C500Sとを含むタンパク質複合体の結晶を、シッティング・ドロップ(sitting-drop)法を用いて、20で成長させ、等体積のタンパク質複合体溶液およびウェル溶液(100mM TRIS pH 8.25, 0.05% PEG 20000)および沈殿剤としての2.4M NH₄SO₄を混合することにより結晶化させた。約5日後にロゼット様結晶が出現した。

【0116】

データ収集および処理

低温バッファーを使用することなく液体窒素中で結晶を急速冷凍した。MAR CCD検出器でビームライン(beamline)BL14.1, BESSYシンクロトロン(Berlin)において結晶のデータを集めた。データを索引生成させ、XDS(Kabsch, W. (2010) Acta Cryst. D66, 125-132)で統合させ、POINTLESSでのスケーリングのために調製し、SCALA(P. R. Evans, (2005) Acta Cryst. D62, 72-82)でスケーリングした。該結晶は2.7オングストロームまで回折し、非対称単位内に1個のFab 076D-M007-H04:FXIa C500S複合体および格子定数a = 61.9, b = 70.7, c = 185.9を有する斜方晶空間群P2(1)22(1)を有する。

【0117】

構造決定および精密化

FXIaおよびモノクローナル抗体Fab 076D-M007-H04の複合体構造を種々の工程の分子置換により解析した。まず、検索モデルとしてpdbコード3GJEを用いて、BALBES(F. Long, A. Vagin, P. YoungおよびG. N. Murshudov(2008)Acta Cryst. D64, 125-132)を使用して、H鎖を配置した。ついで、検索モデルとして内部FXIa結晶構造を用いて、プログラムMolRepを使用して、FXIa C500Sを加えた。REFMAC5.5(G. N. Murshudovら(1997)Acta Cryst. D53, 240-255)での初期精密化はR1 = 39.4%およびRfree = 44.1%を与えた。最後に、検索モデルとしてのpdbエントリー3IDXのL鎖、ならびに初期精密化H鎖およびFXIa C500S溶液の固定座標を使用して、H鎖を配置した。反復ラウンドのCOOT(P. Emsleyら(2010)Acta Cryst. D66:486-501)でのモデル構築およびREFMAC5.5を使用する最尤精密化により該モデルを完成させた。データセットおよび精密化統計を表10に要約する。

10

20

30

40

【表 10】

表 10: Fab 076D-M007-H04:FXIa 複合体に関するデータセットおよび精密化統計

波長	0.91823 Å	
分解能(最高殻)	33.03-2.70 (2.84-2.70) Å	
反射(観測/ユニーク)	110602 / 16132	
完全性 ^a	99.8% (99.15%)	10
I/s ^a	5.61 (1.79)	
R _{merge} ^{a,b}	0.12 (0.43)	
空間群	P2(1)22(1)	
単位格子パラメータ		
<i>a</i>	61.94 Å	
<i>b</i>	87.68 Å	
<i>c</i>	185.89 Å	
R _{cryst} ^c	0.228	
R _{free} ^d	0.305	20
ウィルソン温度係数	51.7 Å ²	
RMSD結合長 ^e	0.022 Å	
RMSD結合角	1.95°	
タンパク質原子	5042	
水及び溶媒分子	34	
^a 括弧内の値は高分解能殻に関するものである。		
^b $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} I_{\text{hkl}} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle / \sum_{\text{hkl}} \langle I_{\text{hkl}} \rangle$; ここで、 I_{hkl} は反射 hkl の強度であり、 $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ は複数の観測の平均強度である。		
^c $R_{\text{cryst}} = \sum F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}} / \sum F_{\text{obs}}$; ここで、 F_{obs} 及び F_{calc} は、それぞれ、観測及び計算構造因子振幅である。		
^d 5% テストセット		
^e RMSD, 理想的な立体化学に関するパラメータセットからの根平均二乗偏差		

【0118】

実施例 8 : X 線構造に基づくエピトープマッピング

F a b 0 7 6 D - M 0 0 7 - H 0 4 と F X I a C 5 0 0 S との複合体 (図 17) は非対称単位当たりに 1 コピーの該複合体として結晶化した。F X I a C 5 0 0 S (エピトープ) と接触している F a b 0 7 6 D - M 0 0 7 - H 0 4 (パラトープ) の残基を決定し、表 X a および X b に示す。C C P 4 プログラム A R E A I M O L (P. J. B r i g g s (2 0 0 0) C C P 4 N e w s l e t t e r N o . 3 8) を使用して、埋もれた表面、ならびにそれぞれ、結合 F a b 0 7 6 D - M 0 0 7 - H 0 4 (表 11 a) および F X I a C 5 0 0 S の存在下および非存在下で計算された総エリア相違 (t o t a l area difference) を示す残基を分析した。

30

40

【表 11】

表 11a: Fab 076D-M007-H04 に接触している FXIa の残基

エピトープ:

残基番号	エリア相違
HIS A 406	-8.30
PRO A 410	-55.30
THR A 411	-60.10
GLN A 412	-2.10
ARG A 413	-35.60
HIS A 414	-4.00
ASN A 450	-12.40
GLN A 451	-26.90
SER A 452	-48.20
ILE A 454	-1.50
LYS A 455	-32.40
ARG A 522	-29.90
LYS A 523	-53.00
LEU A 524	-105.20
ARG A 525	-171.10
ASP A 526	-6.20
LYS A 527	-120.10
ILE A 528	-28.60
GLN A 529	-41.30
ASN A 530	-58.50
THR A 531	-6.30

10

20

表 11b: FXIa に接触している Fab 076D-M007-H04 の残基

パラトープ:

残基番号	エリア相違
SER L 32	-4.50
ASN L 33	-15.90
TYR L 34	-87.20
TYR L 51	-21.80
ASP L 52	-18.30
ASN L 55	-38.10
THR L 58	-33.50
ALA L 93	-12.50
ASN L 94	-36.80
SER L 95	-11.80
PHE L 96	-41.30
VAL L 98	-0.30
THR H 28	-27.80
GLN H 31	-60.20
TYR H 32	-19.00
GLY H 33	-15.00
ASP H 35	-3.90
GLY H 50	-5.60
ILE H 51	-7.20
GLY H 52	-10.20
PRO H 53	-13.30
SER H 57	-3.00
VAL H 59	-0.70
GLY H 99	-8.80
GLY H 100	-5.50
PRO H 101	-3.10
TYR H 102	-149.50
TYR H 103	-103.50
TYR H 104	-10.20
TYR H 105	-52.10

10

20

30

【0119】

要約すると、FXIa C500Sエピトープは以下の残基により形成されている： H 40
 I S A 4 0 6 , P R O A 4 1 0 , T H R A 4 1 1 , G L N A 4 1 2 . A
 R G A 4 1 3 , H I S A 4 1 4 , A S N A 4 5 0 , G L N A 4 5 1 , S
 E R A 4 5 2 , I L E A 4 5 4 , L Y S A 4 5 5 , A R G A 5 2 2 , L
 Y S A 5 2 3 , L E U A 5 2 4 , A R G A 5 2 5 , A S P A 5 2 6 , L
 Y S A 5 2 7 , I L E A 5 2 8 , G L N A 5 2 9 , A S N A 5 3 0 , T
 H R A 5 3 1 。

【0120】

Fab 076D-M007-H04 はアロステリック競合インヒビターとして作用する。それは FXIa の活性部位を直接的には遮断せず、その隣接部に結合する。この隣接結合は FXIa の活性部位の部分の再構成を誘発して、活性化 FXIa に天然基質が結合 50

するのを妨げる(図18)。

【0121】

これとは対照的に、Fab 076D-M007-H04はチモーゲンFXIには結合しない。チモーゲンFXIの報告されているX線構造(pdbエントリー2F83)においては、Fab 076D-M007-H04に対するエピトープおよび活性部位を構成する種々のループは適切に秩序だったものではない。特に、該エピトープ領域はFab 076D-M007-H04: FXIa C500S複合体においては十分に構造化されている。

【0122】

実施例9:水素/重水素交換質量分析に基づくエピトープマッピング

10

エピトープマッピングの、異なる分析が、契約研究機関ExSAR[ExSAR Corporation; 11 Deer Park Drive, Suite 103; Monmouth Junction, NJ 08852; USA]により行われている。この場合、それぞれ、FXIa C500S(アミノ酸388-625; Proteros Biostructuresにより購入)と076D-M007-H04および076D-M049-O15の精製Fabとの相互作用が差次の水素/重水素交換質量分析法により分析されている[概説としては、Percy AJ, Rey M, Burns KM, Schriemer DC. (2012) Probing protein interactions with hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry - a review. *Anal Chim Acta.* 721: 7-21を参照されたい]。それにおいては、10%を超える重水素レベルの相違は対応抗原のFabによる強力な防御を示す。5~10%の値は弱い結合を示し、5%未満の重水素レベルの相違は無防御を示す。

20

【0123】

表12aおよび表12bは、それぞれ、FXIaに接触しているFab 076D-M007-H04およびFab 076D-M049-O15の残基を要約している。

【表 1 2】

表 12a: FXIa に接触している Fab 076D-M007-H04 の残基

残基番号	平均重水素化 レベル相違(%)
THR 408	5 - 10
SER 409	5 - 10
PRO 410	5 - 10
THR 411	5 - 10
GLN 412	5 - 10
ARG 413	5 - 10
HIS 414	5 - 10
LEU 415	5 - 10
CYS 416	5 - 10
GLY 417	5 - 10
GLY 418	5 - 10
SER 419	5 - 10
ILE 420	5 - 10
ILE 421	5 - 10
GLY 422	5 - 10
ASN 423	5 - 10
GLN 424	5 - 10
VAL 444	> 10
TYR 445	> 10
SER 446	> 10
GLY 447	> 10
ILE 448	> 10
LEU 449	> 10
ASN 450	> 10
GLN 451	> 10
SER 452	> 10
ILE 454	> 10
LYS 455	> 10
THR 517	> 10
GLY 518	> 10
TRP 519	> 10
LYS 523	34
LEU 524	34
ARG 525	34
ASP 526	34
LYS 527	34
ILE 528	34
GLN 529	34
ASN 530	34
THR 531	34
LEU 532	34
GLN 533	34

表 12b: FXIa に接触している Fab 076D-M049-015 の残基

残基番号	平均重水素化 レベル相違(%)	残基番号	平均重水素化 レベル相違(%)
THR 517	5 - 10	GLY 591	5 - 10
GLY 518	5 - 10	SER 594	> 10
TRP 519	5 - 10	TRP 595	> 10
LYS 523	> 10	GLY 596	> 10
LEU 524	> 10	GLU 597	> 10
ARG 525	> 10	GLY 598	> 10
ASP 526	> 10	CYS 599	> 10
LYS 527	> 10	ALA 600	> 10
ILE 528	> 10	GLU 603	> 10
GLN 529	> 10	ARG 604	> 10
ASN 530	> 10	PRO 605	> 10
THR 531	> 10	GLY 607	> 10
LEU 532	> 10	VAL 608	> 10
GLN 533	> 10	TYR 609	> 10
TYR 563	5 - 10		
ARG 564	5 - 10		
GLU 565	5 - 10		
GLY 566	5 - 10		
GLY 567	5 - 10		
LYS 568	5 - 10		
ASP 569	5 - 10		
ALA 570	5 - 10		
CYS 571	5 - 10		
LYS 572	5 - 10		
GLY 573	5 - 10		
ASP 574	5 - 10		
SER 575	5 - 10		
GLY 576	5 - 10		
GLY 577	5 - 10		
PRO 578	5 - 10		
LEU 579	5 - 10		
SER 580	5 - 10		
CYS 581	5 - 10		
LYS 582	5 - 10		
HIS 583	5 - 10		
ASN 584	5 - 10		
GLU 585	5 - 10		
VAL 586	5 - 10		
TRP 587	5 - 10		
HIS 588	5 - 10		
LEU 589	5 - 10		
VAL 590	5 - 10		

【0124】

これらのデータは、FXIa 内の 200 アミノ酸 (FXIa C500S のアミノ酸 408 - 609) のエピトープの遮蔽が FXIa のタンパク質分解活性の抑制を招くことを明らかに示している。

【0125】

10

20

30

40

50

実施例 10：本発明の抗体による FXIa の機能的中和

特異的な発蛍光標識基質 (I-1575, Bachem, 最終濃度 25 μM) の切断を測定することにより、ヒト FXIa (Haematologic Technologies, Inc., カタログ番号 HCXIA-0160) 活性を決定し、Spectra Fluoroplus Reader (Tecan) を使用して、360 / 465 nm において連続的に該蛍光をモニターする。該抑制活性を試験するために、50 mM Tris / HCl、100 mM NaCl、5 mM CaCl₂ および 0.1% BSA を含有するバッファー中、10 nM の最終濃度の FXIa と共に、該抗体を 37 °C で 60 分間インキュベートする。このインキュベーション工程の後、基質 I-1575 を加え、該反応からのシグナルを測定する。図 1、図 2、図 3 および図 4 に示されているとおり、Graph Pad Prism ソフトウェアを使用して、データを分析する。データは平均 ± SEM (n = 4) として示されている。幾つかの実験では、完全長ヒト FXIa (Haematologic Technologies, Inc., カタログ番号 HCXIA-0160) の代わりに、単離触媒ドメインである FXIa C500S (アミノ酸 388-625; Proteros Biostuctures により購入) を使用する。全ての他の条件は前記のとおりである。

【0126】

実施例 11：本発明の抗体による、FXI からその活性形態 FXIa への変換の機能的中和

FXIIa またはトロンビン (トロンビンは IIa である) による FXI (Haematologic Technologies, Inc., カタログ番号 HCXIA-0150) からその活性形態 FXIa への変換の抑制を試験するために、50 mM Tris / HCl、100 mM NaCl、5 mM CaCl₂ および 0.1% BSA 中、種々の濃度の該抗体と共に 10 nM のヒト FXI を 37 °C で 1 時間インキュベートする。次の工程において、最終濃度 10 nM のヒト FXIIa (Enzyme Research, カタログ番号 HF XIIa 1212a) または最終濃度 1 単位 / mg のトロンビン (Enzyme Research, カタログ番号 HT 1002a) を加え、37 °C で 24 時間インキュベートする。次に、最終濃度 200 nM のトウモロコシ・トリプシン・インヒビター (Enzyme Research, CTF) および発蛍光標識基質 (I-1575, Bachem, 最終濃度 25 μM) を加える。Spectra Fluoroplus Reader (Tecan) を使用して、蛍光を 360 / 465 nm において連続的にモニターする。FXI の FXIIa 媒介性変換に関しては図 5 および図 7 に、ならびに FXI からその活性形態 FXIa へのトロンビン誘発性変換に関しては図 6 および図 8 に示されているとおり、Graph Pad Prism ソフトウェアを使用して、データを分析する。データは平均 ± SEM (n = 4) として示されている。

【0127】

実施例 12：靈長類における実験的血栓症インビオモデルにおける抗 FXIa 抗体 076D-M007-H04 の抗トロンビン活性の評価

実験方法

体重 9 ~ 11 kg の非抗凝固覚醒若年ヒトにおいて実験を行った。これらの動物は、記載されているとおり (Hansonら (1993) Journal of Clinical Investigation 92: 2003-2012)、大腿動脈および静脈の間に配置された長期的体外露出動脈 - 静脈 (AV) シャントを有していた。全ての研究動物において、ベースラインシャント血流は 250 ml / 分を超えた。低用量ケタミン (< 2 mg / kg / 時間) で不安感に対処した。該実験の前および後に全血細胞数を毎日測定した。いずれの実験日においても、計算血液減少は全血液体積の 4 % を超えなかった。既に記載されているとおりに (Hansonら [1993] J. Clin. Invest. 92: 2003-2012)、人工血管移植片 (ePTFE, WL Gore & Co., Flagstaff, Ariz.) の血栓生成性セグメントを介在させることにより、ヒト AV シャント内で血栓形成を開始させた。血小板依存性血栓形成を一貫して誘発

するために、該臨床的移植片セグメントを固定化コラーゲンで被覆した。2または4 mmの内径(i. d.)を有する長さ20 mmの移植片にウマI型コラーゲン(1 mg/ml; Nycomed Arzenmittel, Munich, Germany)を15分間にわたって満たし、ついでそれを無菌気流下で一晩乾燥させた。この方法は、走査電子顕微鏡法により判定された場合に、移植片腔内の均一コラーゲン被覆をもたらした。また、幾つかの実験においては、平均的な静脈および動脈せん断速度をモデル化するために、それぞれ、内径9 mm、長さ20 mmのチャンバーを内径4 mm、長さ20 mmの移植片の後で使用した。ついで該血栓生成性コラーゲン被覆移植片をシリコンラバーチューブのセグメント間に組込み、AVシャント内に配置した。該移植片を血液に60分間まで露出させた。各実験中に、近位シリコンラバーシャントセグメントをクランプで締める(クランプ化)ことにより、該移植片を通る血液流速を100 ml/minに制限し、それにより、該4 mm移植片においては265/sの平均壁せん断速度(MWSR)を得、一方、該2 mm移植片においては初期MWSRは2120/sであった。超音波流動メーター(Transonic Systems, Ithaca, N.Y.)を使用して、流速を連続的にモニターした。該4 mm移植片は閉塞を引き起こさず、該血栓生成性移植片セグメントが60分の時点で除去されるまで律動的流速は100 ml/minで維持された。ベースライン血流は各実験後に永久的シャントにより回復した。該2 mm径移植片においては、血栓形成により血液流速は次第に低下した。流速が100 ml/minから20 ml/min未満に低下したら(これは切迫性閉塞を示す)、該移植片を該AVシャントから除去した。血流の開始から移植片除去(<20 ml/minの流速)までの時間を閉塞時間とみなした。血小板沈着のイメージングのために、既に記載されているとおりに(Hansonら[1993]J.Clin.Invest.92:2003-2012)、自己ヒビ血小板を1 mCiの111In-オキシンで標識した。標識血小板を注入し、研究を行うまでに少なくとも1時間循環させた。血栓生成性移植片およびシリコンチャンバー上への標識血小板の蓄積を、ガンマシンチレーションカメラを使用して、5分間隔で測定した。同種125I標識ヒビフィブリノーゲン(4 μCi, >90% 血餅形成可能)を各研究前に10分間注入し、血栓内の該標識フィブリノーゲンの取り込みを、111Inの崩壊が可能となるよう >30日後に、ガンマカウンターを使用して評価した。沈着放射活性(cpm)を、最初の研究の時点で採取されたサンプルの、血餅形成可能なフィブリノーゲンの放射活性(cpm/mg)により割り算した。高い初期壁せん断速度(100 ml/minのクランプ化血流で2120/s)を示した長さ20 mm、内径2 mmのコラーゲン被覆装置を使用して、閉塞研究を行った。該2 mm血栓生成性移植片上への標識血小板の蓄積を、ガンマシンチレーションカメラを使用して、3分間隔で測定した。可能な場合には近位クランプ化により、流動を100 ml/minで維持し、ついで、伝播血栓が該装置を閉塞につれて、減少させた。20 ml/minの最終血液流速を閉塞に関するカットオフとして用いた。なぜなら、完全閉塞血栓、および該装置を通る血流の欠如は、該シャントの閉塞、および該動物の血液の有意な喪失を招きうるからである。

【0128】

血液サンプル分析

マイクロ60自動細胞カウンター(Horiba - ABX Diagnostics)を使用して、血液細胞数を決定した。最終濃度0.32%のクエン酸ナトリウム中に血液サンプルを集めた。全てのサンプルを12,900 gで5分間遠心分離し、血漿を集め、マイナス80°で保存した。トロンビン-抗トロンビン複合体を決定するために、交差反応性ELISAアッセイを用いた(TAT, Enzygnost-TAT, Dade-Behring; LOD: 2 ng/mL)。これらの研究に使用した全てのELISA試験キットはヒビマーカーに対する感受性を既に示している。遮断研究(内径4 mmのコラーゲン被覆移植片のみ)においては、この抗体が急性血栓増加を遮断しうるかどうかを決定するために、076D-M007-H04を研究の30分前にボーラス投与した(0.5 mg/kg, 10秒間にわたる静脈内ボーラス)。閉塞研究(内径2 mmのコラーゲン被覆移植片のみ)においては、076D-M007-H04を実験の3時間前にボーラス投

与した(0.5 mg / kgの静脈内投与の24時間後に0.5 mg / kgまたは2 mg / kg)。予防研究(内径4 mmのコラーゲン被覆移植片およびそれに続く内径9 mmのシリコンチャンバー)においては、076-M007-H04を実験の1時間前にボーラスとして投与した(0.5 mg / kgの静脈内投与の24時間後に0.5 mg / kgまたは2 mg / kg)。

【0129】

止血評価

標準的テンプレート皮膚出血時間試験(Surgicutt(登録商標), International Thrombidiyne Corp)を用いて、ヒビにおける一次止血に対するFXIa抑制の効果を評価した。実験的には、この試験および類似試験(例えば、Simplatene出血時間)はヒトおよび非ヒト靈長類における治療用抗凝固物質、抗血小板物質および凝固異常の効果に対して感受性であることが示されている(Gruberら[2007]Blood 109:3733-3740; Smithら[1985]Am. J. Clin. Pathol. 83:211-215; Payneら[2002]J. Vasc. Surg. 35:1204-1209)。全出血時間測定は同一専門技術者により行われた。止血の間接評価のために、aPTT(活性化部分トロンボプラスチン時間; SynthASil, HemosIL; Instrumentation Laboratory Company, Bedford, MA)およびACT(活性化血餅形成時間, Lupotek KCT; r2 Diagnostics, South Bend, IN)の測定も、該実験の前、途中および後の種々の時点で行った。

【0130】

インビトロaPTT

種々の濃度の076D-M007-H04をaPTTアッセイの開始の前に10分間にわたって血漿中でインキュベートした。図20に示されているとおり、「前」時点、すなわち、いずれかの処理が投与される前に、ヒビから集めた血漿サンプルにおいて、aPTT血餅形成時間を決定した。結果は、該血栓症研究において使用された全6頭の実験用ヒビからの血漿において、076D-M007-H04が抗凝固物質であったことを示している。

【0131】

インビボ血餅形成研究

これらの研究においては3頭のヒビを使用した。2頭のヒビには32 mg / kgのチュアブル・アスピリンの投与の後で076D-M007-H04(2.5 mg / kg H04, 静脈内ボーラス)を投与し、1頭のヒビには0.5 mg / kg 076D-M007-H04(静脈内ボーラス)を投与し、ついで24時間後に2 mg / kg用量(静脈内ボーラス)を投与した。投与後の種々の時点でACT(図21および図22)およびaPTT(図23および図24)を測定した。

【0132】

シャント実験中の血小板沈着

血栓症閉塞実験

076D-M007-H04処理が小血管の閉塞を予防し、または閉塞までの時間を延長させうるかどうかを評価するために使用した血栓生成性装置は、内径2 mm、長さ20 mmのコラーゲン被覆移植片からなるものであった。図25に示されているとおり、血小板沈着は60分間、または適用可能な場合には移植片閉塞の時点まで示される。14個中12個の対照装置が60分以内に閉塞し、一方、5個中2個の076D-M007-H04(0.5 mg / kg)装置および5個中2個の076D-M007-H04(0.5 mg / kg + 2 mg / kg)装置が閉塞した。データは平均±SEMである。

【0133】

血栓症予防実験

血栓開始および増加に対する076D-M007-H04の効果を評価するために使用した血栓生成性装置は内径4 mm、長さ20 mmのコラーゲン被覆ePTFE移植片およ

10

20

30

40

50

びそれに続く内径 9 mm、長さ 20 mm のシリコンラバーチャンバーからなるものであった。図 26 に示されている血小板沈着の勾配は抗血小板活性の指標である。血栓形成の開始からの種々の時点の血小板沈着の速度の減少により示されるとおり、076D-M007-H04 (0.5 mg / kg および 0.5 mg / kg、ついで 24 時間後に 2 mg / kg) の両方の用量が効力を示した。該データは、実験間の血小板数変動を相殺するために標準化されている。データは平均 \pm SEM である。図 27 に示されるとおり、血栓形成の開始からの種々の時点における該シリコンチャンバーにおける血小板沈着速度の顕著な減少により示されるとおり、076D-M007-H04 (0.5 mg / kg および 0.5 mg / kg、ついで 24 時間後に 2 mg / kg) の両方の用量が効力を示した。データは平均 \pm SEM である。

10

【0134】

トロンビン抗トロンビン複合体

FXI の抑制は、トロンビン媒介性血小板活性化およびフィブリン形成を抑制すること並びに / 又は血栓溶解を増強することの両方により、インビボの血栓形成を低減しうるため、商業的に入手可能な ELISA キットを使用してトロンビン抗トロンビン (TAT) のレベルを測定した。図 28 に示されるとおり、076D-M007-H04 (0.5 mg / kg および 0.5 mg / kg、ついで 24 時間後に 2 mg / kg) でのヒビの前処理は TAT レベルの増加を妨げた。このことは、FXIa 活性の非存在下におけるトロンビン生成の顕著な低減を示唆している。

【0135】

20

出血時間

小児および成人における使用に関して FDA により承認されている成人用サージカット (Surgicutt) 装置 (<http://www.itcmed.com/products/surgicutt-bleeding-time-device>) を使用して、一次止血を評価した。出血時間 (BT) を手動で記録した。再出血に関して 30 分間にわたって創傷を観察し、翌日、挫傷、点状出血、血腫および広汎性出血に関して皮膚を評価した。これらの止血評価の 1 以上は実質的に全ての市販抗血栓物質 (抗血小板薬、抗凝固剤、血栓溶解剤) の抗止血効果に対して感受性であり、該効果を予測するものであることが示されている。

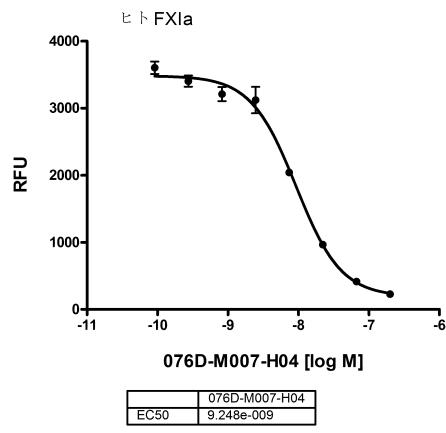
【0136】

30

076D-M007-H04 (0.5 mg / kg、ついで 24 時間後に 2 mg / kg) を、単独で、またはチュアブル・アスピリン (ASA, 32 mg / kg) の投与後に、ヒビに投与した。図 29 に示されるとおり、076D-M007-H04 処理のいずれに関しても、ベースラインと比較して出血時間の増加は認められなかった。アスピリン処理動物への 076D-M007-H04 の投与は、アスピリンの単独処理と比較して、出血時間を更には増加させないようであった。

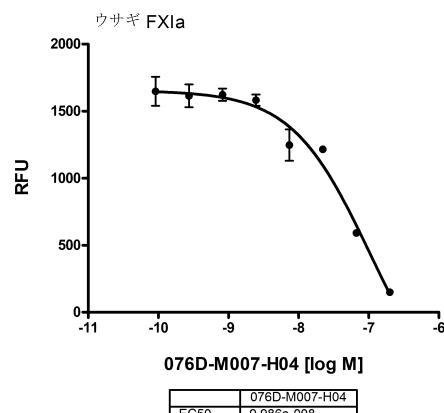
【図1】

Figure 1/29



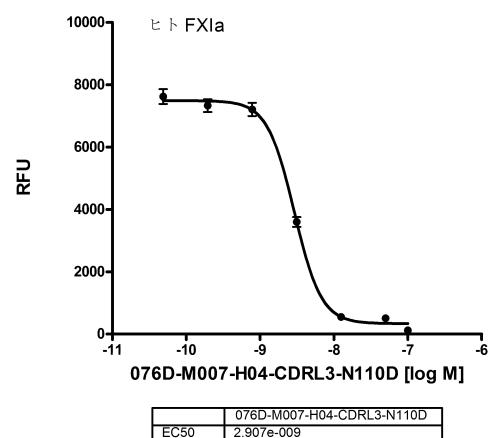
【図2】

Figure 2/29



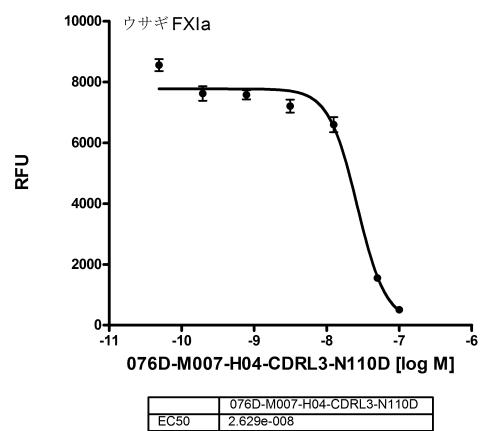
【図3】

Figure 3/29



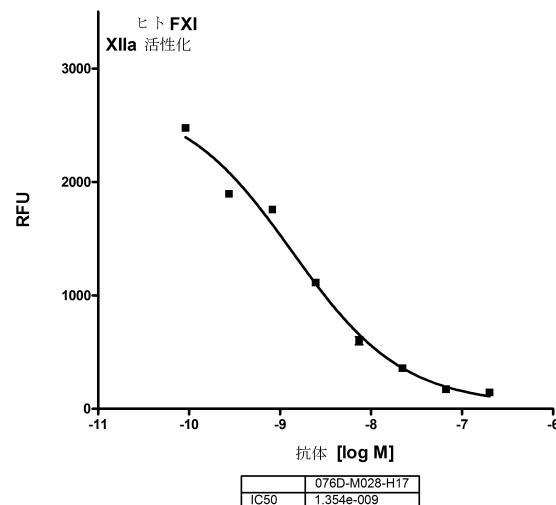
【図4】

Figure 4/29



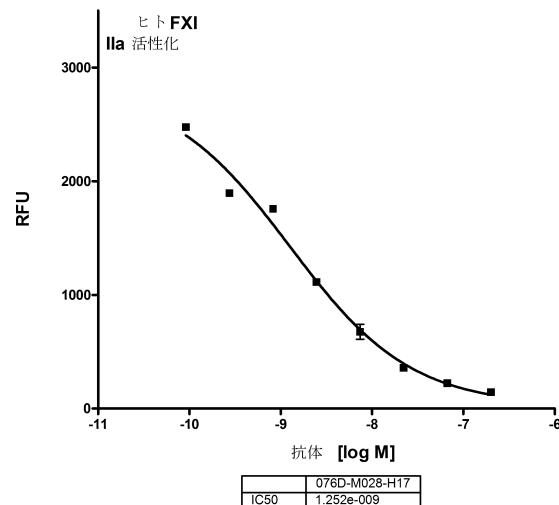
【図5】

Figure 5 /29



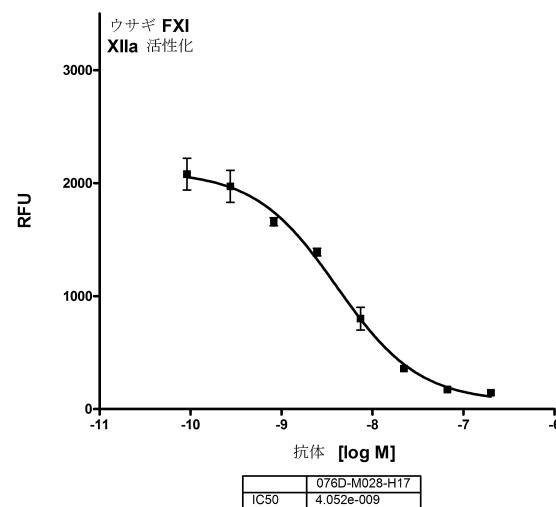
【図6】

Figure 6 /29



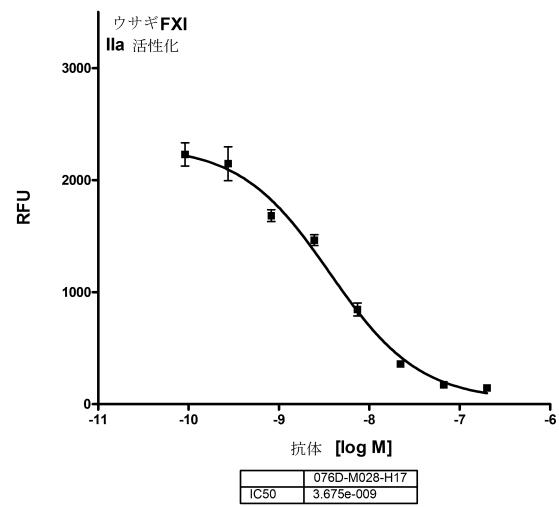
【図7】

Figure 7 /29



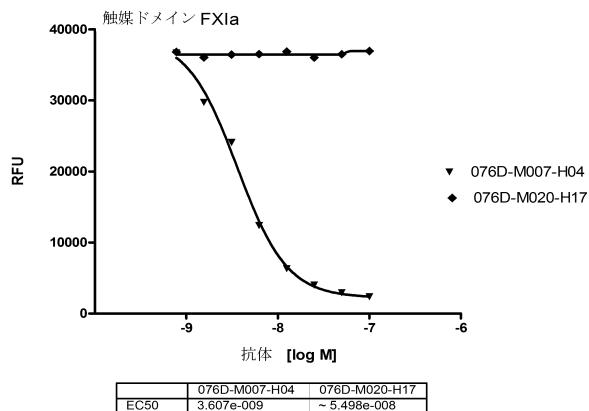
【図8】

Figure 8 /29



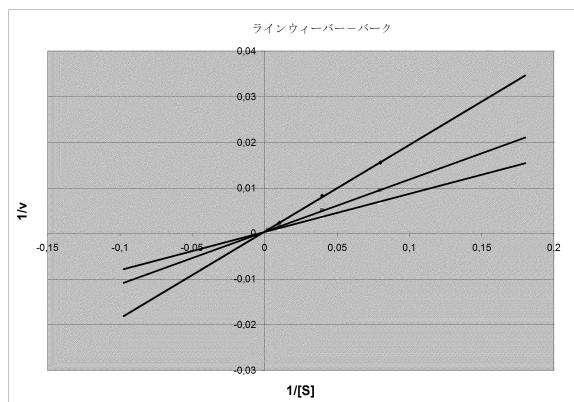
【図9】

Figure 9 /29



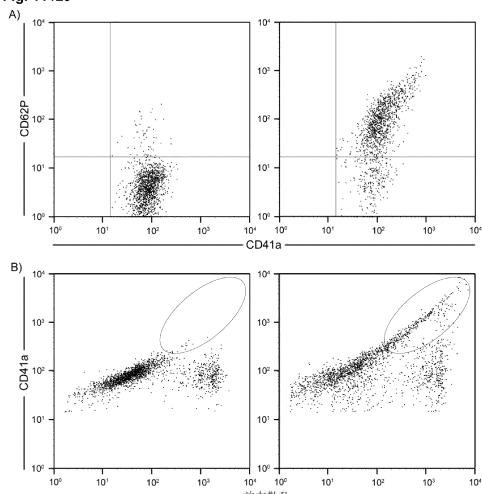
【図10】

Figure 10 /29



【図11】

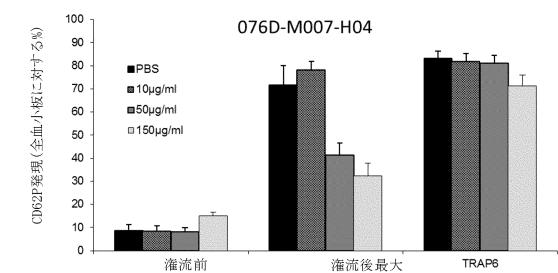
Fig. 11 /29



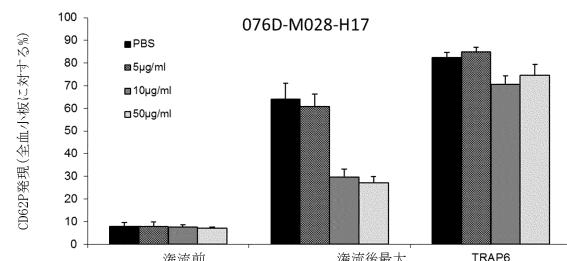
【図12】

Fig 12 /29

A)



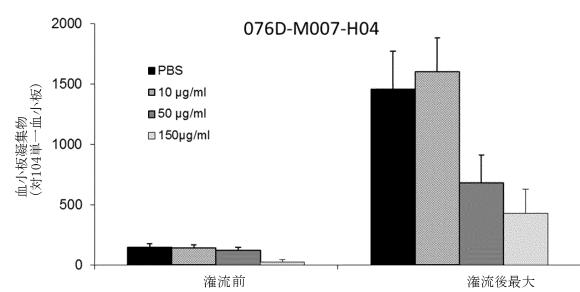
B)



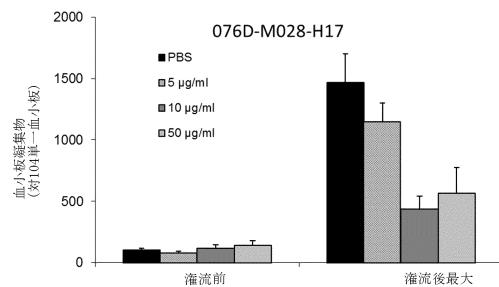
【図13】

Fig 13/29

A)



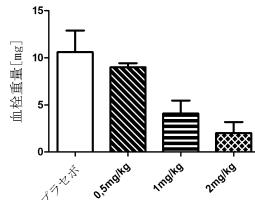
B)



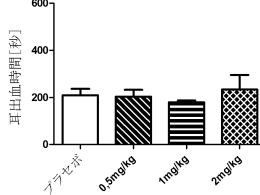
【図14】

Figure 14/29

a)



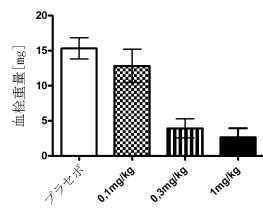
b)



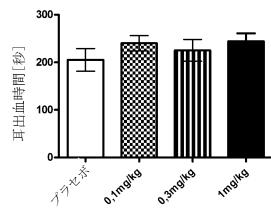
【図15】

Figure 15/29

a)



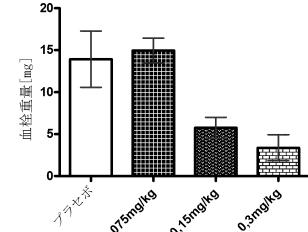
b)



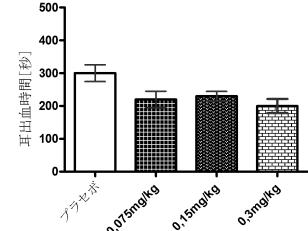
【図16】

Figure 16/29

a)

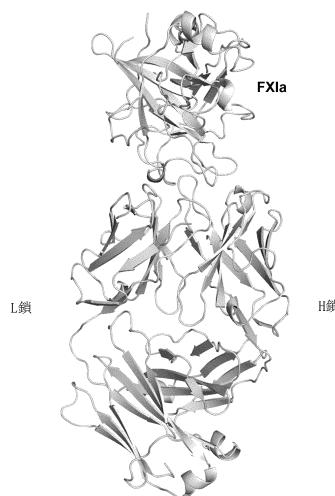


b)



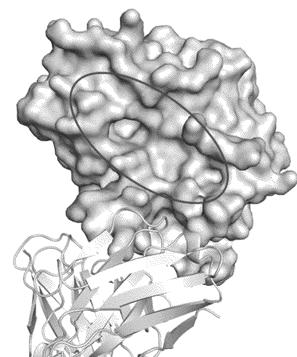
【図 17】

Figure 17/29



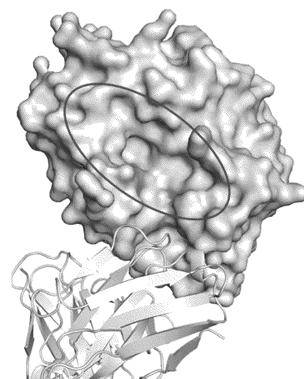
【図 18 a】

Figure 18a/29



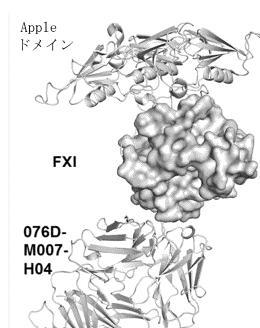
【図 18 b】

Figure 18b/29



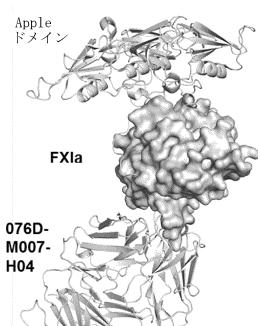
【図 19 a】

Figure 19a/29



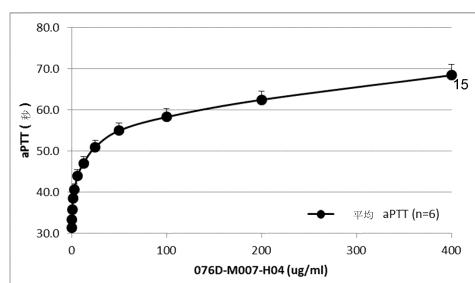
【図 19 b】

Figure 19b/29



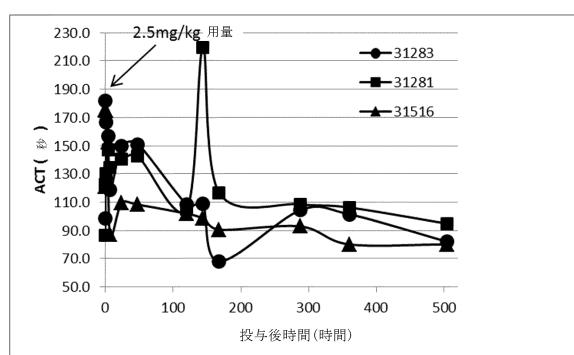
【図 20】

Figure 20/29



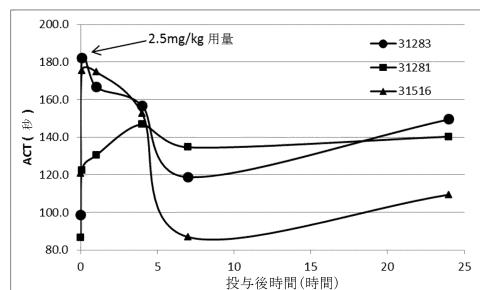
【図 21】

Figure 21/29



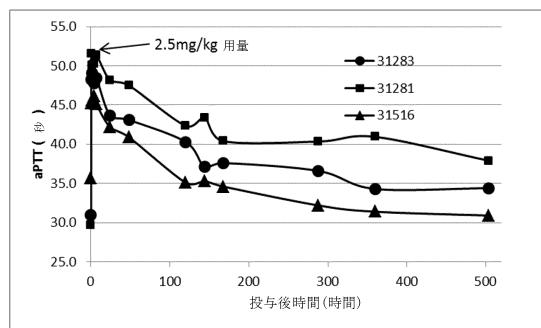
【図22】

Figure 22/29



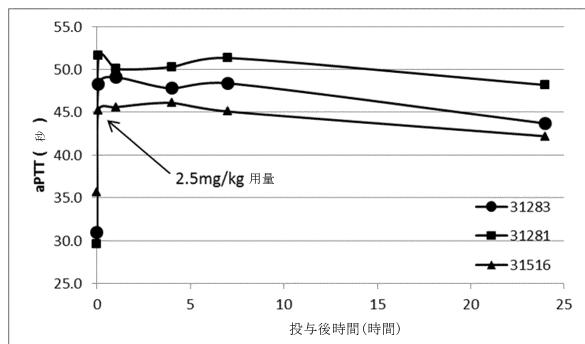
【図23】

Figure 23/29



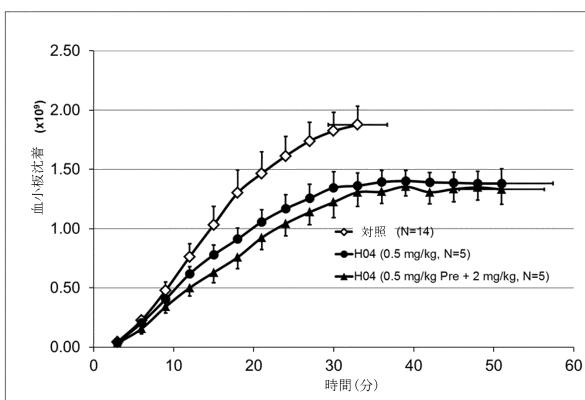
【図24】

Figure 24/29



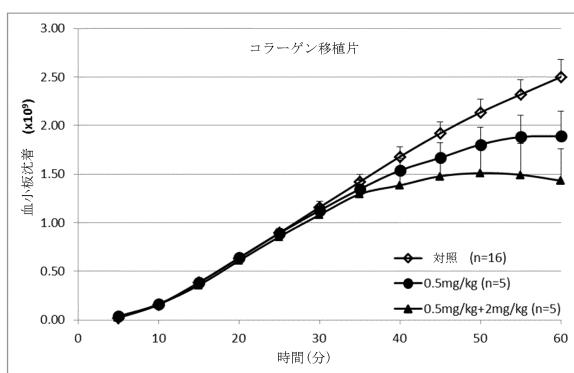
【図25】

Figure 25/29



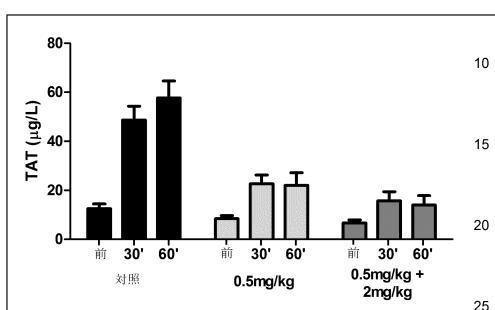
【図26】

Figure 26/29



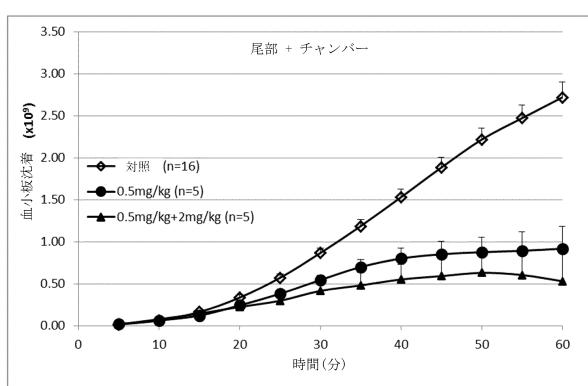
【図28】

Figure 28/29



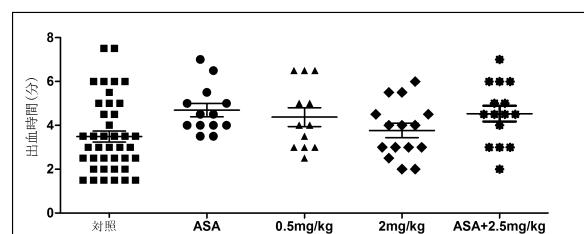
【図27】

Figure 27/29



【図29】

Figure 29/29



【配列表】

0006348900000001.app

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 13150361.7
(32)優先日 平成25年1月7日(2013.1.7)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号 61/817,675
(32)優先日 平成25年4月30日(2013.4.30)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
(74)代理人 100127812
弁護士 城山 康文
(72)発明者 ピルメン, アンドレアス
ドイツ国、5 0 6 7 6 ·ケルン、アルントシュトラーセ・5
(72)発明者 シュトラスバーガー, ユリア
ドイツ国、4 2 1 1 5 ·ブツパートール、モーツアルトシュトラーセ・7
(72)発明者 ディットマー, フランク
ドイツ国、4 0 6 2 7 ·デュッセルドルフ、サンドシュトラーセ・4
(72)発明者 シュトレラート, ミヒヤエル
ドイツ国、4 0 4 7 7 ·デュッセルドルフ、マルク - シヤガル - シュトラーセ・8 6
(72)発明者 ブーフミューラー, アンヤ
ドイツ国、4 5 2 5 9 ·エッセン、バーダーベーク・7 2 アー
(72)発明者 グルドジンスカ - ゴーベル, ヨアンナ
ドイツ国、1 0 2 4 7 ·ベルリン、アン・デン・エルデナアー・ヘーフエン・3 7
(72)発明者 フイネルン, リカルダ
ドイツ国、5 2 0 7 4 ·アーヘン、ドライレンダーベーク・1 0 7
(72)発明者 シエーフナー, マルティナ
ドイツ国、1 3 4 6 5 ·ベルリン、グルネマンツップファット・7 7
(72)発明者 ゲルデス, クリストフ
ドイツ国、5 1 0 6 3 ·ケルン、デュッセルドルファー・シュトラーセ・7 5
(72)発明者 ヨリツセン, ハンナア
ドイツ国、4 2 5 7 9 ·ヘイリングンハウス、ボルクムシュトラーセ・3 1
(72)発明者 イタクラ, アサコ
アメリカ合衆国、オレゴン・9 7 2 0 1、ポートランド、サウスウェスト・ツカーラ・ストリート
・2 3 5 、アパートメント・7
(72)発明者 ワイ・レウン, フィルベルタ
アメリカ合衆国、オレゴン・9 7 2 1 4、ポートランド、サウスイースト・ヤムヒル・ストリート
・3 4 4 9
(72)発明者 タツカー, エリツク
アメリカ合衆国、オレゴン・9 7 2 0 1、ポートランド、サウスウェスト・パーク・アベニュー・
1 5 1 1 、アパートメント・1 3 0 7

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 国際公開第2 0 0 9 / 1 5 4 4 6 1 (WO, A 1)
国際公開第2 0 1 0 / 0 8 0 6 2 3 (WO, A 1)
THROMBOSIS AND HEMATOSTASIS, 2010, Vol.116, p.3981-3989
Blood, 2011, Vol.118, No.21, p.530-531, BIOSIS[online], BIOSIS Accesion No.2012:218456
Blood, 2010, Vol.116, No.21, Abstract Number:820, EMBASE[online], EMBASE Accesion No.0

050758439

Blood, 2007, Vol.110, No.11, Part 1, p.235A, BIOSIS[online], BIOSIS Accesion No.2008:2
15994

The Journal of Biological Chemistry, 1985, Vol.260, p.10714-10719
Biochemistry, 1986, Vol.25, p.2417-2424

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 0 7 K 1 6 / 0 0

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

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)