

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-506448

(P2014-506448A)

(43) 公表日 平成26年3月17日 (2014.3.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A C	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 C O 8 5
C O 7 K 16/36 (2006.01)	C O 7 K 16/36	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 108 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-549784 (P2013-549784)	(71) 出願人	512137348
(86) (22) 出願日	平成24年1月17日 (2012.1.17)		バイエル・インテレクチュアル・プロパティ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング
(85) 翻訳文提出日	平成25年9月17日 (2013.9.17)		Bayer Intellectual Property GmbH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/050595		ドイツ40789モンハイム、アルフレート・ノーペル・シュトラッセ10番
(87) 国際公開番号	W02012/098089	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成24年7月26日 (2012.7.26)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	11151410.5	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成23年1月19日 (2011.1.19)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 凝固因子の阻害剤に対する結合タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、インビトロおよび／またはインビボで抗凝固剤の抗凝固効果を中和する、抗原結合領域、抗体、抗原結合性抗体フラグメントおよび抗体模倣物の同定および使用に関する。本発明の抗体および機能的フラグメントならびに抗体模倣物は、治療（解毒）および／または診断目的で、例えばFXa阻害剤などの抗凝固剤の薬理学的効果の特異的に解消するために使用することができる。本発明は、前記分子をコードする核酸配列、それを含有するベクター、医薬組成物、および使用説明書を伴うキットも提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インビトロおよび／またはインビボで抗凝固剤の抗凝固活性を中和する、単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物。

【請求項 2】

抗凝固剤に結合する、単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物。

【請求項 3】

抗凝固剤に結合し、かつインビトロおよび／またはインビボで該抗凝固剤の抗凝固活性を中和する、単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物。

10

【請求項 4】

抗凝固剤が 5 0 0 0 D a 未満の分子量を有する、前記請求項のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物。

【請求項 5】

抗凝固剤が第 X a 因子阻害剤またはトロンビン阻害剤である、前記請求項のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物。

【請求項 6】

F X a 阻害剤が、式 1 の基を含む化合物、アピキサバン、ベトリキサバン、ラザキサバン、エドキサバン、オタミキサバンまたは Y M-1 5 0 であるか、トロンビン阻害剤がダビガトランである、前記請求項のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物。

20

【請求項 7】

抗凝固剤がリバーロキサバンである、前記請求項のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物。

【請求項 8】

抗体配列が表 1 の抗体の可変重鎖 C D R 配列および可変軽鎖 C D R 配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 9】

配列番号 2 6 3 ～ 2 6 5 によって表される可変重鎖 C D R 配列および配列番号 2 6 6 ～ 2 6 8 によって表される可変軽鎖 C D R 配列、または
配列番号 2 5 1 ～ 2 5 3 によって表される可変重鎖 C D R 配列および配列番号 2 5 4 ～ 2 5 6 によって表される可変軽鎖 C D R 配列、または
配列番号 2 2 1 ～ 2 2 3 によって表される可変重鎖 C D R 配列および配列番号 2 2 4 ～ 2 2 6 によって表される可変軽鎖 C D R 配列
を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性フラグメント。

30

【請求項 10】

抗体配列が表 1 に示す抗体の可変重鎖配列および可変軽鎖配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 11】

配列番号 4 8 9 によって表される重鎖フラグメント配列および配列番号 4 9 0 によって表される軽鎖配列、または
配列番号 2 1 7 によって表される可変重鎖配列および配列番号 2 1 8 によって表される可変軽鎖配列、または
配列番号 1 1 7 によって表される可変重鎖配列および配列番号 1 1 8 によって表される可変軽鎖配列、または
配列番号 2 0 7 によって表される可変重鎖配列および配列番号 2 0 8 によって表される可変軽鎖配列、または
配列番号 4 9 3 によって表される重鎖フラグメント配列および配列番号 4 9 4 によって表される軽鎖配列
を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性フラグメント。

40

50

【請求項 12】

抗体または抗体模倣物が、結合に関して、請求項 8～11 に記載の抗体または抗原結合性フラグメントと競合する、前記請求項のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物。

【請求項 13】

抗体または抗原結合性フラグメントのアミノ酸配列が、表 1 に示す少なくとも 1 つの CDR 配列と少なくとも 50 %、55 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または 95 % 同一であるか、または表 1 に示す少なくとも 1 つの VH または VL 配列と少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、92 % または 95 % 同一である、請求項 12 に記載の抗体または抗原結合性フラグメント。

10

【請求項 14】

抗体または抗原結合性フラグメントのアミノ酸配列が、M18-G08-G の少なくとも 1 つの CDR 配列と少なくとも 50 %、55 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または 95 % 同一であるか、または M18-G08-G の VH または VL 配列と少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、92 % または 95 % 同一である、請求項 12～13 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項 15】

抗体またはその抗原結合性フラグメントが、コンセンサス配列である配列番号 497 もしくは配列番号 502 (CDR H1)、配列番号 222 もしくは配列番号 503 (CDR H2)、または配列番号 498 もしくは配列番号 504 (CDR H3) に合致する重鎖 CDR 配列の少なくとも 1 つ、および／または配列番号 499 もしくは配列番号 505 (CDR L1)、配列番号 500 もしくは配列番号 506 (CDR L2)、または配列番号 501 もしくは配列番号 507 (CDR L3) のコンセンサス配列に合致する軽鎖 CDR 配列の少なくとも 1 つを含む、請求項 12～14 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性フラグメント。

20

【請求項 16】

a. 抗体またはその抗原結合性フラグメントが、配列番号 497 (CDR H1)、配列番号 222 (CDR H2) および配列番号 498 (CDR H3) に合致する重鎖 CDR 配列、ならびに配列番号 499 (CDR L1)、配列番号 500 (CDR L2) および配列番号 501 (CDR L3) に合致する軽鎖 CDR 配列を含むか、または

30

b. 抗体またはその抗原結合性フラグメントが、配列番号 502 (CDR H1)、配列番号 503 (CDR H2) および配列番号 504 (CDR H3) に合致する重鎖 CDR 配列、ならびに配列番号 505 (CDR L1)、配列番号 506 (CDR L2) および配列番号 507 (CDR L3) に合致する軽鎖 CDR 配列を含む、請求項 12～15 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項 17】

抗体または抗原結合性フラグメントが、表 1 に示す少なくとも 1 つの CDR 配列または少なくとも 1 つの可変重鎖もしくは軽鎖配列を含む、請求項 12～16 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項 18】

フラグメントが Fab フラグメントである、前記請求項のいずれか一項に記載の抗原結合性フラグメント。

40

【請求項 19】

抗体またはフラグメントがモノクローナルである、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項 20】

抗体またはフラグメントが、ヒト、ヒト化またはキメラである、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項 21】

請求項 1～20 に記載の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物を

50

コードする単離されたポリヌクレオチド配列。

【請求項 22】

請求項 21 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 23】

請求項 21 に記載のポリヌクレオチド配列または請求項 22 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 24】

宿主細胞が真核細胞または原核細胞である、請求項 23 に記載の宿主細胞。

【請求項 25】

宿主細胞が酵母または大腸菌細胞である、請求項 24 に記載の宿主細胞。

10

【請求項 26】

請求項 24 に記載の宿主細胞を培養し、抗体もしくはフラグメントまたは抗体模倣物を単離することによって、請求項 1～20 に記載の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物を生産する方法。

【請求項 27】

請求項 1～20 に記載の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物を含む医薬組成物。

【請求項 28】

請求項 7～20 に記載の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物を含む医薬組成物。

20

【請求項 29】

医薬としての請求項 1～20 に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物。

【請求項 30】

該抗凝固剤によって誘導された抗凝固状態を正常化するための医薬としての請求項 1～20 に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物。

【請求項 31】

該 F X a 阻害剤によって誘導された抗凝固状態を正常化するための医薬としての請求項 1～20 に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物。

30

【請求項 32】

式 1 の基を含む化合物によって誘導された抗凝固状態を正常化するための医薬としての請求項 1～20 に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物。

【請求項 33】

リバーロキサバンによって誘導された抗凝固状態を正常化するための医薬としての請求項 7～20 に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物。

【請求項 34】

抗凝固剤によって誘導された抗凝固状態を請求項 27 に記載の医薬組成物を使って正常化する処置方法。

40

【請求項 35】

F X a 阻害剤によって誘導された抗凝固状態を請求項 27 に記載の医薬組成物を使って正常化する処置方法。

【請求項 36】

式 1 の基を含む化合物によって誘導された抗凝固状態を請求項 27 に記載の医薬組成物を使って正常化する処置方法。

【請求項 37】

リバーロキサバンによって誘導された抗凝固状態を請求項 28 に記載の医薬組成物を使って正常化する処置方法。

50

【請求項 38】

実施例 1 K または実施例 1 L の化合物。

【請求項 39】

抗体もしくはその抗原フラグメントまたは抗体模倣物を単離または検出するための請求項 38 の化合物の使用。

【請求項 40】

請求項 38 の化合物および／または請求項 1～20 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む診断キット。

【請求項 41】

インビトロおよび／またはインビボ診断アッセイにおける抗凝固剤の定性的および／または定量的決定のための診断剤としての請求項 1～20 に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、凝固因子の治療的阻害剤と相互作用しそれを中和する、抗原結合領域、抗体、抗原結合性抗体フラグメントおよび抗体模倣物 (antibody mimetic) の同定および使用に関する。

【0002】

本発明の抗体模倣物、抗体および機能的フラグメントは、治療 (解毒) および／または診断目的で、例えば FXa 阻害剤などの薬理学的効果の特異的に解消 (reverse) するために使用することができる。本発明は、前記の分子をコードする核酸配列、それを含有するベクター、医薬組成物、および使用説明書を伴うキットも提供する。

【背景技術】

【0003】

[発明の背景]

抗凝固薬の一般的な制約は、処置に関連する出血リスクと、緊急的状況に陥った場合にその活性を迅速に解消することが充分にはできないことである。新興の抗凝固剤リバーロキサバンは認容性と安全性が立証されている新薬であるが、その効果の迅速な中和 (解毒) を可能にする特異的薬剤を利用することができれば、医学的に有利であるだろう。ここに、本発明者らは、FXa 阻害剤、例えばリバーロキサバンによって誘導される抗凝固の迅速な解消 (reversal) を可能にし、それによって選択的解毒剤として作用する、新規な特異的抗体、抗原結合性抗体フラグメントおよび抗体模倣物を記載する。

【0004】

深部静脈血栓症 (DVT)、肺塞栓症 (PE)、脳卒中および心筋梗塞などの血栓塞栓性障害は、心血管関連の罹患および死亡の主要原因である。ビタミン K アンタゴニスト (VKA、例えばワルファリン)、未分画ヘパリン (UFH) および低分子量ヘパリン (LMWH) のような抗凝固薬による高リスク患者における血栓塞栓症の処置と防止は、何年も前から、幅広く確立された医療介入になっている。しかし、抗凝固薬の一般的な制約は、処置に関連する出血リスクと、緊急的状況に陥った場合にその活性を迅速に解消することが充分にはできないことである。古典的な抗凝固剤の場合は、硫酸プロタミン (UFH および LMWH 用) やビタミン K (VKA 用) など、いくつかの解毒剤を利用することができる。加えて、組換え第 VIIa 因子または血液製剤も、非特異的な解毒剤 (reversal agent) として考慮することができる。しかし、新興の経口抗凝固剤 (例えばリバーロキサバン) のための特異的解毒剤は、利用できるものがなく、臨床開発中でもない。これらの新しい抗凝固剤は今後ますます重要になるだろうし、それら新しい抗凝固剤の一つに特異的な解毒剤を利用することができれば、緊急的状況における医学的利点になるであろう。

【0005】

UFH、LMWH および VKA のような従来型の抗凝固薬を利用することができるにも

10

20

30

40

50

かわらず、予測可能な薬物動態、より良い治療ウィンドウおよび使い勝手のよい適用性を有する改良された治療薬に対する医療ニーズは高い。リバーロキサバンは、血液凝固第Xa因子(FXa)を直接阻害する新興の経口利用可能な抗凝固剤である(Perzborn E. ら, Nat. Rev. Drug Discov. 2011, 10(1): 61-7)。FXaは、凝固カスケードのキー酵素に相当し、プロトロンビンからのトロンビンの生成により、血餅形成を触媒する。リバーロキサバン(化学名: 5-クロロ-N-[[(5S)-2-オキソ-3-[4-(3-オキソモルホリン-4-イル)フェニル]-1, 3-オキサゾリジン-5-イル]メチル]チオフェン-2-カルボキサミド)は、436 g/molの分子量を有し、FXaを、他の生物学的に関連するセリンプロテアーゼより $>10,000$ 高い選択性で、用量依存的に阻害する(0.4 nM の K_i)。これは迅速な作用発現($1.7 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ の k_{on})を有し、可逆的に結合する($5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の k_{off})。リバーロキサバンは、プロトロンビナーゼ結合型FXa(2.1 nM の IC_{50})および血餅会合型FXa(75 nM の IC_{50})も阻害し、静脈および動脈血栓症に関するさまざまな動物モデルにおいて、用量依存的に抗血栓活性を示す。臨床研究において、リバーロキサバンは好ましい安全性および認容性プロファイルを示し、待機的股関節または膝関節置換術後の成人患者におけるVTEの防止に有効であった。リバーロキサバンは、待機的股関節または膝関節置換術後の成人患者におけるVTEを防止するために、Xarelto(登録商標)という商品名で販売されており、今のところ、この適応に関してエノキサバリンより優れた効力を一貫して示している唯一の新しい経口抗凝固剤である。この化合物は、高リスク心房細動患者における脳卒中の防止などといった慢性適応症のためにも開発されている。

10

20

【0006】

リバーロキサバンだけでなく、アピキサバン、エドキサバン、ベトリキサバン、ダレキサバン、およびTAK-442など、さまざまな臨床開発段階にある経口利用可能な直接FXa阻害剤が、他にもいくつかある(Garcia, D. ら, Blood 2010; 115(1): 15-20)。加えて、間接的(アンチトロンビン依存的)非経口FXa阻害剤である五糖フォンダパリヌクスが、VTEの防止および処置に関して承認されている。もう一つの新しいクラスの抗凝固剤は、トロンビンの活性部位に結合することによってそのフィブリン相互作用を遮断する直接トロンビン阻害剤(DTI)である。しかし、これらの薬物は全て、特異的解毒剤が存在しないので、出血リスクと、緊急手術または血管インターベンションに先だって抗凝固を迅速に解消できないことが、どの抗凝固剤を投与する場合にも、依然として、重大な懸念である。したがって、抗凝固剤と解毒剤との特異的ペアを提供することは、重要な未充足医療ニーズに対処することになるであろう。

30

【0007】

リバーロキサバンは、認容性と安全性が立証された薬物であり、比較的短い半減期を有する化合物でもある。しかし、推定される臨床出血状況の重症度によっては、単に投薬を中止するだけでは、その抗凝固効果を解消するには充分でない場合がありうる。特異的解毒剤を利用することができれば、重症出血事象(例えば外傷によって引き起こされるもの)の結果として、または緊急の侵襲的手技(例えば緊急手術)の必要により、抗凝固効果の迅速な中和が必要になる稀な緊急状況において、有利であるだろう。現在、生命を脅かす出血が起きた場合は、組換え第VII因子の投与を考慮しうるが、限られた非臨床データおよび臨床データしか利用できない(Levi, M. ら, N Engl J Med. 2010; 363(19): 1791-800)。考慮されるかもしれない非特異的解毒剤は、血液由来(活性化)プロトロンビン複合体濃縮製剤(aPCC、PCC)または新鮮凍結血漿である。しかし、これらのどの解消戦略も臨床経験がなく、これらの介入は血栓形成促進リスク、感染のリスク、または遅い作用発現などといった医学的問題を引き続き有している点に注意することが重要である(Romualdi ら, Curr. Pharm. Des. 2010; 16(31): 3478-82)。

40

【0008】

50

最近、F X a 阻害剤の非選択的解毒剤である P R T O 6 4 4 4 5 に関する前臨床データが報告された。この分子は、F X a タンパク質の変異型組換え体に基づき、その本来の凝固促進活性を欠くが、それでもなお、さまざまなタイプの F X a 活性部位阻害剤に結合することができ、それによって、それらの抗凝固効果を中和する (W O 2 0 0 9 / 0 4 2 9 6 2 A 2)。この化合物は、全ての現行 F X a 阻害剤 (低分子阻害剤もアンチトロンビン依存性阻害剤も) の抗凝固を解消することが、前臨床相で報告されている。しかし、そのような非選択的解毒剤の短所は、その使用が全ての F X a 阻害剤の有効性の欠如につながるだろうということであり、これは、処置される患者の即時抗凝固が必要になった場合に、問題になりうる。そのうえ、内在性 F X a タンパク質に対して交差特異的な抗薬物抗体が発生する可能性も排除することができない。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、上述の課題を克服するために、凝固阻害剤に対する理想的解毒剤、例えば式1の構造要素を含有する F X a 阻害剤 (例えばリバーロキサバン) に対する理想的解毒剤は、高度に特異的であって、必要ならば異なる阻害剤による、または異なる化合物クラス他の阻害剤による、さらなる後続の処置を可能にするものであるだろう。未結合阻害剤の効率のよい持続的な低減を可能にするために、薬物に対するそのアフィニティは、 μ M 域未満にあるべきである。その上、それは迅速な作用発現を有するべきであり、凝固カスケードに対する固有の影響を欠くべきである。加えて、医薬の素速い再取り込みを可能にするには、短い半減期が有利であるだろう。さらにまた、解毒剤は、血栓形成促進リスクまたは感染のリスクなどといった、他の上述した従来からの医学的問題を欠くべきである。

20

【0010】

解決策は、抗凝固剤の抗凝固活性を中和する抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物の提供である。

【0011】

抗体および抗体模倣物は、1000Da 未満の分子量を有する低分子、いわゆるハプテンに特異的に結合することができると記述されてきた。静脈内投与された、ヒツジポリクローナル血清由来の抗体フラグメント (F a b) による低分子化合物の結合および中和は、例えばジゴキシン中毒の処置 (D i g i F a b、ジゴキシン免疫 F a b (ヒツジ))、または抗毒素としての使用 (C r o F a b、ガラガラヘビ科 (C r o t a l i d a e) 多価免疫 F a b (ヒツジ)) に関して、確立されている。

30

【0012】

最近、組換え抗体技術を使ったハプテン特異的抗体の生成も報告された (S h e e d y, C. ら, B i o t e c h A d v 2 0 0 7; 2 5 : 3 3 3 - 5 2 に総説がある)。約 10^{10} 個を上回る異なる抗体分子を含む高度に多様なファージディスプレイライブラリーに基づいて、nM 未満に至るアフィニティを有するハプテン特異的結合剤を、さまざまなクラスの低分子に対して単離することができた (V a u g h a n ら, N a t. B i o t e c h. 1 9 9 6; 1 4 (3) : 3 0 9 - 3 1 4)。それでもやはり、ハプテンは依然として難易度の高いターゲットであり、抗ハプテン抗体のアフィニティは、タンパク質のような高分子量抗原のものより低いことが多い。その理由は、それらが小さくかつ疎水性であり、抗体結合部位 (パレート) と相互作用できる官能基をわずかし提供しないことにある。さらにまた、ディスプレイライブラリーからのハプテン特異的抗体の単離も、「バイオパニング」ステップに際してターゲットを固定化するために分子の化学修飾が必要であることが、妨げになる。

40

【0013】

ハプテン特異的結合タンパク質の概念は最近、工学的に操作されたりガンド結合タンパク質 (いわゆる「抗体模倣物」) にも及んでいることに触れておくべきである。これについては、ジギタリス中毒時のジゴキシン解毒剤として適切な、ジゴキシゲニン結合性の工

50

学的に操作されたりボカリン（アンチカリン）が記載されている（Schlehuber S. および Skerra A., Drug Discov. Today 2005; 10 (1): 23-33）。

【0014】

ここでは、構造式 1 を含む FXa 阻害剤に対して高いアフィニティで結合する、抗体、その抗原結合性抗体フラグメント、もしくはその変異体（variant）、または抗体模倣物を提供する。また、これらの化合物の薬理学的効果の解消を目標とする、抗体、抗原結合性抗体フラグメントおよび抗体模倣物に基づく治療法も提供する。また、診断目的での血液試料中のこれら FXa 阻害剤の機能的中和を目標とする、抗体、抗原結合性抗体フラグメントおよび抗体模倣物に基づく方法も提供する。

10

【課題を解決するための手段】

【0015】

〔概要〕

凝固因子の治療的阻害剤を中和し、それゆえに治療目的および／または診断目的でのそれらの抗凝固活性の解消に役立つ、抗体、もしくはその抗原結合性抗体フラグメント、または抗体模倣物を提供することが、本発明の目的である。

【0016】

式 1 に記載の構造要素を含有する凝固第 Xa 因子（FXa）の治療的阻害剤（例えばリバーロキサバン）に結合し、それゆえに治療目的および／または診断目的でのそれらの抗凝固活性の解消に役立つ、ヒト抗体、もしくはその抗原結合性抗体フラグメント、または抗体模倣物を提供することが、本発明のさらにもう一つの目的である。

20

【0017】

本発明は、他の FXa 阻害剤に結合しない、式 1 の基を含む化合物に特異的な抗体またはそのフラグメントを、抗体ファージディスプレイの方法によって同定することができたという、驚くべき発見に基づいている。したがって、特異的解毒剤として役立つこれらの抗体では、必要であれば、それら他の FXa 阻害剤で処置対象の抗凝固を再開することが可能になる。

【0018】

本発明の第 1 の態様によれば、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用に基づいてリバーロキサバンを表面に固定化することができるようにする、リバーロキサバンの誘導体を合成することが可能であった。リバーロキサバンおよびその誘導体の固定化は、ファージライブラリーからの抗体の選択（ファージパニング）、ならびに ELISA フォーマットでの特異的抗体のスクリーニングおよび分析にとって、必要条件である。

30

【0019】

本発明の第 2 の態様によれば、 $K_D < 500 \text{ nM}$ のアフィニティと、リバーロキサバンで阻害された生化学的 FXa アッセイにおいて、 $EC_{50} < 2 \mu\text{M}$ の半数効果濃度（ EC_{50} ）とを有する、抗体および抗体フラグメントを同定することが可能であった。

【0020】

本発明の第 3 の態様によれば、アピキサバン、エドキサバンまたはラザキサバンのような他の FXa 阻害剤とは交差反応しない、式 1 に記載する構造要素を含有する化合物に特異的な抗体およびその抗体フラグメントを同定することが可能であった。

40

【0021】

本発明は、抗凝固剤治療を受けている対象における凝固阻害剤の効果を、有効量の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物をその対象に投与することによって、選択的に中和する治療方法に関する。

【0022】

本発明の一実施形態は、表 1 に示す単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントに向けられる。

【0023】

もう一つの態様では、抗体もしくはその抗原結合性抗体フラグメント、または抗体模倣

50

物が、血漿中半減期（または循環半減期）を延長する能力を有する薬剤と共投与される。さらにもう一つの態様では、抗体、もしくはその抗原結合性抗体フラグメント、または抗体模倣物が、その血漿中半減期を延長するために、それ自身に、または他の部分にコンジュゲートされる。

【0024】

抗体、その抗原結合性フラグメント、または抗体模倣物を含有する医薬組成物も提供する。

【0025】

もう一つの態様において、本発明は、FXa阻害剤の抗凝固活性の実質的な中和が必要な場合に使用するための、リバーロキサバンと表1に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメントとを含むキットを提供する。

10

【0026】

さらなる一実施形態では、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離された原核宿主細胞または真核宿主細胞が提供される。

【0027】

本発明のこれらの、そして他の、特徴、態様、および利点は、以下の説明および特許請求の範囲を参照すれば、より良く理解されることになるであろう

【0028】

本発明の抗体は、IgG（例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄）であることができ、一方、抗原結合性抗体フラグメントは、例えばFab、Fab'、F(ab')₂またはscFvであることができる。したがって本発明の抗原結合性抗体フラグメントは、本明細書に記載する1つ以上の挙動を示す抗原結合領域であるか、またはそのような抗原結合領域を含有しうる。

20

【0029】

本発明は、単離された核酸配列であって、そのそれぞれが、式1の基を含む化合物に特異的である上述の抗体またはその抗原結合性フラグメントをコードすることができるものにも関係する。本発明の核酸は、抗体または抗原結合性抗体フラグメントの組換え生産に適している。したがって本発明は、本発明の核酸配列を含有するベクターおよび宿主細胞にも関係する。

【0030】

本発明の組成物は、治療的、予防的または診断的応用に使用しうる。それゆえ、本発明には、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントと、そのための医薬上許容される担体または賦形剤とを含む医薬組成物が包含される。関連する一態様では、本発明は、リバーロキサバンの望ましくない存在に関連する状態においてリバーロキサバンを中和する方法を提供する。好ましい一実施形態では、上述の状態が、患者における抗凝固効果の迅速な解消が（例えば緊急の侵襲的手技が必要であるために）要求される状況である。そのような方法は、有効量の、本明細書に記載の医薬組成物、または本明細書において考慮される医薬組成物を、その必要がある対象に投与するステップを含む。

30

【0031】

本発明の抗体、その抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物は、FXa阻害剤の存在および／または量を決定するための診断方法に使用することができる。

40

【0032】

本発明は、抗体ライブラリーを使って、式1によって記述される構造コンポーネントを含有する化合物に特異的に結合する、かかるライブラリーの1つ以上のメンバーを単離するための指示も提供する。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】図1は生化学的FXaアッセイにおけるFab M18-G08-G-DKTH Tによるリバーロキサバンの機能的中和の結果を示す（実施例4に記載）。リバーロキサバンの中和に関するFabの機能的力価を評価するために、生化学的FXaアッセイを行

50

った。一連の濃度の F a b を蛍光原性 F X a 基質と予め混合してから、F X a (0 . 0 5 n M) とリバーロキサパン (0 . 6 n M 、 I C ₇₅) の予混合溶液に加えた。50 分間記録した反応進行曲線を解析したところ、F a b M18-G08-G-DKTHHT によるリバーロキサパン誘導性 F X a 阻害の解消に関して、6 n M の E C ₅₀ が得られた。x 軸：t (分) 、y 軸：相対蛍光単位；点線：緩衝液；黒塗りの三角：第 X a 因子対照；黒塗りの四角：第 X a 因子 + 0 . 6 n M リバーロキサパン；菱形：第 X a 因子 + 0 . 6 n M リバーロキサパン + 0 . 46 n M F a b バー：第 X a 因子 + 0 . 6 n M リバーロキサパン + 1 . 4 n M F a b 十字：第 X a 因子 + 0 . 6 n M リバーロキサパン + 4 . 1 n M F a b 白抜きの丸：第 X a 因子 + 0 . 6 n M リバーロキサパン + 12 n M F a b 円：第 X a 因子 + 0 . 6 n M リバーロキサパン + 37 n M F a b 星印：第 X a 因子 + 0 . 6 n M リバーロキサパン + 110 n M F a b 白抜きの三角：第 X a 因子 + 0 . 6 n M リバーロキサパン + 330 n M F a b 。

【図 2】図 2 は 0 . 5 μ M F a b M18-G08-G-DKTHHT へのさまざまな濃度のリバーロキサパンの結合を記述するローゼンタールスキャッチャードプロットを示す (実施例 7 に記載) 。限外濾過後に M18-G08-G-DKTHHT の存在下でリバーロキサパンの未結合濃度 (未結合率 (fraction unbound) = f u) を決定することにより、リバーロキサパンに対する M18-G08-G-DKTHHT の K_D 値を決定することが可能になる。ローゼンタールスキャッチャードプロットの傾きから約 0 . 48 n M の K_D 値が算出された。Y 軸：(結合率 (fraction bound)) / (未結合率) ；X 軸：(結合率) × (リバーロキサパンの濃度 [μ M]) 。

【図 3】図 3 は 0 . 1 μ M リバーロキサパンの非存在下 (図 3 a) または存在下 (図 3 b ~ d) 、F a b M18-G08-G-DKTHHT ありまたはなし (0 μ M (図 3 b) 、0 . 09 μ M (図 3 c) および 0 . 72 μ M (図 3 d)) での、ヒト乏血小板血漿におけるトロンビン生成アッセイからの結果を示す (実施例 8 に記載) 。M18-G08-G-DKTHHT は、ヒト血漿におけるトロンビン生成に対するリバーロキサパンの効果を、濃度依存的に中和すると結論づけることができる。

【図 4】図 4 は 0 . 1 μ M S A T I の非存在下 (図 4 a) または存在下 (図 4 b ~ d) 、F a b M18-G08-G-DKTHHT ありまたはなし (0 μ M (図 4 b) 、0 . 09 μ M (図 4 c) および 0 . 72 μ M (図 4 d)) での、ヒト乏血小板血漿におけるトロンビン生成アッセイからの結果を示す (図 8 に記載) 。M18-G08-G-DKTHHT は、ヒト血漿におけるトロンビン生成に対する S A T I の効果を、濃度依存的に中和すると結論づけることができる (X 軸：時間 [分] ；Y 軸：トロンビン [n M]) 。

【図 5】図 5 はあらゆる F X a 阻害剤の非存在下、F a b M18-G08-G-DKTHHT ありまたはなし (0 μ M (図 5 a) 、0 . 09 μ M (図 5 b) および 0 . 72 μ M (図 5 c)) での、ヒト乏血小板血漿におけるトロンビン生成アッセイからの結果を示す (実施例 8 に記載) 。M18-G08-G-DKTHHT それ自体はヒト血漿におけるトロンビン生成になんの効果も有しないと結論づけることができる (X 軸：時間 [分] ；Y 軸：トロンビン [n M]) 。

【図 6】図 6 は 0 . 05 μ M リバーロキサパンの存在下、一連の濃度の F a b M18-G08-G-DKTHHT なしまたはあり (0 ~ 1000 n M) での、血漿に基づく F X a アッセイからの結果を示す (実施例 9 に記載) 。一連の濃度の M18-G08-G-DKTHHT が、ヒト血漿における F X a に対するリバーロキサパンの阻害効果を強力に解消することを実証することができた。X 軸：M18-G08-G-DKTHHT [n M] ；Y 軸：F X a 活性 [%] ；黒いバー：対照 (リバーロキサパンなし、M18-G08-G-DKTHHT なし) ；灰色のバー：M18-G08-G-DKTHHT なし；チェック模様のバー：一連の濃度 [n M] の M18-G08-G-DKTHHT、左から右へ：0 . 01 - 0 . 1 - 1 - 10 - 100 - 1000 。

【図 7】図 7 はそれぞれ 0 . 17 μ M (白抜きの記号) および 0 . 33 μ M (黒塗りの記号) のリバーロキサパンの存在下での、ヒト血漿におけるプロトロンビン (P T) アッセイからの結果を示す (実施例 10 に記載) 。一連の濃度の M18-G08-G-DKTH

10

20

30

40

50

Tがヒト血漿におけるPTに対するリバーロキサバンの阻害効果を強力に解消することを実証することができた。(X軸:M18-G08-G-DKTH Tの濃度[log M]; Y軸:プロトロンビン時間[秒]; データは最終アッセイ濃度を5回の実験の平均±semと共に表している)。

【図8】図8はそれぞれ0.4 μM (白抜きの記号) および0.8 μM (黒塗りの記号) のリバーロキサバンの存在下での、ラット血漿におけるプロトロンビン (PT) アッセイからの結果を示す(実施例10に記載)。一連の濃度のM18-G08-G-DKTH Tがヒト血漿におけるPTに対するリバーロキサバンの阻害効果を強力に解消することを実証することができた。(X軸:M18-G08-G-DKTH Tの濃度[log M]; Y軸:プロトロンビン時間[秒]; データは、データは最終アッセイ濃度を5回の実験の平均±semと共に表している)。

【図9】図9は精製非還元(−)および還元(+) FabフラグメントM18-G08-G-DKTH TのSDS-PAGEを表す。精製は実施例16において説明する。LC=軽鎖、HC=重鎖、Fab=インタクトなFabフラグメント、右端のレーンはPrecision All Blue分子量マーカー(BioRad)である。

【図10】図10はリバーロキサバンの経口投与(時点0)および1.5時間から2.5時間までの1時間にわたるM18-G08-G-DKTH Tの注入(チェック模様の四角)後に、ラット血漿におけるPTをエクスピボでアッセイした、ラットPK/PD研究の結果を示す(実施例17に記載)。迅速かつ持続的なPT値の正常化を実証することができた(X軸:リバーロキサバンの経口投与後の時間(単位:時間); Y軸:プロトロンビン時間(単位:秒); データは5匹の平均±semを表している)。黒塗りの四角:媒体対照; 白抜きの四角:リバーロキサバン(1.5 mg/kg); 黒塗りの三角:リバーロキサバン(1.5 mg/kg)+M18-G08-G-DKTH T(85 mg/kg)。

【図11】図11は1.5 mg/kg リバーロキサバンの経口投与と、リバーロキサバン投与の1.5時間後から開始して1時間にわたる85 mg/kg Fab M18-G08-G-DKTH Tの注入後の、ラット血漿における未結合リバーロキサバンの濃度/時間プロファイルを示す(実施例18に記載)。この研究は、意識下のラット(破線)と麻酔下のラット(点線)の両方で行った。対照ラット(麻酔下)では、リバーロキサバンだけを投与した(実線)。M18-G08-G-DKTH Tの注入に続いて起こる未結合リバーロキサバンの血漿濃度の迅速な低下が実証されている。いくつかの試料については、未結合リバーロキサバンの濃度を決定することができなかった、なぜなら、それらの値は定量下限(LLoQ; 灰色の水平方向の線)未満だったからである。X軸:時間(単位:時間); Y軸:未結合リバーロキサバンの濃度(単位:μg/L)。

【図12】図12は麻酔下のラットにおける、リバーロキサバン(1 mg/kg i.v.)によって延長された累積尾出血時間に対するM18-G08-G-DKTH Tの効果を示す(実施例19に記載)。107.5 mg/kgの等モル用量のM18-G08-G-DKTH Tが、リバーロキサバンによって延長された出血時間を、ほとんど正常値まで有意に短縮することを、実証することができた。水平方向のバーは群中央値を示す。p値は、クラスカル・ウォリス検定後のダンの多重比較による。黒塗りの四角:無処置; 黒塗りの丸:リバーロキサバン(1 mg/kg); 白抜きの丸:リバーロキサバン(1 mg/kg)+M18-G08-G-DKTH T(107.5 mg/kg); Y軸:累積出血時間(単位:秒)。

【図13】図13はスティックで示されたリバーロキサバンと複合体を形成しているFab M18-G08-G-DKTH Tの模式図を表す(実施例21に記載)。

【図14】図14はFab M18-G08-G-DKTH Tとリバーロキサバンの結合および相互作用を表す(実施例21に記載)。

【図15】図15は競合ELISAの結果を示す(実施例22に記載)。固定された量のFab M18-G08-G-DKTH Tを、さまざまな濃度のリバーロキサバンと共にプレインキュベートし、コーティングされた実施例1Kからの化合物へのFabの残存結合量を決定した。X軸:リバーロキサバンの濃度(単位:μM); Y軸:OD₄₀₅シグ

10

20

30

40

50

ナル。

【図16】図16は3 μ Mアピキサバンの非存在下（図16a）または存在下（図16b～d）、Fab M18-G08-G-DKTH Tありまたはなし（0 μ M（図16b）、1.43 μ M（図16c～d）および0.1 μ Mリバーロキサバン（図16d））での、ヒト乏血小板血漿におけるトロンビン生成アッセイからの結果を示す（実施例23に記載）。M18-G08-G-DKTH Tはアピキサバンの抗凝固効果に影響を及ぼさないことがわかる（X軸：時間 [分]；Y軸：トロンビン [nM]）。

【図17】図17は0.75 μ Mダビガトランの非存在下（図17a）または存在下（図17b～d）、Fab M18-G08-G-DKTH Tありまたはなし（0 μ M（図17b）、0.72 μ M（図17c～d）および0.1 μ Mリバーロキサバン（図17d））での、ヒト乏血小板血漿におけるトロンビン生成アッセイからの結果を示す（実施例23に記載）。M18-G08-G-DKTH Tはダビガトランの抗凝固効果に影響を及ぼさないことを見てとることができる（X軸：時間 [分]；Y軸：トロンビン [nM]）。

【発明を実施するための形態】

【0034】

[発明の詳細な説明]

本発明は、式1の基を含む化合物を含むFXa阻害剤に特異的であるか、またはそのようなFXa阻害剤に対して高いアフィニティを有し、対象に治療上の利益を与えることができる、抗体および抗体フラグメントの発見に基づいている。本発明の抗体は、ヒト、ヒト化またはキメラでありうる。以下に例を挙げて本発明をさらに例解するが、これらの例は、決して、特許請求の範囲に記載する本発明の範囲を限定しようとするものではない。

【0035】

I. 定義

「ヒト」抗体またはその抗原結合性フラグメントは、キメラではなく（例えば「ヒト化」されておらず）、（全体または一部が）非ヒト種に由来するものでもないものと、ここに定義される。ヒト抗体またはその抗原結合性フラグメントはヒトに由来するか、または合成ヒト抗体であることができる。「合成ヒト抗体」は、ここでは、既知のヒト抗体配列の解析に基づく合成配列からインシリコで全体または一部が導き出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解析し、そこから得られたデータを利用してポリペプチド配列を考案することによって達成することができる。ヒト抗体またはその抗原結合性フラグメントのもう一つの例は、ヒト起源の抗体配列のライブラリー（例えば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ものである）から単離された核酸によってコードされるものである。ヒト抗体の例にはSoederlinら, Nat. Biotechnol. 2000, 18(8):853-856に記載の抗体がある。

【0036】

「ヒト化抗体」またはそのヒト化抗原結合性フラグメントは、ここでは、（i）非ヒト源（例えば異種免疫系を保持するトランスジェニックマウス）に由来し、その抗体がヒト生殖細胞系配列に基づくもの、（ii）非ヒト抗体のフレームワーク領域のアミノ酸が遺伝子工学によって部分的にヒトアミノ酸配列に交換されているもの、または（iii）可変ドメインのCDRが非ヒト起源のものであると共に、可変ドメインの1つ以上のフレームワークがヒト起源のものであり、かつ定常ドメインが（もしあるなら）ヒト起源のものであるCDR移植体と定義される。

【0037】

「キメラ抗体」またはその抗原結合性フラグメントは、ここでは、可変ドメインが非ヒト起源に由来し、一部または全ての定常ドメインがヒト起源に由来するものと定義される。

【0038】

本明細書において使用する用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集

10

20

30

40

50

団から得られる抗体を指す、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、微量に存在するかもしれない予想されうる変異、例えば自然に生じる変異を除けば、同一である。したがって、「モノクローナル」という用語は、別々の抗体の混合物ではないというその抗体の特徴を示している。典型的には異なる決定基（エпитープ）を指向する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を指向する。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、典型的には他の免疫グロブリンが混入していないという点で有利である。

「モノクローナル」という用語が、何らかの特定の方法による抗体の生産を要求していると解釈してはならない。モノクローナル抗体という用語は、特にキメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体を包含する。

10

【0039】

本明細書において、目的の抗原、例えば低分子ハプテン（ここでは、構造式1を含むFXa阻害剤、例えばリバーロキサパン）「に特異的に結合する」、または「に／に対して特異的である」、または「を特異的に認識する」抗体とは、血漿試料中のそのターゲットを中和するのに治療剤として役立ち、かつ式1に記載の構造コンポーネントを含有するものの以外の他のFXa阻害剤と有意に交差反応しないような形で、その抗原に十分なアフィニティで結合する抗体である。本明細書において、特定のターゲット「を特異的に認識する」または「に特異的に結合する」または「に／に対して特異的である」という用語は、例えば、抗原に対して約 10^{-4} M未満、あるいは約 10^{-5} M未満、あるいは約 10^{-6} M未満、あるいは約 10^{-7} M未満、あるいは約 10^{-8} M未満、あるいは約 10^{-9} M未満、あるいは約 10^{-10} M未満、あるいは約 10^{-11} M未満、あるいは約 10^{-12} M未満、またはそれ以下の一価 K_D を有する抗体またはその抗原結合性フラグメントによって示すことができる。抗体は、その抗体が、ある抗原と1つ以上の参照抗原とを識別することができるのであれば、そのような抗原「に特異的に結合する」または「に／に対して特異的である」または「を特異的に認識する」。その最も一般的な形態において、「特異的結合」、「に特異的に結合する」、「に／に対して特異的である」または「を特異的に認識する」とは、例えば以下の方法の一つに従って決定される、目的の抗原と無関係な抗原とを識別する抗体の能力を指している。そのような方法には、ウェスタンブロット、ELISA試験、RIA試験、ECL試験、IRMA試験およびペプチドスクランが含まれるが、これらに限るわけではない。例えば標準的なELISAアッセイを行うことができる。スコア化は標準的な発色（例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼを伴う二次抗体およびテトラメチルベンジジンと過酸化水素）によって行いうる。一定のウェルにおける反応を、例えば450 nmなどにおける光学密度によってスコア化する。典型的バックグラウンド（＝陰性反応）は0.1 ODでありうる、また、典型的な陽性反応は1 ODでありうる。これは、陽性／陰性の差が5倍、10倍、50倍、好ましくは100倍以上であることを意味する。典型的には、結合特異性の決定は、単一の参照抗原ではなく、およそ3～5個の無関係な抗原のセット、例えば粉乳、BSA、トランスフェリンなどを使って行われる。

20

30

【0040】

「結合アフィニティ」とは、ある分子の単一の結合部位とその結合パートナーの間の非共有結合的相互作用の総和の強さを指す。別段の表示がない限り、本明細書にいう「結合アフィニティ」とは、結合ペアのメンバー（例えば抗体と抗原）の間の1：1相互作用を反映する固有の結合アフィニティを指す。解離定数「 K_D 」は、ある分子（例えば抗体）とその結合パートナー（例えば抗原）の間のアフィニティ、すなわちリガンドが特定のタンパク質にどれくらい強固に結合するかを記述するために、よく使用されている。リガンド-タンパク質アフィニティは、2つの分子の間の非共有結合的分子間相互作用によって左右される。アフィニティは、本明細書において記述するものなど、当技術分野において知られている一般的な方法によって測定することができる。一実施形態において、本発明の「 K_D 」または「 K_D 値」は、実施例5に従い、Biacore T100計器（GE Healthcare Biacore, Inc.）を用いる表面プラズモン共鳴ア

40

50

ッセイを使用することによって測定される。解離平衡定数 (K_D) は、Biacore Evaluation Software を使ってセンソグラムを一次 1:1 結合モデルに当てはめることによって得られる会合速度定数 (k_{on}) および解離速度定数 (k_{off}) の比に基づいて計算した。他の適切なデバイスは、BIACORE (登録商標) 2000、BIACORE (登録商標) 3000 (Biacore, Inc.、ニュージャージー州ピスカタウェイ)、または ProteOn XPR36 計器 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) である。

【0041】

もう一つの実施形態では、本発明の「 K_D 」または「 K_D 値」が、実施例 6 に従い、制御および解析ソフトウェアを使った等温滴定熱量測定 (ITC) (Microcal/G E Healthcare、ドイツ・フライブルク) を使用することによって測定される。溶解状態で結合反応中に放出される熱を経時的にモニタリングし、解析ソフトウェアを使って熱力学的データを解析することで、 K_D 値を見積もる。実施例 6 による、制御および解析ソフトウェアを使った等温滴定熱量測定 (Microcal/G E Healthcare、ドイツ・フライブルク)。

【0042】

さらなる一実施形態では、本発明の「 K_D 」または「 K_D 値」が、溶解状態にある固定された量の抗体または抗体フラグメントの存在下で、抗原の未結合濃度を測定することによって決定される。 K_D 値は、実施例 7 に従い、ローゼンタールスキャッチャードプロットを使って計算される。この方法では、X 軸が結合リガンドの濃度であり、Y 軸が未結合リガンドの濃度で割った結合リガンドの濃度である。 K_D は傾きの負の逆数に等しいので、ローゼンタールスキャッチャードプロットから K_D を見積もることができる。

【0043】

本明細書において使用する用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、好ましくは、典型的にはジスルフィド結合によって互いに連結された 4 本のポリペプチド鎖、すなわち 2 本の重 (H) 鎖と 2 本の軽 (L) 鎖から構成されるものを指すものとする。各重鎖は、重鎖可変領域 (本明細書では VH と略記する) と重鎖定常領域とから構成される。重鎖定常領域は、例えば 3 つのドメイン CH1、CH2 および CH3 を含む。各軽鎖は軽鎖可変領域 (本明細書では VL と略記する) と軽鎖定常領域とから構成される。軽鎖定常領域は 1 つのドメイン (CL) から構成される。VH 領域と VL 領域はさらに、相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる超可変領域と、その中に散在していて、フレームワーク領域 (FR) と呼ばれる、より保存された領域とに細分することができる。各 VH および VL は、典型的には、3 つの CDR と最大 4 つの FR とから構成され、それらがアミノ末端からカルボキシ末端に向かって、例えば次の順序で配置されている: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

【0044】

本明細書において使用する用語「相補性決定領域」(CDR; 例えば CDR1、CDR2、および CDR3) は、抗体可変ドメインのアミノ酸残基であって、その存在が抗原結合にとって必要なものを指す。各可変ドメインは、典型的には、CDR1、CDR2 および CDR3 と同定される 3 つの CDR 領域を有する。各相補性決定領域は、Kabata 定義した「相補性決定領域」(例えば、おおよそ、軽鎖可変ドメイン中の残基 24~34 (L1)、50~56 (L2) および 89~97 (L3)、ならびに重鎖可変ドメイン中の 31~35 (H1)、50~65 (H2) および 95~102 (H3); (Kabata「Sequences of Proteins of Immunological Interest」第 5 版、公衆衛生局、米国国立衛生研究所、メリーランド州ベセスダ (1991))) からのアミノ酸残基および/または「超可変ループ」(例えば、おおよそ、軽鎖可変ドメイン中の残基 26~32 (L1)、50~52 (L2) および 91~96 (L3)、ならびに重鎖可変ドメイン中の 26~32 (H1)、53~55 (H2) および 96~101 (H3) (Chothia および Lesk; J Mol Biol 196: 901-917 (1987))) からの残基を含む。いくつかの例で

は、相補性決定領域は、K a b a t の定義による C D R 領域と超可変ループとの両方からのアミノ酸を含むことができる。

【0045】

インタクトな抗体は、その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、異なる「クラス」に割り当てることができる。インタクトな抗体には5つの主要クラス、すなわち I g A、I g D、I g E、I g G、および I g M があり、これらのうちいくつかは、さらに「サブクラス」（アイソタイプ）、例えば I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、および I g A 2 に分割することができる。異なる抗体クラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、[アルファ]、[デルタ]、[イプシロン]、[ガンマ]、および [ミュー] と呼ばれる。クラスの異なる免疫グロブリンのサブユニット構造と三次元コンフ

10

【0046】

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、ここに、抗原結合領域を保っている抗体／免疫グロブリンのフラグメント（例えば I g G の可変領域）と定義される。抗体の「抗原結合領域」は、典型的には、抗体の1つ以上の超可変領域、例えば C D R 1、2、および／または3領域中に見いだされるが、可変「フレームワーク」領域も、例えば C D R に足場を提供することなどによって、抗原結合に重要な役割を果たしうる。「抗原結合領域」は、好ましくは、少なくとも可変軽（V L）鎖のアミノ酸残基 4～103 と可変重（V H）鎖の 5～109、より好ましくは、V L のアミノ酸残基 3～107 と V H の 4～111 を含み、特に好ましいのは完全な V L 鎖と V H 鎖（V L のアミノ酸位置 1～109 および V H の 1～113；W O 97/08320 によるナンバリング）である。

20

【0047】

本発明の「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、F a b、F a b'、F（a b'）₂、および F v フラグメント；ダイアボディ（d i a b o d y）；単ドメイン抗体（D A b）、線状抗体（l i n e a r a n t i b o d y）；単鎖抗体分子（s c F v）；および抗体フラグメントから形成された多重特異性（例えば二重特異性および三重特異性）抗体を包含する（C. A. K B o r r e b a e c k 編（1995）「A n t i b o d y E n g i n e e r i n g」（B r e a k t h r o u g h s i n M o l e c u l a r B i o l o g y）、O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s；R. K o n t e r m a n n および S. D u e b e l 編（2001）「A n t i b o d y E n g i n e e r i n g」（S p r i n g e r L a b o r a t o r y M a n u a l）、S p r i n g e r V e r l a g）。「多重特異性」抗体または「多機能」抗体以外の抗体は、その結合部位のそれぞれが同一であると理解される。F（a b'）₂ または F a b は、C H 1 ドメインと C L ドメインの間に存在する分子間ジスルフィド相互作用が最小になるようにまたは完全に除去されるように、工学的に操作することができる。本発明における使用にとって好ましい抗原結合性フラグメントのクラスは F a b フラグメントである。

30

【0048】

本発明の抗体およびその抗原結合性フラグメントは、多数の健常ボランティアの抗体から単離されたアミノ酸配列に基づく組換え抗体ライブラリーに由来しうる。n-C o D e R（登録商標）技術を使って、完全にヒトの C D R を新しい抗体分子に組み換える（S o e d e r l i n g ら、N a t. B i o t e c h. 2000, 18:853-856）。このユニークな組換えプロセスにより、ライブラリーは、ヒト免疫系によって天然に作り出されうる抗体よりもさらに多様な抗体を含有することが可能になる。

40

【0049】

本明細書において使用する用語「エピトープ」は、免疫グロブリンまたは T 細胞受容体に特異的に結合する能力を有する任意の構造決定基を包含する。エピトープ決定基は通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子またはそれらの組み合わせの化学的に活性な表面グル

50

ープからなり、通常は特異的な三次元構造特徴と、特異的な電荷特徴とを有している。2つの抗体は、当業者に周知の方法のいずれかによって、一方の抗体が競合結合アッセイにおいても一つの抗体と競合することが示されるのであれば、「同じエピトープに結合する」という。

【0050】

「単離された」抗体は、同定され、それを発現する細胞のコンポーネントから分離された抗体である。細胞の夾雑コンポーネントは、抗体の診断的または治療的使用を妨害するであろう物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を含みうる。好ましい実施形態では、抗体が、(1)例えばローリー法、UV-Vis分光法、SDS-キャピラリーゲル電気泳動(例えばCaliper LabChip GXII、GX90またはBiorad Bioanalyzerデバイスによるもの)などによる決定で、95重量%を上回る抗体になるまで、さらに好ましい実施形態では99重量%を上回るまで精製されるか、(2)少なくとも15残基のN末端アミノ酸配列または内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度にまで精製されるか、または(3)還元条件下もしくは非還元条件下に、クーマシーブルーを使用するか、好ましくは銀染色を使用して、SDS-PAGEで単一バンドになるまで精製される。単離された天然抗体には、組換え細胞内にインサイチュで抗体を包含する、というのも、その抗体の天然環境のコンポーネントのうち、少なくとも1つは存在しないであろうからである。しかし通常は、単離された抗体は、少なくとも1つの精製ステップによって調製されるであろう。

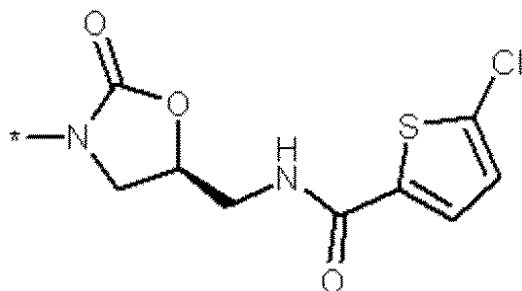
【0051】

参照ポリヌクレオチド配列または参照ポリペプチド配列に関して、それぞれ「パーセント(%)配列同一性」とは、最大のパーセント配列同一性が得られるように配列をアラインメントし、必要であればギャップを導入した後に、それぞれ参照ポリヌクレオチド配列または参照ポリペプチド配列中のそれぞれ核酸残基またはアミノ酸残基と同一である候補配列中のそれぞれ核酸残基またはアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。保存的置換は配列同一性の一部とはみなされない。好ましいのはギャップなしのアラインメントである。パーセントアミノ酸配列同一性を決定するためのアラインメントは、当技術分野の技能の範囲内にあるさまざまな方法で、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使って、達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含めて、配列をアラインメントするための適当なパラメータを決定することができる。

【0052】

「構造式1を含むFXa阻害剤」は、式1の基を含む化合物によって定義される

【化1】



式1

[式中、*は、化合物の残りの部分への取り付け部位である]。

【0053】

「構造式2を含むFXa阻害剤」は、式2の基を含む化合物によって定義される

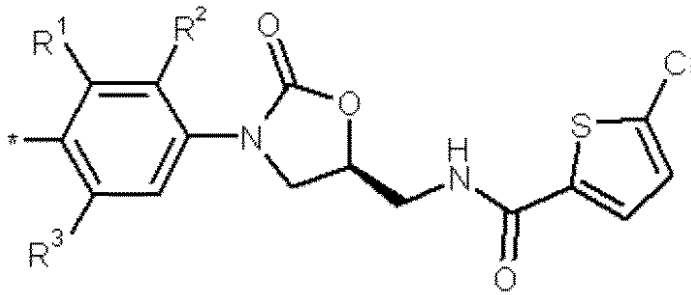
10

20

30

40

【化 2】



式 2

10

〔式中、

R¹ は水素であり、R² は水素であり、かつ R³ は水素であるか、
または、

R¹ はメチルであり、R² は水素であり、かつ R³ はメチルであるか、
または、

R¹ は水素であり、R² はフルオロであり、かつ R³ は水素であり、
ならびに、

* は、化合物の残りの部分への取り付け部位である〕。

【0054】

凝固阻害剤の活性を「中和する」(neutralize)、「解消する」(reverse)、「排除する」(eliminate)もしくは「正常化する」(normalize)またはそれに類する語句は、該阻害剤の阻害機能または抗凝固機能を阻害または遮断することを指す。これらの語句は、インビトロおよび／またはインビボでの、該阻害剤の機能の部分的阻害または遮断を指すと共に、該阻害剤の活性の大半または全てを阻害または遮断することも指す。好ましい一実施形態では、凝固阻害剤が実質的に中和され、これは、該凝固阻害剤を直接的または間接的に阻害するその能力が、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%、低減されることを意味する。

20

【0055】

「抗体模倣物」は、アフィボディ (Affibody)、アドネクチン (Adnectin)、アンチカリン、DARPin、アビマー (Avimer)、ナノボディ (Nanobody) (Gebauer M. ら, Curr. Opinion in Chem. Biol. 2009; 13:245-255; Nuttall S. D. ら, Curr. Opinion in Pharmacology 2008; 8:608-617に総説がある) およびアプタマー (Aptamer) (Keefe AD. ら, Nat. Rev. Drug Discov. 2010; 9:537-550に総説がある) である。

30

【0056】

本発明の抗体

本発明は、インビトロおよび／またはインビボで凝固の治療的阻害剤の抗凝固活性を中和するのに適した抗体およびその機能的フラグメントまたは抗体模倣物の同定および使用に関する。好ましい一実施形態では、インビトロ阻害が、PT、aPTT、トロンビン生成または生化学的アッセイで決定される。好ましい一実施形態では、インビボ阻害が尾出血実験で決定される。

40

【0057】

もう一つの実施形態は、凝固の治療的阻害剤に結合する本発明の抗体およびその機能的フラグメントまたは抗体模倣物である。

【0058】

好ましい一実施形態では、本発明の抗体およびその機能的フラグメントまたは抗体模倣

50

物が、インビトロおよび／またはインビボで、抗凝固剤に結合し、該抗凝固剤の抗凝固活性を中和する。

【0059】

好ましい一実施形態では、本発明の抗体およびその機能的フラグメントまたは抗体模倣物が、インビトロおよび／またはインビボで、抗凝固剤に結合し、該第1抗凝固剤の抗凝固活性を中和し、かつ該第1抗凝固剤ではない別の抗凝固剤を中和しない。

【0060】

好ましい一実施形態では、本発明の抗体およびその機能的フラグメントまたは抗体模倣物が、インビトロおよび／またはインビボで、抗凝固剤に特異的に結合し、該第1抗凝固剤の抗凝固活性を特異的に中和し、かつ該第1抗凝固剤ではない別の抗凝固剤を中和しない。

10

【0061】

さらなる好ましい一実施形態では、抗凝固剤が低分子、好ましくは5000Da未満、2500Da未満、より好ましくは1000Da未満の分子量を有する低分子である。好ましい抗凝固剤はFXaまたはトロンビンの阻害剤である（ダビガトラン（Sorberaら, *Drugs of the Future* 2005, 30(9):877-885およびそこで言及されている文献））。

【0062】

さらなる好ましい一実施形態では、FXa阻害剤が、式1の基を含む化合物、アピキサバン（WO2003/026652；実施例18参照）、ベトリキサバン（米国特許第6,376,515号および同第6,835,739号参照）、ラザキサバン（WO1998/057951；実施例34参照）、エドキサバン（US 2005 0020645；実施例192参照）、オタミキサバン（Guertinら, *Current Medicinal Chemistry* 2007, 14, 2471-2781およびそこで言及されている文献）またはYM-150である。

20

【0063】

さらなる好ましい一実施形態では、式1の基を含む化合物が、式2の基を含む化合物である。さらなる好ましい一実施形態では、式2の基を含む化合物が、リバーロキサバン、SATI（WO 2008/155032（実施例38）参照）および実施例1Gの化合物である。より一層好ましい一実施形態では、式2の基を含む化合物がリバーロキサバンである。

30

【0064】

好ましい一実施形態では、本発明の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物が、500nM未満、好ましくは250nM未満、100nM未満、50nM未満、またはより好ましくは25nM未満の結合アフィニティ（ K_D ）を有する。結合アフィニティは、好ましくは、実施例7に記載の方法によって決定される。

【0065】

好ましい一実施形態では、本発明の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物が、各抗凝固剤で阻害された生化学的アッセイにおいて、 $EC_{50} < 2 \mu M$ 、 $< 1 \mu M$ 、 $< 0.5 \mu M$ 、または好ましくは $< 0.01 \mu M$ の半数効果濃度（ EC_{50} ）で、抗凝固剤を中和する。好ましい一実施形態では、本発明の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物が、リバーロキサバンで阻害された生化学的FXaアッセイにおいて、抗凝固剤を、 $EC_{50} < 2 \mu M$ 、 $< 1 \mu M$ 、 $< 0.5 \mu M$ 、または好ましくは $< 0.01 \mu M$ の半数効果濃度（ EC_{50} ）で中和する。

40

【0066】

好ましい一実施形態では、本発明の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物が、抗凝固剤への結合に関して、表1の抗体、好ましくは抗体M14-G07、M18-G08、M18-G08-GまたはM18-G08-G-DKTH Tと競合する。さらなる一実施形態では、上記の競合抗体またはその抗原結合性フラグメントが、リバーロキサバンへの結合に関して、M18-G08-G-DKTH Tと競合する。

50

【0067】

さらなる一実施形態では、抗体またはその抗原結合性フラグメントが、リバーロキサバンへの結合に関して、M18-G08-G-DKTH Tと競合し、ここでは、抗体またはその抗原結合性フラグメントの結合が、a) 軽鎖の99番目のアミノ酸残基の、リバーロキサバンのクロロチオフエン部分への π スタッキング、b) 重鎖の104番目のアミノ酸残基の、リバーロキサバンのクロロチオフエン部分への疎水性スタッキング、c) 重鎖の50番目（水素結合ドナーアミノ酸）および102番目（102番目の場合はポリペプチド鎖のバックボーンアミドを介して）のアミノ酸残基の、リバーロキサバンの中央アミドへの水素結合、d) 重鎖の102番目の水素結合アクセプターアミノ酸残基の、リバーロキサバンのオキサゾールのカルボニル酸素への水素結合、およびe) 重鎖の33番目のアミノ酸残基の、リバーロキサバンのフェニル環への π スタッキングによって媒介される。

10

【0068】

もう一つのさらなる実施形態では、抗体またはその抗原結合性フラグメントが、リバーロキサバンへの結合に関して、M18-G08-G-DKTH Tと競合し、ここでは、軽鎖の99番目のアミノ酸残基が、Trp、PheおよびTyrからなる群より選択される。もう一つのさらなる実施形態では、重鎖の104番目のアミノ酸残基が疎水性アミノ酸であって、好ましくは、Ala、Val、Leu、Ile、Met、およびPheからなる群より選択される。もう一つのさらなる実施形態では、50番目のアミノ酸残基が水素結合ドナーアミノ酸残基であり、好ましくは、Ser、Thr、Tyr、Trp、His、AsnおよびGlnからなる群より選択される。もう一つのさらなる実施形態では、重鎖の102番目のアミノ酸残基が水素結合アクセプターアミノ酸であり、好ましくは、Ser、Thr、Tyr、Glu、Asp、AsnおよびGlnからなる群より選択される。もう一つのさらなる実施形態では、重鎖の33番目のアミノ酸残基が、Trp、PheおよびTyrからなる群より選択される。

20

【0069】

もう一つのさらなる実施形態では、抗体またはその抗原結合性フラグメントが、リバーロキサバンへの結合に関して、M18-G08-G-DKTH Tと競合し、ここでは、軽鎖の99番目のアミノ酸残基が、Trp、PheおよびTyrからなる群より選択され、

30

重鎖の104番目のアミノ酸残基が、Ala、Val、Leu、Ile、Met、およびPheからなる群より選択される疎水性アミノ酸であり、重鎖の102番目のアミノ酸残基が、Ser、Thr、Tyr、Glu、Asp、AsnおよびGlnからなる群より選択される水素結合アクセプターアミノ酸である。

【0070】

もう一つのさらなる実施形態では、抗体またはその抗原結合性フラグメントが、リバーロキサバンへの結合に関して、M18-G08-G-DKTH Tと競合し、ここでは、

軽鎖の99番目のアミノ酸残基がTrpであり、

重鎖の102番目のアミノ酸残基がThrまたはAsnであり、かつ

重鎖の104番目のアミノ酸残基がLeuである。

40

【0071】

もう一つのさらなる実施形態では、上記競合抗体または抗原結合性フラグメントが、リバーロキサバンへの結合に関して、M18-G08-G-DKTH Tと競合し、35番目のAsn、37番目のTyr、90番目のGln、99番目のTrp、および101番目のPhe（Fab M18-G08-G-DKTH T可変軽鎖のアミノ酸位置によるナンバリング）を含む可変軽鎖配列と、31番目のSer、33番目のTrp、35番目のSer、47番目のTrp、50番目のSer、99番目のVal、100番目のTrp、101番目のArg、102番目のAsn、103番目のTyrおよび104番目のLeu（Fab M18-G08-G-DKTH T可変重鎖のアミノ酸位置によるナンバリング）を含む可変重鎖とを有する。

50

【0072】

さらなる一実施形態では、上述の競合抗体が、それぞれM18-G08-GのVh配列およびVl配列と、少なくとも90%同一である。

【0073】

本発明の抗体、抗原結合性抗体フラグメント、ならびに抗体およびフラグメントの変異体は、軽鎖可変領域と重鎖可変領域とから構成される。本発明において考えられる抗体または抗原結合性抗体フラグメントの変異体は、抗原に対する抗体または抗原結合性抗体フラグメントの結合活性が維持されている分子である。

【0074】

この文書では、全体を通して、以下に挙げる本発明の代表的抗体またはその機能的フラグメントについて述べる：M14-G07、M18-G08、M18-G08-GおよびM18-G08-G-DKTH T。それぞれの配列（配列番号）を表1に示す。

10

【0075】

〔表1〕 抗体および各々の配列

【表 1 - 1】

抗体	説明	配列の型	配列番号
M18-G08-1	Vh	PRT	配列番号1
M18-G08-1	Vi	PRT	配列番号2
M18-G08-2	Vh	PRT	配列番号3
M18-G08-2	Vi	PRT	配列番号4
M18-G08-3	Vh	PRT	配列番号5
M18-G08-3	Vi	PRT	配列番号6
M18-G08-4	Vh	PRT	配列番号7
M18-G08-4	Vi	PRT	配列番号8
M18-G08-5	Vh	PRT	配列番号9
M18-G08-5	Vi	PRT	配列番号10
M18-G08-6	Vh	PRT	配列番号11
M18-G08-6	Vi	PRT	配列番号12
M18-G08-7	Vh	PRT	配列番号13
M18-G08-7	Vi	PRT	配列番号14
M18-G08-8	Vh	PRT	配列番号15
M18-G08-8	Vi	PRT	配列番号16
M18-G08-9	Vh	PRT	配列番号17
M18-G08-9	Vi	PRT	配列番号18
M18-G08-10	Vh	PRT	配列番号19
M18-G08-10	Vi	PRT	配列番号20
M18-G08-11	Vh	PRT	配列番号21
M18-G08-11	Vi	PRT	配列番号22
M18-G08-12	Vh	PRT	配列番号23
M18-G08-12	Vi	PRT	配列番号24
M18-G08-13	Vh	PRT	配列番号25
M18-G08-13	Vi	PRT	配列番号26
M18-G08-14	Vh	PRT	配列番号27
M18-G08-14	Vi	PRT	配列番号28
M18-G08-15	Vh	PRT	配列番号29
M18-G08-15	Vi	PRT	配列番号30
M18-G08-16	Vh	PRT	配列番号31
M18-G08-16	Vi	PRT	配列番号32
M18-G08-17	Vh	PRT	配列番号33
M18-G08-17	Vi	PRT	配列番号34
M18-G08-18	Vh	PRT	配列番号35
M18-G08-18	Vi	PRT	配列番号36
M18-G08-19	Vh	PRT	配列番号37
M18-G08-19	Vi	PRT	配列番号38
M18-G08-20	Vh	PRT	配列番号39
M18-G08-20	Vi	PRT	配列番号40
M18-G08-21	Vh	PRT	配列番号41
M18-G08-21	Vi	PRT	配列番号42
M18-G08-22	Vh	PRT	配列番号43
M18-G08-22	Vi	PRT	配列番号44
M18-G08-23	Vh	PRT	配列番号45

10

20

30

40

【表 1 - 2】

M18-G08-23	Vl	PRT	配列番号46
M18-G08-24	Vh	PRT	配列番号47
M18-G08-24	Vl	PRT	配列番号48
M18-G08-25	Vh	PRT	配列番号49
M18-G08-25	Vl	PRT	配列番号50
M18-G08-26	Vh	PRT	配列番号51
M18-G08-26	Vl	PRT	配列番号52
M18-G08-27	Vh	PRT	配列番号53
M18-G08-27	Vl	PRT	配列番号54
M18-G08-28	Vh	PRT	配列番号55
M18-G08-28	Vl	PRT	配列番号56
M18-G08-29	Vh	PRT	配列番号57
M18-G08-29	Vl	PRT	配列番号58
M18-G08-30	Vh	PRT	配列番号59
M18-G08-30	Vl	PRT	配列番号60
M18-G08-31	Vh	PRT	配列番号61
M18-G08-31	Vl	PRT	配列番号62
M18-G08-32	Vh	PRT	配列番号63
M18-G08-32	Vl	PRT	配列番号64
M18-G08-33	Vh	PRT	配列番号65
M18-G08-33	Vl	PRT	配列番号66
M18-G08-34	Vh	PRT	配列番号67
M18-G08-34	Vl	PRT	配列番号68
M18-G08-35	Vh	PRT	配列番号69
M18-G08-35	Vl	PRT	配列番号70
M18-G08-36	Vh	PRT	配列番号71
M18-G08-36	Vl	PRT	配列番号72
M18-G08-37	Vh	PRT	配列番号73
M18-G08-37	Vl	PRT	配列番号74
M18-G08-38	Vh	PRT	配列番号75
M18-G08-38	Vl	PRT	配列番号76
M18-G08-39	Vh	PRT	配列番号77
M18-G08-39	Vl	PRT	配列番号78
M18-G08-40	Vh	PRT	配列番号79
M18-G08-40	Vl	PRT	配列番号80
M18-G08-41	Vh	PRT	配列番号81
M18-G08-41	Vl	PRT	配列番号82
M18-G08-42	Vh	PRT	配列番号83
M18-G08-42	Vl	PRT	配列番号84
M18-G08-43	Vh	PRT	配列番号85
M18-G08-43	Vl	PRT	配列番号86
M18-G08-44	Vh	PRT	配列番号87
M18-G08-44	Vl	PRT	配列番号88
M18-G08-45	Vh	PRT	配列番号89
M18-G08-45	Vl	PRT	配列番号90
M18-G08-46	Vh	PRT	配列番号91
M18-G08-46	Vl	PRT	配列番号92

10

20

30

40

【表 1 - 3】

M18-G08-47	Vh	PRT	配列番号93
M18-G08-47	Vl	PRT	配列番号94
M18-G08-48	Vh	PRT	配列番号95
M18-G08-48	Vl	PRT	配列番号96
M18-G08-49	Vh	PRT	配列番号97
M18-G08-49	Vl	PRT	配列番号98
M18-G08-50	Vh	PRT	配列番号99
M18-G08-50	Vl	PRT	配列番号100
M18-G08-51	Vh	PRT	配列番号101
M18-G08-51	Vl	PRT	配列番号102
M18-G08-52	Vh	PRT	配列番号103
M18-G08-52	Vl	PRT	配列番号104
M18-G08-53	Vh	PRT	配列番号105
M18-G08-53	Vl	PRT	配列番号106
M18-G08-54	Vh	PRT	配列番号107
M18-G08-54	Vl	PRT	配列番号108
M18-G08-55	Vh	PRT	配列番号109
M18-G08-55	Vl	PRT	配列番号110
M18-G08-56	Vh	PRT	配列番号111
M18-G08-56	Vl	PRT	配列番号112
M18-G08-57	Vh	PRT	配列番号113
M18-G08-57	Vl	PRT	配列番号114
M18-G08-58	Vh	PRT	配列番号115
M18-G08-58	Vl	PRT	配列番号116
M18-G08-G	Vh	PRT	配列番号117
M18-G08-G	Vl	PRT	配列番号118
M18-G08-62	Vh	PRT	配列番号119
M18-G08-62	Vl	PRT	配列番号120
M18-G08-63	Vh	PRT	配列番号121
M18-G08-63	Vl	PRT	配列番号122
M18-G08-64	Vh	PRT	配列番号123
M18-G08-64	Vl	PRT	配列番号124
M18-G08-65	Vh	PRT	配列番号125
M18-G08-65	Vl	PRT	配列番号126
M14-G07-1	Vh	PRT	配列番号127
M14-G07-1	Vl	PRT	配列番号128
M14-G07-2	Vh	PRT	配列番号129
M14-G07-2	Vl	PRT	配列番号130
M14-G07-3	Vh	PRT	配列番号131
M14-G07-3	Vl	PRT	配列番号132
M14-G07-4	Vh	PRT	配列番号133
M14-G07-4	Vl	PRT	配列番号134
M14-G07-5	Vh	PRT	配列番号135
M14-G07-5	Vl	PRT	配列番号136
M14-G07-6	Vh	PRT	配列番号137
M14-G07-6	Vl	PRT	配列番号138
M14-G07-7	Vh	PRT	配列番号139

10

20

30

40

【表 1 - 4】

M14-G07-7	Vl	PRT	配列番号140
M14-G07-8	Vh	PRT	配列番号141
M14-G07-8	Vl	PRT	配列番号142
M14-G07-9	Vh	PRT	配列番号143
M14-G07-9	Vl	PRT	配列番号144
M14-G07-10	Vh	PRT	配列番号145
M14-G07-10	Vl	PRT	配列番号146
M14-G07-11	Vh	PRT	配列番号147
M14-G07-11	Vl	PRT	配列番号148
M14-G07-12	Vh	PRT	配列番号149
M14-G07-12	Vl	PRT	配列番号150
M14-G07-13	Vh	PRT	配列番号151
M14-G07-13	Vl	PRT	配列番号152
M14-G07-14	Vh	PRT	配列番号153
M14-G07-14	Vl	PRT	配列番号154
M14-G07-15	Vh	PRT	配列番号155
M14-G07-15	Vl	PRT	配列番号156
M14-G07-16	Vh	PRT	配列番号157
M14-G07-16	Vl	PRT	配列番号158
M14-G07-17	Vh	PRT	配列番号159
M14-G07-17	Vl	PRT	配列番号160
M14-G07-18	Vh	PRT	配列番号161
M14-G07-18	Vl	PRT	配列番号162
M14-G07-19	Vh	PRT	配列番号163
M14-G07-19	Vl	PRT	配列番号164
M14-G07-20	Vh	PRT	配列番号165
M14-G07-20	Vl	PRT	配列番号166
M14-G07-21	Vh	PRT	配列番号167
M14-G07-21	Vl	PRT	配列番号168
M14-G07-22	Vh	PRT	配列番号169
M14-G07-22	Vl	PRT	配列番号170
M14-G07-23	Vh	PRT	配列番号171
M14-G07-23	Vl	PRT	配列番号172
M14-G07-24	Vh	PRT	配列番号173
M14-G07-24	Vl	PRT	配列番号174
M14-G07-25	Vh	PRT	配列番号175
M14-G07-25	Vl	PRT	配列番号176
M14-G07-26	Vh	PRT	配列番号177
M14-G07-26	Vl	PRT	配列番号178
M14-G07-27	Vh	PRT	配列番号179
M14-G07-27	Vl	PRT	配列番号180
M14-G07-28	Vh	PRT	配列番号181
M14-G07-28	Vl	PRT	配列番号182
M14-G07-29	Vh	PRT	配列番号183
M14-G07-29	Vl	PRT	配列番号184
M14-G07-30	Vh	PRT	配列番号185
M14-G07-30	Vl	PRT	配列番号186

10

20

30

40

【表 1 - 5】

M14-G07-31	Vh	PRT	配列番号187
M14-G07-31	Vl	PRT	配列番号188
M14-G07-32	Vh	PRT	配列番号189
M14-G07-32	Vl	PRT	配列番号190
M14-G07-33	Vh	PRT	配列番号191
M14-G07-33	Vl	PRT	配列番号192
M14-G07-34	Vh	PRT	配列番号193
M14-G07-34	Vl	PRT	配列番号194
M14-G07-35	Vh	PRT	配列番号195
M14-G07-35	Vl	PRT	配列番号196
M14-G07-36	Vh	PRT	配列番号197
M14-G07-36	Vl	PRT	配列番号198
M14-G07-37	Vh	PRT	配列番号199
M14-G07-37	Vl	PRT	配列番号200
M14-G07-38	Vh	PRT	配列番号201
M14-G07-38	Vl	PRT	配列番号202
M14-G07-39	Vh	PRT	配列番号203
M14-G07-39	Vl	PRT	配列番号204
M14-G07-40	Vh	PRT	配列番号205
M14-G07-40	Vl	PRT	配列番号206
M14-G07	Vh	PRT	配列番号207
M14-G07	Vl	PRT	配列番号208
M15-B07	Vh	PRT	配列番号209
M15-B07	Vl	PRT	配列番号210
M16-A03	Vh	PRT	配列番号211
M16-A03	Vl	PRT	配列番号212
M16-D05	Vh	PRT	配列番号213
M16-D05	Vl	PRT	配列番号214
M18-A10	Vh	PRT	配列番号215
M18-A10	Vl	PRT	配列番号216
M18-G08	Vh	PRT	配列番号217
M18-G08	Vl	PRT	配列番号218
M25-E05	Vh	PRT	配列番号219
M25-E05	Vl	PRT	配列番号220
M14-G07	H-CDR1	PRT	配列番号221
M14-G07	H-CDR2	PRT	配列番号222
M14-G07	H-CDR3	PRT	配列番号223
M14-G07	L-CDR1	PRT	配列番号224
M14-G07	L-CDR2	PRT	配列番号225
M14-G07	L-CDR3	PRT	配列番号226
M15-B07	H-CDR1	PRT	配列番号227
M15-B07	H-CDR2	PRT	配列番号228
M15-B07	H-CDR3	PRT	配列番号229
M15-B07	L-CDR1	PRT	配列番号230
M15-B07	L-CDR2	PRT	配列番号231
M15-B07	L-CDR3	PRT	配列番号232
M16-A03	H-CDR1	PRT	配列番号233

10

20

30

40

【表 1 - 6】

M16-A03	H-CDR2	PRT	配列番号234
M16-A03	H-CDR3	PRT	配列番号235
M16-A03	L-CDR1	PRT	配列番号236
M16-A03	L-CDR2	PRT	配列番号237
M16-A03	L-CDR3	PRT	配列番号238
M16-D05	H-CDR1	PRT	配列番号239
M16-D05	H-CDR2	PRT	配列番号240
M16-D05	H-CDR3	PRT	配列番号241
M16-D05	L-CDR1	PRT	配列番号242
M16-D05	L-CDR2	PRT	配列番号243
M16-D05	L-CDR3	PRT	配列番号244
M18-A10	H-CDR1	PRT	配列番号245
M18-A10	H-CDR2	PRT	配列番号246
M18-A10	H-CDR3	PRT	配列番号247
M18-A10	L-CDR1	PRT	配列番号248
M18-A10	L-CDR2	PRT	配列番号249
M18-A10	L-CDR3	PRT	配列番号250
M18-G08	H-CDR1	PRT	配列番号251
M18-G08	H-CDR2	PRT	配列番号252
M18-G08	H-CDR3	PRT	配列番号253
M18-G08	L-CDR1	PRT	配列番号254
M18-G08	L-CDR2	PRT	配列番号255
M18-G08	L-CDR3	PRT	配列番号256
M25-E05	H-CDR1	PRT	配列番号257
M25-E05	H-CDR2	PRT	配列番号258
M25-E05	H-CDR3	PRT	配列番号259
M25-E05	L-CDR1	PRT	配列番号260
M25-E05	L-CDR2	PRT	配列番号261
M25-E05	L-CDR3	PRT	配列番号262
M18-G08-G	H-CDR1	PRT	配列番号263
M18-G08-G	H-CDR2	PRT	配列番号264
M18-G08-G	H-CDR3	PRT	配列番号265
M18-G08-G	L-CDR1	PRT	配列番号266
M18-G08-G	L-CDR2	PRT	配列番号267
M18-G08-G	L-CDR3	PRT	配列番号268
M18-G08-1	Vh	DNA	配列番号269
M18-G08-1	Vl	DNA	配列番号270
M18-G08-2	Vh	DNA	配列番号271
M18-G08-2	Vl	DNA	配列番号272
M18-G08-3	Vh	DNA	配列番号273
M18-G08-3	Vl	DNA	配列番号274
M18-G08-4	Vh	DNA	配列番号275
M18-G08-4	Vl	DNA	配列番号276
M18-G08-5	Vh	DNA	配列番号277
M18-G08-5	Vl	DNA	配列番号278
M18-G08-6	Vh	DNA	配列番号279
M18-G08-6	Vl	DNA	配列番号280

10

20

30

40

【表 1 - 7】

M18-G08-7	Vh	DNA	配列番号281
M18-G08-7	Vl	DNA	配列番号282
M18-G08-8	Vh	DNA	配列番号283
M18-G08-8	Vl	DNA	配列番号284
M18-G08-9	Vh	DNA	配列番号285
M18-G08-9	Vl	DNA	配列番号286
M18-G08-10	Vh	DNA	配列番号287
M18-G08-10	Vl	DNA	配列番号288
M18-G08-11	Vh	DNA	配列番号289
M18-G08-11	Vl	DNA	配列番号290
M18-G08-12	Vh	DNA	配列番号291
M18-G08-12	Vl	DNA	配列番号292
M18-G08-13	Vh	DNA	配列番号293
M18-G08-13	Vl	DNA	配列番号294
M18-G08-14	Vh	DNA	配列番号295
M18-G08-14	Vl	DNA	配列番号296
M18-G08-15	Vh	DNA	配列番号297
M18-G08-15	Vl	DNA	配列番号298
M18-G08-16	Vh	DNA	配列番号299
M18-G08-16	Vl	DNA	配列番号300
M18-G08-17	Vh	DNA	配列番号301
M18-G08-17	Vl	DNA	配列番号302
M18-G08-18	Vh	DNA	配列番号303
M18-G08-18	Vl	DNA	配列番号304
M18-G08-19	Vh	DNA	配列番号305
M18-G08-19	Vl	DNA	配列番号306
M18-G08-20	Vh	DNA	配列番号307
M18-G08-20	Vl	DNA	配列番号308
M18-G08-21	Vh	DNA	配列番号309
M18-G08-21	Vl	DNA	配列番号310
M18-G08-22	Vh	DNA	配列番号311
M18-G08-22	Vl	DNA	配列番号312
M18-G08-23	Vh	DNA	配列番号313
M18-G08-23	Vl	DNA	配列番号314
M18-G08-24	Vh	DNA	配列番号315
M18-G08-24	Vl	DNA	配列番号316
M18-G08-25	Vh	DNA	配列番号317
M18-G08-25	Vl	DNA	配列番号318
M18-G08-26	Vh	DNA	配列番号319
M18-G08-26	Vl	DNA	配列番号320
M18-G08-27	Vh	DNA	配列番号321
M18-G08-27	Vl	DNA	配列番号322
M18-G08-28	Vh	DNA	配列番号323
M18-G08-28	Vl	DNA	配列番号324
M18-G08-29	Vh	DNA	配列番号325
M18-G08-29	Vl	DNA	配列番号326
M18-G08-30	Vh	DNA	配列番号327

10

20

30

40

【表 1－8】

M18-G08-30	V1	DNA	配列番号328
M18-G08-31	Vh	DNA	配列番号329
M18-G08-31	V1	DNA	配列番号330
M18-G08-32	Vh	DNA	配列番号331
M18-G08-32	V1	DNA	配列番号332
M18-G08-33	Vh	DNA	配列番号333
M18-G08-33	V1	DNA	配列番号334
M18-G08-34	Vh	DNA	配列番号335
M18-G08-34	V1	DNA	配列番号336
M18-G08-35	Vh	DNA	配列番号337
M18-G08-35	V1	DNA	配列番号338
M18-G08-36	Vh	DNA	配列番号339
M18-G08-36	V1	DNA	配列番号340
M18-G08-37	Vh	DNA	配列番号341
M18-G08-37	V1	DNA	配列番号342
M18-G08-38	Vh	DNA	配列番号343
M18-G08-38	V1	DNA	配列番号344
M18-G08-39	Vh	DNA	配列番号345
M18-G08-39	V1	DNA	配列番号346
M18-G08-40	Vh	DNA	配列番号347
M18-G08-40	V1	DNA	配列番号348
M18-G08-41	Vh	DNA	配列番号349
M18-G08-41	V1	DNA	配列番号350
M18-G08-42	Vh	DNA	配列番号351
M18-G08-42	V1	DNA	配列番号352
M18-G08-43	Vh	DNA	配列番号353
M18-G08-43	V1	DNA	配列番号354
M18-G08-44	Vh	DNA	配列番号355
M18-G08-44	V1	DNA	配列番号356
M18-G08-45	Vh	DNA	配列番号357
M18-G08-45	V1	DNA	配列番号358
M18-G08-46	Vh	DNA	配列番号359
M18-G08-46	V1	DNA	配列番号360
M18-G08-47	Vh	DNA	配列番号361
M18-G08-47	V1	DNA	配列番号362
M18-G08-48	Vh	DNA	配列番号363
M18-G08-48	V1	DNA	配列番号364
M18-G08-49	Vh	DNA	配列番号365
M18-G08-49	V1	DNA	配列番号366
M18-G08-50	Vh	DNA	配列番号367
M18-G08-50	V1	DNA	配列番号368
M18-G08-51	Vh	DNA	配列番号369
M18-G08-51	V1	DNA	配列番号370
M18-G08-52	Vh	DNA	配列番号371
M18-G08-52	V1	DNA	配列番号372
M18-G08-53	Vh	DNA	配列番号373
M18-G08-53	V1	DNA	配列番号374

10

20

30

40

【表 1 - 9】

M18-G08-54	Vh	DNA	配列番号375
M18-G08-54	Vl	DNA	配列番号376
M18-G08-55	Vh	DNA	配列番号377
M18-G08-55	Vl	DNA	配列番号378
M18-G08-56	Vh	DNA	配列番号379
M18-G08-56	Vl	DNA	配列番号380
M18-G08-57	Vh	DNA	配列番号381
M18-G08-57	Vl	DNA	配列番号382
M18-G08-58	Vh	DNA	配列番号383
M18-G08-58	Vl	DNA	配列番号384
M18-G08-G	Vh	DNA	配列番号385
M18-G08-G	Vl	DNA	配列番号386
M18-G08-62	Vh	DNA	配列番号387
M18-G08-62	Vl	DNA	配列番号388
M18-G08-63	Vh	DNA	配列番号389
M18-G08-63	Vl	DNA	配列番号390
M18-G08-64	Vh	DNA	配列番号391
M18-G08-64	Vl	DNA	配列番号392
M18-G08-65	Vh	DNA	配列番号393
M18-G08-65	Vl	DNA	配列番号394
M14-G07-1	Vh	DNA	配列番号395
M14-G07-1	Vl	DNA	配列番号396
M14-G07-2	Vh	DNA	配列番号397
M14-G07-2	Vl	DNA	配列番号398
M14-G07-3	Vh	DNA	配列番号399
M14-G07-3	Vl	DNA	配列番号400
M14-G07-4	Vh	DNA	配列番号401
M14-G07-4	Vl	DNA	配列番号402
M14-G07-5	Vh	DNA	配列番号403
M14-G07-5	Vl	DNA	配列番号404
M14-G07-6	Vh	DNA	配列番号405
M14-G07-6	Vl	DNA	配列番号406
M14-G07-7	Vh	DNA	配列番号407
M14-G07-7	Vl	DNA	配列番号408
M14-G07-8	Vh	DNA	配列番号409
M14-G07-8	Vl	DNA	配列番号410
M14-G07-9	Vh	DNA	配列番号411
M14-G07-9	Vl	DNA	配列番号412
M14-G07-10	Vh	DNA	配列番号413
M14-G07-10	Vl	DNA	配列番号414
M14-G07-11	Vh	DNA	配列番号415
M14-G07-11	Vl	DNA	配列番号416
M14-G07-12	Vh	DNA	配列番号417
M14-G07-12	Vl	DNA	配列番号418
M14-G07-13	Vh	DNA	配列番号419
M14-G07-13	Vl	DNA	配列番号420
M14-G07-14	Vh	DNA	配列番号421

10

20

30

40

【表 1 - 1 0】

M14-G07-14	Vl	DNA	配列番号422
M14-G07-15	Vh	DNA	配列番号423
M14-G07-15	Vl	DNA	配列番号424
M14-G07-16	Vh	DNA	配列番号425
M14-G07-16	Vl	DNA	配列番号426
M14-G07-17	Vh	DNA	配列番号427
M14-G07-17	Vl	DNA	配列番号428
M14-G07-18	Vh	DNA	配列番号429
M14-G07-18	Vl	DNA	配列番号430
M14-G07-19	Vh	DNA	配列番号431
M14-G07-19	Vl	DNA	配列番号432
M14-G07-20	Vh	DNA	配列番号433
M14-G07-20	Vl	DNA	配列番号434
M14-G07-21	Vh	DNA	配列番号435
M14-G07-21	Vl	DNA	配列番号436
M14-G07-22	Vh	DNA	配列番号437
M14-G07-22	Vl	DNA	配列番号438
M14-G07-23	Vh	DNA	配列番号439
M14-G07-23	Vl	DNA	配列番号440
M14-G07-24	Vh	DNA	配列番号441
M14-G07-24	Vl	DNA	配列番号442
M14-G07-25	Vh	DNA	配列番号443
M14-G07-25	Vl	DNA	配列番号444
M14-G07-26	Vh	DNA	配列番号445
M14-G07-26	Vl	DNA	配列番号446
M14-G07-27	Vh	DNA	配列番号447
M14-G07-27	Vl	DNA	配列番号448
M14-G07-28	Vh	DNA	配列番号449
M14-G07-28	Vl	DNA	配列番号450
M14-G07-29	Vh	DNA	配列番号451
M14-G07-29	Vl	DNA	配列番号452
M14-G07-30	Vh	DNA	配列番号453
M14-G07-30	Vl	DNA	配列番号454
M14-G07-31	Vh	DNA	配列番号455
M14-G07-31	Vl	DNA	配列番号456
M14-G07-32	Vh	DNA	配列番号457
M14-G07-32	Vl	DNA	配列番号458
M14-G07-33	Vh	DNA	配列番号459
M14-G07-33	Vl	DNA	配列番号460
M14-G07-34	Vh	DNA	配列番号461
M14-G07-34	Vl	DNA	配列番号462
M14-G07-35	Vh	DNA	配列番号463
M14-G07-35	Vl	DNA	配列番号464
M14-G07-36	Vh	DNA	配列番号465
M14-G07-36	Vl	DNA	配列番号466
M14-G07-37	Vh	DNA	配列番号467
M14-G07-37	Vl	DNA	配列番号468

10

20

30

40

【表 1 - 1 1】

M14-G07-38	Vh	DNA	配列番号469
M14-G07-38	Vl	DNA	配列番号470
M14-G07-39	Vh	DNA	配列番号471
M14-G07-39	Vl	DNA	配列番号472
M14-G07-40	Vh	DNA	配列番号473
M14-G07-40	Vl	DNA	配列番号474
M14-G07	Vh	DNA	配列番号475
M14-G07	Vl	DNA	配列番号476
M15-B07	Vh	DNA	配列番号477
M15-B07	Vl	DNA	配列番号478
M16-A03	Vh	DNA	配列番号479
M16-A03	Vl	DNA	配列番号480
M16-D05	Vh	DNA	配列番号481
M16-D05	Vl	DNA	配列番号482
M18-A10	Vh	DNA	配列番号483
M18-A10	Vl	DNA	配列番号484
M18-G08	Vh	DNA	配列番号485
M18-G08	Vl	DNA	配列番号486
M25-E05	Vh	DNA	配列番号487
M25-E05	Vl	DNA	配列番号488
M18-G08-G-DKTHT	HC	PRT	配列番号489
M18-G08-G-DKTHT	LC	PRT	配列番号490
M18-G08-G-DKTHT	HC	DNA	配列番号491
M18-G08-G-DKTHT	LC	DNA	配列番号492
M18-G08-DKTHT	HC	PRT	配列番号493
M18-G08-DKTHT	LC	PRT	配列番号494
M18-G08-DKTHT	HC	DNA	配列番号495
M18-G08-DKTHT	LC	DNA	配列番号496

10

20

【0076】

さらなる好ましい一実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントが、表1に示す少なくとも1つの（好ましくは対応する）CDR配列と少なくとも50%、55%、60%、70%、80%、90%、または95%同一であるか、またはそれぞれ表1に示すVHまたはVL配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、92%または95%同一な可変重鎖または軽鎖配列を構成する、重鎖または軽鎖CDR配列を含む。

30

【0077】

さらなる好ましい一実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントが、それぞれ抗体M14-G07、M18-G08、M18-G08-GまたはM18-G08-G-DKTHTの少なくとも1つの（好ましくは対応する）CDR配列と少なくとも50%、55%、60%、70%、80%、90%、または95%同一である重鎖および／または軽鎖CDR配列を含む。

【0078】

さらなる好ましい一実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、それぞれ抗体M14-G07、M18-G08、M18-G08-GまたはM18-G08-G-DKTHTの（好ましくは対応する）重鎖および／または軽鎖CDR配列と、少なくとも50%、55%、60%、70%、80%、90%、または95%同一である重鎖および／または軽鎖CDR配列を含む。

40

【0079】

さらなる好ましい一実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントが、抗体M14-G07の重鎖CDR2および3配列と少なくとも50%、55%、60%、70%、80%、90%、または95%同一である重鎖CDR2および3配列、ならびに抗体M14-G07の軽鎖CDR1および3配列と少なくとも50%、55%、60%

50

、70%、80%、90%、または95%同一である軽鎖CDR1および3配列を含む。さらなる好ましい一実施形態では、抗体またはその抗原結合性フラグメントが、抗体M18-G08、M18-G08-GまたはM18-G08-G-DKTHHの重鎖CDR2および3配列と少なくとも50%、55%、60%、70%、80%、90%、または95%である重鎖CDR2および3配列、ならびに抗体M18-G08、M18-G08-GまたはM18-G08-G-DKTHHの軽鎖CDR1および3配列と少なくとも50%、55%、60%、70%、80%、90%、または95%同一である軽鎖CDR1および3配列を含む。

【0080】

さらなる好ましい一実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントが、表1または表3に開示する（好ましくは抗体M14-G07、M18-G08、M18-G08-GまたはM18-G08-G-DKTHHの）VH配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、92%または95%同一である可変重鎖配列を含む。さらなる好ましい一実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントが、表1または表2に開示する（好ましくは抗体M14-G07、M18-G08、M18-G08-GまたはM18-G08-G-DKTHHの）VL配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、92%または95%同一である可変軽鎖配列を含む。

【0081】

さらなる好ましい一実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントが、抗体M14-G07、M18-G08、M18-G08-GまたはM18-G08-G-DKTHHのそれぞれVHおよびVL配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、92%または95%同一である可変重鎖および軽鎖配列を含む。

【0082】

さらなる好ましい一実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントが、表4および5に示すM14-G07またはM18-G08由来の（好ましくは対応する）CDRコンセンサス配列に合致する重鎖および軽鎖CDR配列を含む。さらなる好ましい一実施形態は、コンセンサス配列、配列番号497（CDR H1）、配列番号222（CDR H2）および配列番号498（CDR H3）によって表される対応する重鎖CDR配列に合致する重鎖CDR配列と、コンセンサス配列、配列番号499（CDR L1）、配列番号500（CDR L2）および配列番号501（CDR L3）によって表される対応する軽鎖CDR配列に合致する軽鎖CDR配列とを含むか、またはコンセンサス配列、配列番号502（CDR H1）、配列番号503（CDR H2）および配列番号504（CDR H3）によって表される対応する重鎖CDR配列に合致する重鎖CDR配列と、コンセンサス配列、配列番号505（CDR L1）、配列番号506（CDR L2）および配列番号507（CDR L3）によって表される対応する軽鎖CDR配列に合致する軽鎖CDR配列とを含む、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントである。

【0083】

さらなる好ましい一実施形態では、本発明の抗体または抗原結合性抗体フラグメントが、表1または表2および3に開示する、または好ましくは表1もしくは表2および3に示す抗体の、少なくとも1つの（好ましくは対応する）重鎖および／または軽鎖CDR配列を含む。さらなる好ましい一実施形態では、抗体または抗原結合性抗体フラグメントが、表1または表2および表3に開示する、または好ましくは表1もしくは表2および表3に示す抗体の、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つの（好ましくは対応する）重鎖および軽鎖CDR配列を含む。さらなる好ましい一実施形態では、抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、表1または表2および表3に示す抗体の重鎖または軽鎖CDR1、CDR2またはCDR3配列、表1または表2および表3に示す抗体の重鎖または軽鎖CDR1およびCDR2配列、表1または表2および表3に示す抗体の重鎖または軽鎖CDR1およびCDR3配列、表1または表2および表3に示す抗体の重鎖または軽鎖CDR2およびCDR3配列、表1または表2および3に示す抗体の重鎖または軽鎖C

10

20

30

40

50

D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む。さらなる好ましい一実施形態では、抗体または抗原結合性抗体フラグメントが、表 1 または表 2 および表 3 に示す抗体の重鎖 C D R 配列 C D R 1 および C D R 2 と軽鎖 C D R 配列 C D R 1、C D R 2、C D R 3 とを含む。さらなる好ましい一実施形態では、抗体または抗原結合性抗体フラグメントが、表 1 または表 2 および表 3 に示す抗体の重鎖および軽鎖 C D R 1、C D R 2 または C D R 3 配列、表または表 2 および 3 に示す抗体の重鎖および軽鎖 C D R 1 および C D R 2 配列、表 1 または表 2 および表 3 に示す抗体の重鎖および軽鎖 C D R 1 および C D R 3 配列、表 1 または表 2 および表 3 に示す抗体の重鎖および軽鎖 C D R 2 および C D R 3 配列、表 1 または表 2 および表 3 に示す抗体の重鎖および軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む。さらなる好ましい一実施形態では、本発明の抗体または抗原結合性抗体フラグメントが、表 1 または表 2 および表 3 に示す抗体の重鎖および軽鎖 C D R 配列を含む。

10

【0084】

さらなる一実施形態では、本発明の抗体または抗原結合性抗体フラグメントが、表 1 または表 2 および表 3 に開示する V H および／または V L 配列を含む。さらなる好ましい一実施形態では、抗体または抗原結合性抗体フラグメントが、表 1 または表 2 および表 3 に示す V H および V L 配列を含む。

【0085】

さらなる一実施形態では、本発明の抗体または抗原結合性抗体フラグメントが、表 9 (M 1 4 - G 0 7 の変異体) または表 1 1 (M 1 8 - G 0 8 の変異体) (これらの表は、その 2 列目に従って該分子の重鎖および／または軽鎖に導入された、単一および／または二重アミノ酸置換を示している) に開示する V H および／または V L 配列を含む。

20

【0086】

好ましい一実施形態では、本発明の抗体または抗原結合性抗体フラグメントがモノクローナルである。さらなる好ましい一実施形態では、本発明の抗体または抗原結合性抗体フラグメントがヒト、ヒト化、またはキメラである。

【0087】

この文書では、全体を通して、以下に挙げる本発明の好ましい抗体について述べる：「M 1 4 - G 0 7」、「M 1 8 - G 0 8」、「M 1 8 - G 0 8 - G」または「M 1 8 - G 0 8 - D K T H T」または「M 1 8 - G 0 8 - G - D K T H T」。

【0088】

M 1 4 - G 0 7 は、配列番号 4 7 5 (D N A) / 配列番号 2 0 7 (タンパク質) に対応する可変重鎖領域と、配列番号 4 7 6 (D N A) / 配列番号 2 0 8 (タンパク質) に対応する可変軽鎖領域とを含む抗体を表す。

30

【0089】

M 1 8 - G 0 8 は、配列番号 4 8 5 (D N A) / 配列番号 2 1 7 (タンパク質) に対応する可変重鎖領域と、配列番号 4 8 6 (D N A) / 配列番号 2 1 8 (タンパク質) に対応する可変軽鎖領域とを含む抗体を表す。

【0090】

M 1 8 - G 0 8 - G は、配列番号 3 8 5 (D N A) / 配列番号 1 1 7 (タンパク質) に対応する可変重鎖領域と、配列番号 3 8 6 (D N A) / 配列番号 1 1 8 (タンパク質) に対応する可変軽鎖領域とを含む抗体を表す。

40

【0091】

M 1 8 - G 0 8 - G - D K T H T は、配列番号 4 9 1 (D N A) / 配列番号 4 8 9 (タンパク質) に対応する重鎖領域と、配列番号 4 9 2 (D N A) / 配列番号 4 9 0 (タンパク質) に対応する軽鎖領域とを含む抗体を表す。

【0092】

M 1 8 - G 0 8 - D K T H T は、配列番号 4 9 5 (D N A) / 配列番号 4 9 3 (タンパク質) に対応する重鎖領域と、配列番号 4 9 6 (D N A) / 配列番号 4 9 4 (タンパク質) に対応する軽鎖領域とを含む抗体を表す。

【0093】

50

M018-G08-G-IgG1は、配列番号508（タンパク質）に対応する重鎖領域と配列番号509（タンパク質）に対応する軽鎖領域とを含むIgG1抗体を表す。

【0094】

いくつかの実施形態では、抗体、その抗原結合性フラグメント、もしくはその誘導体、または抗体模倣物、またはそれらをコードする核酸が、単離されている。単離された生物学的コンポーネント（例えば核酸分子または抗体などのタンパク質）は、そのコンポーネントが天然に存在している生物の細胞における他の生物学的コンポーネント、例えば他の染色体および染色体外DNAおよびRNA、タンパク質ならびに細胞小器官から、実質的に分離または精製されたものである。「単離された」核酸およびタンパク質には、Sambrookら、1989（Sambrook, J., Fritsch, E. F. およびManiatis, T. (1989)「Molecular Cloning: A laboratory manual」Cold Spring Harbor Laboratory Press, 米国コールドスプリングハーバー）およびRobert K. Scopesら1994「Protein Purification-Principles and Practice」(Springer Science and Business Media LLC)に記載の標準的な精製法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。この用語は、宿主細胞における組換え発現によって調製された核酸およびタンパク質、ならびに化学合成された核酸も包含する。

【0095】

抗体生成

完全ヒトn-CoDeR抗体ファージディスプレイライブラリーを使用し、特別に開発したツールおよび方法を使って、構造式1を含むFXa阻害剤に特異的な高アフィニティヒトモノクローナル抗体およびその抗原結合性フラグメントを単離した。これらのツールおよび方法には、特異的ターゲット分子と、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用に基づく、表面へのそれらの固定化が含まれる。ターゲット分子としての構造式1を含むFXa阻害剤の固定化は、ファージライブラリーからの抗体およびその抗原結合性フラグメントの選択（ファージパニング）、ならびにELISAフォーマットでの特異的抗体のスクリーニングおよび分析にとって、必要条件である。

【0096】

本発明の抗体およびその抗原結合性フラグメントは、ファージディスプレイ技術（PDT）における3つの非従来型アプローチの組み合わせによって開発された。第1に、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用に基づいて表面に固定化することができる構造式1を含むFXa阻害剤を合成した（実施例1Kおよび1L）。第2に、ストレプトアビジンビーズ上に固定化されたターゲット化合物（実施例1Kおよび1L）を、ストリンジェントな条件下での選択に使用した。ビオチンリンカー部分に特異的な結合物質を枯渇させるために、FITC-ビオチンによるファージライブラリーの事前吸着を含めた。第3に、さまざまなパニングラウンドにおいて得られたファージアウトプットの逐次スクリーニングを見込んだスクリーニング方法を開発した。これら特別な方法の組み合わせにより、ユニークな抗体「M16-D05」、「M14-G07」、「M15-B07」、「M25-E05」、「M18-A10」、「M16-A03」および「M18-G08」の単離が可能になった。

【0097】

これらのユニークな抗体を、ELISA試験およびSPR解析（BIAcore）ならびにFXa阻害剤として例えばリバーロキサバンを使用する機能的中和アッセイにおいて、ターゲット分子への結合アフィニティに関して、さらに特徴づけた。

【0098】

ユニークな抗体「M14-G07」および「M18-G08」の変異体を生成させ、アフィニティおよび／またはFXaアッセイにおけるリバーロキサバンの効果を解消する機能について、スクリーニングした。一部の実施例で述べるとおり、その結果得られた変異

体「M18-G08-G」を再クローニングし、非タグ付きFab「M18-G08-G-DKTHH」として発現させ、詳細に特徴づけた。

【0099】

本発明の抗体およびその機能的抗体フラグメントまたは抗体模倣物を得るための他の例示的方法

上記と類似する方法で、当業者はライブラリスクリーニングによって抗体模倣物を生成させることができる。

【0100】

本発明の抗体またはその機能的フラグメントを得るには、ディスプレイライブラリーの使用だけでなく、他の方法も使用することができる。例えば、担体タンパク質にカップリングした実施例1Kおよび／または実施例1Lからの化合物を、非ヒト動物、例えば齧歯類動物において、抗原として使用することができる。一態様では、非ヒト動物が、ヒト免疫グロブリン遺伝子の少なくとも一部を含む。例えば、ヒトIg遺伝子座の大きなフラグメントを使って、マウス抗体生産を欠くマウス系統を、工学的に作出することが可能である。ハイブリドーマ技術を使って、所望の特異性を有する遺伝子に由来する抗原特異的モノクローナル抗体(Mab)を生産し、選択することができる。例えば、XENOMOUSE(商標)、Greenら、1994、Nat. Gen. 7:13-21; U.S. 2003-0070185、WO 96134096(1996年10月31日公開)、およびPCT出願番号PCT/US96105928(1996年4月29日出願)を参照されたい。

【0101】

もう一つの実施形態では、非ヒト動物からモノクローナル抗体を得て、それを修飾(例えばヒト化または免疫原性除去(deimmunize))する。Winterは、ヒト化抗体を調製するために使用しうるCDR移植法を記述している(英国特許出願GB 2188638A(1987年3月26日出願);米国特許第5,225,539号)。あるヒト抗体のCDRの全てを非ヒトCDRの少なくとも一部で置き換えてもよいし、CDRの一部だけを非ヒトCDRで置き換えてもよい。所定の抗原へのヒト化抗体の結合に必要な数のCDRを置き換えるだけでよい。ヒト化抗体は、抗原結合に直接的には関与しないFv可変領域の配列を、ヒトFv可変領域からの等価な配列で置き換えることによって、生成させることができる。ヒト化抗体を生成させるための一般的方法は、Morrisson, S. L., 1985, Science 229:1202-1207、Oira, 1986, 25 BioTechniques 4:214、およびQueenらの米国特許第5,585,089号、同第5,693,761号および同第5,693,762号に記載されている。これらの方法には、重鎖または軽鎖の少なくとも1つからの免疫グロブリンFv可変領域の全部または一部をコードする核酸配列を単離すること、操作すること、および発現させることが含まれる。そのような核酸の供給源は数多く利用することができる。例えば核酸は、上述のように、所定のターゲットに対する抗体を生産するハイブリドーマから得ることができる。次に、ヒト化抗体またはそのフラグメントをコードする組換えDNAを、適当な発現ベクターにクローニングすることができる。

【0102】

ペプチド変異体

本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは、ここに提供する具体的ペプチド配列に限定されない。むしろ本発明はこれらのポリペプチドの変異体も包含する。本開示ならびに従来から利用できる技術および参考文献を参照して、当業者は、本明細書に開示する抗体およびその抗原結合性フラグメントの機能的変異体を調製し、試験し、利用することができるであろうし、抗凝固剤に結合する能力を有する変異体が発明の範囲に包含されることも理解するであろう。

【0103】

変異体には、例えば、本明細書に開示するペプチド配列と比較して改変された相補性決定領域(CDR)(超可変)および／またはフレームワーク(FR)(可変)ドメイン／

10

20

30

40

50

位置を少なくとも1つは有している抗体またはその抗原結合性フラグメントを含めることができる。この概念をより良く例解するために、以下に抗体の構造を簡単に説明する。

【0104】

抗体は2本のペプチド鎖で構成され、それぞれが1つ（軽鎖）または3つ（重鎖）の定常ドメインと可変領域（VL、VH）とを含有し、このうち後者は、いずれも、4つのFR領域と、その間に配置された3つのCDRから構成されている。抗原結合部位は1つ以上のCDRによって形成されているが、FR領域はCDRに構造的フレームワークを提供しており、それゆえに、抗原結合において重要な役割を果たしている。CDRまたはFR領域中のアミノ酸残基を1つ以上改変することによって、当業者は、変異したまたは多様化した抗体配列をルーチンに生成させることができ、それらを、例えば新しい性質または改良された性質を求めて、抗原に対してスクリーニングすることができる。

10

【0105】

表2（VL）および表3（VH）では、本発明の一定の抗体についてCDR領域およびFR領域を詳述し、所与の位置におけるアミノ酸を互いに比較すると共に、対応するコンセンサス配列とも比較している。

【0106】

[表2] VL配列

【表2】

```

M14-G07      (1) QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNYYVWYQQLPGTAPKLLIYDNNDRPSGV
M14-G07-10   (1) QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSRNIGSFYVWYQQLPGTAPKLLIYDNNQRPSPGV
M14-G07-35   (1) QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNYYVWYQQLPGTAPKLLIYDNNQRPSPGV
M14-G07-36   (1) QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSYVWYQQLPGTAPKLLIYDNNQRPSPGV
M14-G07-37   (1) QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSYVWYQQLPGTAPKLLIYDNNQRPSPGV
M18-G08      (1) QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNQRPSPGV
M18-G08-2    (1) QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNKVNWYQQLPGTAPKVLWSNNQRPSPGV
M18-G08-10   (1) QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNKVNWYQQLPGTAPKLLIWSNNQRPSPGV
M18-G08-18   (1) QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNKVNWYQQLPGTAPKVLISNNQRPSPGV
M18-G08-34   (1) QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNKVNWYQQLPGTAPKSLIWSNNQRPSPGV
M18-G08-41   (1) QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIWSNNQRPSPGV
M18-G08-G    (1) QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSPGV
               ----LCDR1----                      -LCDR2-

```

20

```

M14-G07      (60) PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCVAWDDSLSGHWVFGGGTKLTVL
M14-G07-10   (60) PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCVAWDDSWSGHWVFGGGTKLTVL
M14-G07-35   (60) PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCVAWDDSLSGHWVFGGGTKLTVL
M14-G07-36   (60) PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCVAWDDSLSGHWVFGGGTKLTVL
M14-G07-37   (60) PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCVAWDDSWSGHWVFGGGTKLTVL
M18-G08      (60) PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLVG-WVFGGGTKLTVL
M18-G08-2    (60) PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLVG-WVFGGGTKLTVL
M18-G08-10   (60) PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLVG-WVFGGGTKLTVL
M18-G08-18   (60) PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLVG-WVFGGGTKLTVL
M18-G08-34   (60) PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLVG-WVFGGGTKLTVL
M18-G08-41   (60) PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLVG-WVFGGGTKLTVL
M18-G08-G    (60) PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLVG-WVFGGGTKLTVL
               ----LCDR3----

```

30

[表3] VH配列

40

【表 3-1】

M14-G07 (1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTY
M14-G07-10 (1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTY
M14-G07-35 (1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTY
M14-G07-36 (1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTY
M14-G07-37 (1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTY
M18-G08 (1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIY
M18-G08-2 (1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMSWVRQAPGKGLEWVSSISTSSSYIY
M18-G08-10 (1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWMSWVRQAPGKGLEWVSSISTSSSYIY
M18-G08-18 (1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMSWVRQAPGKGLEWVSSISTSSSYIY
M18-G08-34 (1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMSWVRQAPGKGLEWVSSISTSSSYIY
M18-G08-41 (1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMSWVRQAPGKGLEWVSSISTSSSYIY
M18-G08-G (1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIY
HCDR1 -----HCDR2-

10

【表 3-2】

M14-G07 (60) YADSVKGRETI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGETSFGLDVWGQGT LVT VTS
M14-G07-10 (60) YADSVKGRETI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGRTSFYLDVWGQGT LVT VTS
M14-G07-35 (60) YADSVKGRETI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGETSFYLDVWGQGT LVT VTS
M14-G07-36 (60) YADSVKGRETI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGETSFYLDVWGQGT LVT VTS
M14-G07-37 (60) YADSVKGRETI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGETSFYLDVWGQGT LVT VTS
M18-G08 (60) YADSLKGRETI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVWRNH--LDYWGQGT LVT VTS
M18-G08-2 (60) YADSVKGRETI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVWRNY---LDYWGQGT LVT VTS
M18-G08-10 (60) YADSVKGRETI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVWRNS--LDYWGQGT LVT VTS
M18-G08-18 (60) YADSVKGRETI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVWRNY--LSYWGQGT LVT VTS
M18-G08-34 (60) YADSVKGRETI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVWRNY--LSYWGQGT LVT VTS
M18-G08-41 (60) YADSVKGRETI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVWRNA--LSYWGQGT LVT VTS
M18-G08-G (60) YADSVKGRETI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVWRNY--LDYWGQGT LVT VTS
----- --HCDR3---

20

【表 4】 M14-G07 誘導体のコンセンサスCDR配列

【表 4】

CDR H1 M14-G07 配列番号497

位置	1	2	3	4	5
アミノ酸	D	Y	A	M	S
変異体	S				
コンセンサス	D又はS	Y	A	M	S

CDR H2 M14-G07 配列番号222

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
アミノ酸	G	I	S	G	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G
変異体																	
コンセンサス	G	I	S	G	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G

30

CDR H3 M14-G07 配列番号498

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
アミノ酸	E	G	E	T	S	F	G	L	D	V
変異体	Q		R又はK				Y			
コンセンサス	Q或E	G	R、K又はE	T	S	F	Y又はG	L	D	V

CDR L1 M14-G07 配列番号499

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
アミノ酸	S	G	S	S	S	N	I	G	S	N	Y	V	Y
変異体	C			T					A	F又はY			
コンセンサス	C又はS	G	S	S又はT	S又はR	N	I	G	S又はA	F、Y又はN	Y	V	Y

CDR L2 M14-G07 配列番号500

位置	1	2	3	4	5	6	7
アミノ酸	D	N	N	D	R	P	S
変異体			R	Q			
コンセンサス	D	N	N又はR	Q又はD	R	P	S

40

CDR L3 M14-G07 配列番号501

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
アミノ酸	V	A	W	D	D	S	L	N	G	H	W	V
変異体					W又はV D、V		W又はY W、Y	S		T		
コンセンサス	V	A	W	D	W又はV 又はW	S	W、Y 又はL	S又はN	G	H又はT	W	V

【表 5】 M18-G08 誘導体のコンセンサスCDR配列

【表 5】

CDR H1 M18-G08 配列番号502

位置	1	2	3	4	5
アミノ酸	N	A	W	M	S
変異体	S又はD	Y, S 又はH			
コンセンサス	D, N 又はS	A, Y, S 又はH	W	M	S

CDR H2 M18-G08 配列番号503

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
アミノ酸	S	I	S	S	S	S	G	Y	I	Y	Y	A	D	S	L	K	G
変異体				T			S							G	V		
コンセンサス	S	I	S	S又はT	S	S	G又はS	Y	I	Y	Y	A	D	G又はS	L又はV	K	G

CDR H3 M18-G08 配列番号504

位置	1	2	3	4	5	6	7	8
アミノ酸	V	W	R	N	H	L	D	Y
変異体					Y, S, 又はA		D	
コンセンサス	V	W	R	N	Y, S, A 又はH	L	D又はS	Y

CDR L1 M18-G08 配列番号505

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
アミノ酸	S	G	S	S	S	D	I	G	S	N	T	V	N
変異体						N							
コンセンサス	S	G	S	S	S	N又はD	I	G	S	N	K又はT	V	N

CDR L2 M18-G08 配列番号506

位置	1	2	3	4	5	6	7
アミノ酸	D	N	N	Q	R	P	S
変異体	S			S	H		N
コンセンサス	D又はS	N	N	Q	R又はH	P	S又はN

CDR L3 M18-G08 配列番号507

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
アミノ酸	Q	S	Y	D	S	S	L	S	G	W	V
変異体				S			V				
コンセンサス	Q	S	Y	D又はS	S	S	L	S又はV	G	W	V

【0107】

本発明のさらなる好ましい一実施形態は、CDR配列が表1に示すように選択された抗体またはその抗原結合性フラグメントである。

【0108】

本発明のさらなる好ましい一実施形態は、VHおよびVL配列が表1に示すように選択された抗体または抗原結合性フラグメントである。当業者は、表1、2および3のデータを使って、本発明の範囲に含まれるペプチド変異体を設計することができる。変異体は1つ以上のCDR領域内のアミノ酸を変化させることによって構築することが好ましく、変異体は改変されたフレームワーク領域も1つ以上有しているかもしれない。改変は、フレームワーク領域にも加えうる。例えば、ペプチドFRドメインが改変されていて、生殖細胞系配列と比較して残基に変動があるかもしれない。

【0109】

さらにまた、変異体は、ある抗体を、抗体中の1つ以上のアミノ酸残基（好ましくは1つ以上のCDR中のアミノ酸残基）を多様化することによる最適化のための出発点として使用し、結果として生じた一群の抗体変異体を、改良された性質を伴う変異体を求めてスクリーニングすることによって取得してもよい。特に好ましいのは、VLおよび／またはVHのCDR3中の1つ以上のアミノ酸残基の多様化である。多様化は、トリヌクレオチド変異誘発（trinucleotide mutagenesis）（TRIM）技術（Virnekaes B. ら, Nucl. Acids Res. 1994, 22: 5600）を使って一群のDNA分子を合成することによって行うことができる。抗体またはその抗原結合性フラグメントには、例えば限定するわけではないが半減期の改変につながる修飾（例えばFc部分の修飾またはPEGなどのさらなる分子の取り付け）などといった修飾／変異を伴う分子が含まれる。

【0110】

保存的アミノ酸変異体

本明細書に記載す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を作製することができる。個々のアミノ酸の性質を考えれば、当業者には、いくつかの合理的な置換がわかるであろう。アミノ酸置換、すなわち「保存的置換」は、例えば、関与する残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および／または両親媒性の類似性に基づいて行うことができる。

【0111】

例えば（a）非極性（疎水性）アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バ

10

20

30

40

50

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、スレオニン、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）陽性荷電（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジン、およびヒスチジンが含まれ；（d）陰性荷電（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、（a）～（d）のグループ内で行うことができる。加えて、グリシンおよびプロリンは、 α ヘリックスを破壊するその能力に基づいて、互いに置換することができる。また、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ジンなどといった一定のアミノ酸は、 α ヘリックス中に見いだされることの方が多く、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スレオニンは、 β ブリーツシート中に見いだされることの方が多い。グリシン、セリン、アスパラギン酸、アスパラギン、およびプロリンはターン中によく見いだされる。いくつかの好ましい置換は、次に挙げるグループ内で行うことができる：（i）SおよびT；（ii）PおよびG；ならびに（iii）A、V、LおよびI。既知の遺伝暗号、組換え技法および合成DNA技法を考慮すれば、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できる。

10

【0112】

本明細書において、2つのポリペプチド配列間の「配列同一性」は、それらの配列の間で同一であるアミノ酸のパーセンテージを示す。「配列相同性」は、同一であるか保存的アミノ酸置換に相当するアミノ酸のパーセンテージを示す。

20

【0113】

本発明のDNA分子

本発明は、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントをコードするDNA分子にも関係する。これらの配列には、表1に示すDNA分子が含まれるが、それらに限るわけではない。

【0114】

本発明のDNA分子は本明細書に開示する配列に限定されるわけではなく、その変異体も包含する。本発明内のDNA変異体は、ハイブリダイゼーションにおけるその物理的性質に言及することによって記述することができる。DNAを使用することで、その相補体（complement）と（DNAは二本鎖であることから）その等価物またはホモログとを、核酸ハイブリダイゼーション技法を使って同定できることは、当業者にはわかるであろう。ハイブリダイゼーションが100%未満の相補性で起こりうることもわかるであろう。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法を使用し、特定のプローブに対するその構造的関連性に基づいて、DNA配列を区別することができる。そのような条件に関する指針については、Sambrookら、1989（前掲書）およびAusubelら、1995（Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A. および Struhl, K. 編（1995）「Current Protocols in Molecular Biology」ニューヨーク：John Wiley and Sons）を参照されたい。

30

40

【0115】

2つのポリヌクレオチド配列間の構造類似性は、それら2つの配列が互いにハイブリダイズするであろう条件の「ストリンジェンシー」の関数として表現することができる。本明細書において使用する用語「ストリンジェンシー」は、その条件がハイブリダイゼーションを嫌う度合を指す。ストリンジェントな条件はハイブリダイゼーションを強く嫌い、そのような条件下では、構造的に最も近縁な分子だけが互いにハイブリダイズするであろう。逆に、非ストリンジェント条件は、より低度の構造的関連性を示す分子のハイブリダイゼーションにとって有利になる。それゆえに、ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、2つの核酸配列の構造的関係と直接的に相関する。次の関係は、ハイブリダイゼーションと関連性とを相関させるのに役立つ（式中、 T_m は核酸二重鎖の融解温度である

50

) :

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

b. 二重鎖 DNA の T_m は、ミスマッチ塩基対の数が 1 % 増加するごとに 1 °C 低下する。

c. $(T_m)_{\mu 2} - (T_m)_{\mu 1} = 18.5 \log_{10} \mu 2 / \mu 1$

式中、 $\mu 1$ および $\mu 2$ は 2 つの溶液のイオン強度である。

【0116】

ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、総 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薬剤の存在などといった数多く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、長いプローブサイズ、および水素結合を破壊する薬剤の不在が含まれる。ハイブリダイゼーションは、典型的には、「結合」段階と「洗浄」段階の二段階で行われる。

10

【0117】

まず最初に、結合段階では、ハイブリダイゼーションに有利な条件下で、プローブをターゲットに結合させる。この段階では、通常、温度を変えることによって、ストリンジェンシーが制御される。高ストリンジェンシーの場合、短い (< 20 nt) オリゴヌクレオチドプローブを使用するのでない限り、温度は通常、65 °C ~ 70 °C である。代表的なハイブリダイゼーション溶液は、6 × SSC、0.5 % SDS、5 × デンハルト溶液および 100 μg の非特異的キャリア DNA を含む。Ausubel ら, section 2.9, supplement 27 (1994) 参照。異なるバッファー条件であるが機能的には等価なものも、もちろん、数多く知られている。関連性の程度が低い場合は、低い温度を選ぶ。低ストリンジェンシー結合温度は約 25 °C ~ 40 °C である。中ストリンジェンシーは少なくとも約 40 °C ~ 約 65 °C 未満である。高ストリンジェンシーは少なくとも約 65 °C である。

20

【0118】

次に、過剰のプローブを洗浄によって除去する。通常は、この段階において、よりストリンジェントな条件が適用される。したがって、ハイブリダイゼーションによって関連性を決定する際に最も重要なのは、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。例示的な中ストリンジェンシー溶液の一つは 2 × SSC および 0.1 % SDS を含有する。高ストリンジェンシー洗浄溶液は、(イオン強度で) 約 0.2 × SSC 未満に相当するものを含有し、好ましいストリンジェント溶液は約 0.1 × SSC を含有する。さまざまなストリンジェンシーに関連する温度は「結合」に関して上に述べたものと同じである。また、洗浄溶液は、典型的には、洗浄中に何度か交換される。例えば、典型的な高ストリンジェンシー洗浄条件は、55 °C で 30 分間、2 回洗浄すること、および 60 °C で 15 分間、3 回洗浄することを含む。

30

【0119】

本発明の一実施形態は、(i) 本発明の抗体または抗原結合性フラグメント、表 1 に示す CDR 配列をコードするか、または (ii) 表 1 に示す可変軽鎖および重鎖配列をコードするか、または (iii) 本発明の抗体もしくは抗原結合性フラグメント、表 1 に示す CDR 配列、または表 1 に示す可変軽鎖および重鎖配列をコードする核酸配列を含む、単離された核酸配列である。

40

【0120】

機能的に等価な変異体

本発明の範囲に含まれるさらにもう一種類の DNA 変異体は、それらがコードする産物を基準にして記述することができる。これらの機能的に等価なポリヌクレオチドは、遺伝暗号の縮重ゆえに、それらが表 1 に見いだされるものと同じペプチド配列をコードするという事実を特徴とする。

【0121】

ここで提供される DNA 分子の変異体をいくつかの異なる方法で構築できることはわかる。例えば、それらは、完全な合成 DNA として構築することができる。20 ~ 約 150 ヌクレオチドの範囲のオリゴヌクレオチドを効率よく合成する方法は、幅広く利用するこ

50

とができる。Ausubelら, section 2.11, Supplement 21 (1993) 参照。Khoranaら, J. Mol. Biol. 72: 209-217 (1971) によって初めて報告された方法で、オーバーラップしたオリゴヌクレオチドを合成し、アセンブルすることができる。Ausubelら (前掲書) のSection 8.2も参照されたい。好ましくは、適当なベクターへのクローニングが容易になるように、遺伝子の5'端および3'端に工学的に作出された便利な制限部位を伴う合成DNAが設計される。

【0122】

記載のとおり、変異体を生成させる一方法は、本明細書に開示するDNAの一つから出発し、次に、部位特異的変異誘発を行うことである。Ausubelら (前掲書) のchapter 8, Supplement 37 (1997) 参照。典型的な一方法では、ターゲットDNAを一本鎖DNAバクテリオファージ媒体中にクローニングする。一本鎖DNAを単離し、所望のヌクレオチド改変を含有するオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる。相補鎖を合成し、二本鎖ファージを宿主中に導入する。その結果生じる子孫の一部は所望のミュータントを含有し、そのことは、DNA配列決定を使って確認することができるであろう。加えて、子孫ファージが所望のミュータントになる確率を増加させるさまざまな方法を利用することができる。これらの方法は当業者にはよく知られており、そのようなミュータントを生成させるためのキットが市販されている。

【0123】

組換えDNAコンストラクトおよび発現

本発明はさらに、本発明のヌクレオチド配列の1つ以上を含む組換えDNAコンストラクトを提供する。本発明の組換えコンストラクトは、プラスミド、ファージミド、ファージまたはウイルスベクターなどのベクターと共に使用され、そこに本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントをコードするDNA分子が挿入される。

【0124】

ここで提供される抗体、その抗原結合部分または誘導体は、宿主細胞における軽鎖および重鎖またはその一部をコードする核酸配列の組換え発現によって調製することができる。抗体、その抗原結合部分または誘導体を組換え的に発現させるために、軽鎖および／もしくは重鎖またはその一部をコードするDNAフラグメントを包因する1つ以上の組換え発現ベクターを、軽鎖および重鎖が宿主細胞中で発現するように、宿主細胞にトランスフェクトすることができる。標準的な組換えDNA法、例えばSambrook, FritschおよびManiatis編「Molecular Cloning; A Laboratory Manual」第2版、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー (1989)、Ausubel, F. M. ら編「Current Protocols in Molecular Biology」Greene Publishing Associates (1989) およびBossらによる米国特許第4,816,397号に記載されている方法などを使って、重鎖および軽鎖をコードする核酸を調製かつ／または取得し、これらの核酸を組換え発現ベクター中に組み込み、そのベクターを宿主細胞中に導入する。

【0125】

加えて、重鎖および／または軽鎖の可変領域をコードする核酸配列は、例えば、完全長抗体鎖もしくはFabフラグメントをコードする核酸配列に転換するか、scFvに転換することができる。VLまたはVHをコードするDNAフラグメントは、もう一つのDNAフラグメント (例えば抗体定常領域またはフレキシブルなリンカーをコードするもの) に (2つのDNAフラグメントによってコードされるアミノ酸配列がインフレームになるように) 作動的に連結することができる。ヒト重鎖および軽鎖定常領域の配列は当技術分野では知られており (例えばKabat, E. A. ら (1991) 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」第5版、米国保険社会福祉省、NIH Publication No. 91-3242 参照)、これらの領域を包含するDNAフラグメントは、標準的なPCR増幅によっ

て得ることができる。

【0126】

s c F v をコードするポリヌクレオチド配列を作製するために、V L 領域と V H 領域とがフレキシブルなリンカーで接合されている連続した単鎖タンパク質として V H 配列および V L 配列を発現させることができるように、V H コード核酸と V L コード核酸とを、フレキシブルなリンカーをコードするもう一つのフラグメントと作動的に連結することができる（例えば Birdら (1988) Science 242:423-426; Hustonら (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCaffertyら, Nature (1990) 348:552-554 参照）。

10

【0127】

抗体、その抗原結合部分または誘導体を発現させるには、標準的な組換え DNA 発現法を使用することができる（例えば Goeddel「Gene Expression Technology」Methods in Enzymology 185, Academic Press, カリフォルニア州サンディエゴ (1990) 参照）。例えば、所望のポリペプチドをコードする DNA を発現ベクター中に挿入し、次にそれを適切な宿主細胞中にトランスフェクトすることができる。適切な宿主細胞は原核細胞および真核細胞である。原核宿主細胞の例は、例えば細菌であり、真核宿主細胞の例は、酵母、昆虫または哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、重鎖をコードする DNA と軽鎖をコードする DNA とを、別々のベクターに挿入する。他の実施形態では、重鎖をコードする DNA と軽鎖をコードする DNA とを、同じベクターに挿入する。調節配列の選択を含む発現ベクターの設計が、宿主細胞の選択、所望するタンパク質の発現レベル、および発現が構成的であるか誘導性であるかなどといった因子によって左右されることはいうまでもない。

20

【0128】

細菌発現

細菌用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、適切な翻訳開始シグナルおよび翻訳終結シグナルと共に、機能的プロモーターに対して作動可能な読み枠で挿入することによって構築される。ベクターは、ベクターの維持が保証されるように、また所望であれば、宿主内での増幅に備えて、1つ以上の表現型選択可能マーカーと複製起点とを含むであろう。形質転換に適した原核宿主には、大腸菌 (E. coli)、枯草菌 (Bacillus subtilis)、ネズミチフス菌 (Salmonella typhimurium)、およびシュードモナス (Pseudomonas) 属、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属、およびスタフィロкокカス (Staphylococcus) 属のさまざまな種が含まれる。

30

【0129】

細菌ベクターは、例えばバクテリオファージベース、プラスミドベース、またはファージミドベースであることができる。これらのベクターは、典型的には周知のクローニングベクター pBR322 (ATCC 37017) の要素を含有する市販のプラスミドに由来する選択可能マーカーおよび細菌複製起点を含有することができる。適切な宿主株を形質転換し、その宿主株を適当な細胞密度まで成長させた後、選択したプロモーターを、適当な手段（例えば温度シフトまたは化学的誘導）によって抑制解除／誘導し、細胞をさらにある期間培養する。細胞を典型的には遠心分離によって回収し、物理的または化学的手段によって破壊し、その結果得られた粗抽出物を、さらなる精製のためにとっておく。

40

【0130】

細菌系では、発現させるタンパク質の使用目的に応じて、いくつかの発現ベクターを、有利に選択しうる。例えば、抗体を生成させるために、またはペプチドライブラリーをスクリーニングするために、そのようなタンパク質を大量に生産しようとする場合は、例えば、精製が容易な融合タンパク質産物の高レベルな発現を指示するベクターが望ましいであろう。本発明の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物には、天然

50

精製産物、化学合成的手法の生成物、ならびに例えば大腸菌、枯草菌、ネズミチフス菌などを含む原核宿主や、シュードモナス属、ストレプトマイセス属およびスタフィロコッカス属のさまざまな種から（好ましくは大腸菌細胞から）組換え技法によって生産された産物が含まれる。

【0131】

哺乳類発現および精製

哺乳動物宿主細胞発現のための好ましい調節配列には、哺乳動物細胞における高レベルのタンパク質発現を指示するウイルス要素、例えば、サイトメガロウイルス（CMV）（CMVプロモーター／エンハンサーなど）、シミアンウイルス40（SV40）（SV40プロモーター／エンハンサーなど）、アデノウイルス（例えばアデノウイルス主要後期プロモーター（AdMLP））および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などが含まれる。ウイルス調節要素のさらなる説明およびその配列については、例えばStinskiによるU. S. 5, 168, 062、BellらによるU. S. 4, 510, 245、およびSchaffnerらによる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可能マーカーも含むことができる（例えばAxelらによるU. S. 4, 399, 216、4, 634, 665およびU. S. 5, 179, 017を参照されたい）。適切な選択可能マーカーには、そのベクターが導入された宿主細胞にG418、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与する遺伝子が含まれる。例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子は、メトトレキサ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。

10

20

【0132】

宿主細胞への発現ベクターのトランスフェクションは、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、リポフェクションまたはポリカチオンによるトランスフェクションなどといった標準的技法を使って行うことができる。

【0133】

ここで提供される抗体、その抗原結合部分もしくは誘導体、または抗体模倣物を発現させるのに適した哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣（CHO細胞）（例えばR. J. KaufmanおよびP. A. Sharp（1982）Mol. Biol. 159:601-621に記載されているようにDHFR選択可能マーカーと共に使用されるUrlaubおよびChasin（1980）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載のdhfr- CHO細胞を含む）、NSO骨髓腫細胞、COS細胞およびSP2細胞が含まれる。一部の実施形態では、発現したタンパク質が、宿主細胞を成長させている培養培地中に分泌されるように、発現ベクターが設計される。抗体の一過性トランスフェクション／発現は、例えばDurocherら（2002）Nucl. Acids Res. Vol 30e9によるプロトコールに従って達成することができる。抗体の安定トランスフェクション／発現は、例えばUCOE系のプロトコール（T. Bentonら（2002）Cytotechnology 38:43-46）に従って達成することができる。

30

【0134】

抗体、その抗原結合部分または誘導体は、標準的なタンパク質精製法を使って、培養培地から回収することができる。

40

【0135】

本発明の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物は、例えば限定するわけではないが、硫酸アンモニウム沈殿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、ヒドロキシルアパ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などといった周知の方法によって、組換え細胞培養物から回収し、精製することができる。高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）も精

50

製に使用することができる。例えばColligan「Current Protocols in Immunology」または「Current Protocols in Protein Science」(John Wiley & Sons, ニューヨーク州ニューヨーク)(1997-2001)の例えばChapter 1、4、6、8、9、10を参照されたい(これらは、それぞれ引用により、全て本明細書に組み込まれる)。

【0136】

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、化学合成的手法の生成物、ならびに例えば酵母(例えばピキア(Pichia))、高等植物、昆虫および哺乳動物細胞を含む真核宿主(好ましくは哺乳動物細胞)から組換え技法によって生産された産物が含まれる。組換え生産手法に使用する宿主に依存して、本発明の抗体はグリコシル化体であることも、非グリコシル化体であることもでき、グリコシル化体は好ましい。そのような方法は、多くの標準的実験マニュアル、例えばSambrook(前掲書)のSection 17.37~17.42; Ausubel(前掲書)のChapter 10、12、13、16、18および20などに記載されている。

【0137】

治療法

治療法は、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物の治療有効量を、処置を必要とする対象に投与することを伴う。「治療有効」量とは、ここに、単回投与として、または複数回投与レジメンに従って、単独で、または他の薬剤との組み合わせで、血漿中の式1の構造を含むFXa阻害剤を中和するのに十分な量であって、有害な状態の軽減につながるが、毒物学的には認容されうるような、抗体または抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物の量と定義される。本発明の抗体または抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物は、既知の医薬と共投与されるかもしれないし、場合によっては、抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物そのものが修飾されるかもしれない。例えば、解毒剤の血漿中半減期を増加させるために、抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物を、ポリエチレングリコール、担体タンパク質、リボソームおよびカプセル化剤、リン脂質膜またはナノ粒子にコンジュゲートまたは付加することができるだろう。

【0138】

本発明は、式1の構造を含むFXa阻害剤による抗凝固剤治療を受けている対象における該抗凝固剤の抗凝固効果を、その対象に有効量の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物を投与することによって、選択的に中和する治療方法に関する。本発明の抗体もしくは抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物は、待機状況または緊急状況において、該FXa阻害剤の抗凝固性を安全かつ特異的に中和してほぼ正常化した凝固状態をもたらすために使用することができると考えられる。そのような待機状況または緊急状況は、例えば重症出血事象(例えば外傷によって引き起こされるもの)または緊急の侵襲的手技(例えば緊急手術)の必要など、正常化した凝固が好ましい状況である。本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは、血行動態パラメータに固有の効果を有さない。好ましい一実施形態では、FXa阻害剤がリバーロキサバンである。

【0139】

対象は、ヒトまたは非ヒト動物(例えばウサギ、ラット、マウス、イヌ、サルまたは他の下等霊長類)であることができる。

【0140】

一実施形態では、過量の、式1の構造を含むFXa阻害剤の投与後に、本発明の抗体もしくは抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物が投与される。

【0141】

もう一つの実施形態では、式1の構造を含むFXa阻害剤で処置された対象を、増加した出血リスクに曝しうる手術に先だって、本発明の抗体もしくは抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物が投与される。

【0142】

さらにもう一つの実施形態では、式1の構造を含むFXa阻害剤が凝固に及ぼす効果を中和するために本発明の抗体もしくは抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物で処置された対象を、本解毒剤によって結合されないFXa阻害剤を投与することにより、迅速に再び抗凝固処置することができる。

【0143】

有効量の本発明の抗体もしくは抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物を、対象に投与することが考えられる。

【0144】

もう一つの実施形態では、本発明の抗体もしくは抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物が、抗血栓および／または抗線維素溶解活性を有する凝固剤と組み合わせて投与される。一実施形態では、血液凝固剤が、凝固因子、凝固因子に関連するポリペプチド、組換え凝固因子およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。もう一つの実施形態では、血液凝固剤を、吸着性化学薬品、止血剤、トロンビン、フィブリン糊、デスマプレシン、寒冷沈降物および新鮮凍結血漿、凝固因子濃縮物、活性化または非活性化プロトロンビン複合体濃縮物、FEIBA、血小板濃縮物およびそれらの組み合わせからなる群より選択しうる。利用可能な血液凝固因子のさらなる例は、引例Brooker M「Registry of Clotting Factor Concentrates」第8版、World Federation of Hemophilia, 2008に見いだすことができる。

【0145】

上述の障害はヒトにおいて詳しく特徴づけられているが、哺乳動物を含む他の動物にも、類似する病因と共に存在し、本発明の医薬組成物を投与することによって処置することができる。

【0146】

上記の障害のいずれを処置するためにも、本発明に従って使用するための医薬組成物は、1つ以上の生理学的に許容できる担体または賦形剤を使って従来の方法で製剤化することができる。本発明の抗体および抗原結合性フラグメントは、任意の適切な手段（これは、処置される障害のタイプに応じてさまざまでありうる）によって、投与することができる。考える投与経路には、非経口（例えば筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下）、肺内および鼻腔内が含まれ、局所免疫抑制処置にとって望ましい場合には、病変内投与も含まれる。加えて、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、例えば抗体または抗原結合性フラグメントの用量を減らしていく、パルス注入によって投与されるかもしれない。好ましくは、投薬は、一つには、投与が短期間であるか、長期間であるかに依存して、注射によって、最も好ましくは静脈内注射または皮下注射によって行われる。投与すべき量は、臨床症状、個体の体重、他の薬物が投与されるかどうかなどといったさまざまな因子に依存するであろう。投与の経路が処置すべき障害または状態に依存してさまざまであるだろうことは、当業者にはわかるであろう。

【0147】

本発明のポリペプチドもしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物の治療有効量の決定は、主として、特定の患者特性、投与経路、および処置される障害の性質に依存するであろう。一般的指針は、例えば医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議（International Conference on Harmonization）の刊行物および「Remington's Pharmaceutical Sciences」のchapter 27および28, 484～528ページ（第18版、Alfonso R. Gennaro編、ペンシルバニア州イーストン：MacK Pub. Co., 1990）に見いだすことができる。より具体的には、治療有効量の決定は、その医薬の毒性および効力などといった因子に依存するであろう。毒性は、上記参考文献に見いだされる当技術分野において周知の方法を使って決定することができる。効力は、同じ手引きを、下記の実施例で述べる方法と合わせて利用することによって、決定す

ることができる。

【0148】

診断方法

本発明のもう一つの態様は、被験者の変化した凝固状態が、該被験者の血液における式1の構造を含むFXa阻害剤の存在によるのかどうかを決定するためのインビトロ診断方法であり、この方法では、(a)インビトロ凝固試験を本発明の抗体または抗原結合性フラグメントの存在下で行い、(b)インビトロ凝固試験を本発明の抗体または抗原結合性フラグメントの非存在下で行い、(c)ステップ(a)と(b)で行った試験の結果を比較し、(d)ステップ(a)からの結果とステップ(b)からの結果が異なるのであれば、式1の構造を含むFXa阻害剤の存在に起因する変化した凝固状態と診断する。好ましいインビトロ凝固試験はPT、aPTTまたはトロンビン生成試験である。診断および治療における後続のステップを計画するために、とりわけ緊急的状況においては、この情報を迅速に入手できることが、極めて重要な場合がある。例えばループス抗凝固因子の存在下では、検査室試験において延長された凝固時間(例えばPTT)を観察することができ、この場合は、リン脂質および細胞膜と会合しているタンパク質に対する自己抗体が、正常な凝固プロセスを妨害している。しかし、インビボのループス抗凝固因子は実際には血栓形成促進剤である、というのも、これは、血小板膜リン脂質と相互作用し、血小板の接着および凝集を増加させることによって、血栓の形成を早めるからである。上述の診断試験は、他のアッセイと組み合わせることで、ループス抗凝固因子を検出するのに役立つ。

10

20

【0149】

本発明のもう一つの態様は、機能的に活性な本発明の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物の量を、該分子で処置された被験者の血液において、捕捉試薬として実施例1Kおよび／または1Lからの化合物を使って決定するためのインビトロ診断方法である。例えばELISAアッセイでは、実施例1Kおよび／または1Lからの化合物をストレプトアビジンコートウェルに固定化し、本発明の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物を含有する試料を加えることができる。洗浄ステップに続いて、捕捉された該分子を検出抗体で検出することができ、結果を、既知量の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物による検量線と比較することによって、試料中の物質量を計算することができる。

30

【0150】

本発明のもう一つの態様は、式1の構造を含むFXa阻害剤で処置された被験者の体液における該阻害剤の量を、実施例1Kおよび／または1Lからの化合物と、ELISA試験用の捕捉試薬としての本発明の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物とを使って決定するためのインビトロ診断方法である。結合している、式1の構造を含むFXa阻害剤の量は、標識抗イディオタイプ抗体(本発明の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物へのその結合が、該阻害剤の存在下ではブロックされるもの)の添加によって生成させることができるシグナルから見積もることができる。

【0151】

本発明のもう一つの態様は、式1の構造を含むFXa阻害剤で処置された被験者の体液における該阻害剤の量を、競合結合アッセイにおいて実施例1Kおよび／または1Lからの化合物と本発明の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物とを使って決定するためのインビトロ診断方法である。さらに詳しく述べると、該阻害剤で処置された被験者からの体液、例えば血漿を、固定された量の本発明の抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物と共にプレインキュベートすることができる。次に、固定化した実施例1Kおよび／または1Lからの化合物への本発明の抗体の残存結合量を、例えばELISAアッセイなどで評価することができる。試料中の該阻害剤の量は、結果を、既知量の阻害剤による検量線と比較することによって計算することができる。

40

【0152】

好ましい一実施形態では、体液が、例えば尿、血液、血漿、血清および唾液である。も

50

う一つの好ましい実施形態では、体液が血液である。

【0153】

本発明のもう一つの実施形態は、マトリックスに係留された抗凝固剤と、該抗凝固剤に結合する本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントとを含む診断キットである。係留は、リンカー、例えばビオチンリンカーによるものであることができる。マトリックスは固体マトリックス、例えばマイクロタイタープレートであることができる。上記診断キットの好ましい一実施形態では、抗凝固剤がリバーロキサバンである。上記診断キットのさらなる好ましい一実施形態では、係留された抗凝固剤が、実施例1Kの化合物または実施例1Lの化合物である。さらなる好ましい一実施形態では、抗体がM18-G08、M18-G08-G、もしくはM18-G08-G-DKTH、またはその抗原結合性フラグメントである。最も好ましいキットは、抗体M18-G08-G-DKTHまたはその抗原結合性フラグメントと、実施例1Kの化合物とを含む。さらなる一実施形態では、試料中の抗凝固剤（ここでは抗凝固剤がキットの抗凝固剤に対応する）を定量的および／または定性的に決定するための診断方法であって、（a）上記キットの抗体またはその抗原結合性フラグメントの混合物を、抗凝固剤への抗体の結合を可能にする条件下で形成させるステップ、（b）該混合物を、上記キットの係留された抗凝固剤と、抗凝固剤への抗体の結合を可能にする条件下で接触させるステップ、（c）係留された抗凝固剤に結合している抗体または抗原結合性フラグメントの量を決定するステップを含む方法において、上記の診断キットが使用される。試料中の該抗凝固剤の量は、結果を、既知量の該抗凝固剤による検量線と比較することによって計算することができる。好ましい一実施形態では、試料が体液である。より好ましいのは、尿、血液、血漿、血清および唾液からなる液体の群に含まれる体液である。好ましい一実施形態では、上記診断方法がリバーロキサバンを決定するための方法である。好ましくは、本方法では、抗体M18-G08-G-DKTHまたはその抗原結合性フラグメントと、実施例1Kの化合物とを含むキットを使用する。そのような診断方法の例は、実施例22に示す競合ELISAフォーマット法である。

【0154】

医薬組成物および投与

本発明は、本発明の抗体および抗原結合性フラグメントを単独で、または少なくとも1つの他の薬剤、例えば安定化化合物と組み合わせて含むことができ、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、および水などといった（ただしこれらに限るわけではない）任意の滅菌生体適合性医薬担体に入れて投与することができる医薬組成物にも関係する。これらの分子はいずれも、単独で、または他の薬剤、薬物もしくはホルモンと組み合わせて、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の形で、患者に投与することができる。本発明の一実施形態では、医薬上許容される担体が医薬的に不活性である。

【0155】

本発明は医薬組成物の投与にも関係する。そのような投与は、経口的または非経口的に行われる。非経口送達の方法には、局所、動脈内、筋肉内、皮下、髄内、髄腔内、脳室内、静脈内、腹腔内、または鼻腔内投与が含まれる。これらの医薬組成物は、活性成分に加えて、活性化合物を医薬的に使用することができる調製物へと加工することを容易にする賦形剤および助剤を含む適切な医薬上許容される担体を含有しうる。製剤および投与のための技法に関するさらなる詳細は「Remington's Pharmaceutical Sciences」（編、Maack Publishing Co.、ペンシルバニア州イーストン）の最新版に見いだすことができる。

【0156】

経口投与用の医薬組成物は、当技術分野において周知の医薬上許容される担体を使って、経口投与に適した投薬量で、製剤化することができる。そのような担体は、医薬組成物を、患者による摂取のための錠剤、丸剤、糖衣丸、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとして、製剤化することを可能にする。

【0157】

経口使用のための医薬調製物は、活性化合物を固形賦形剤と混和し、場合によっては、得られた混合物を粉碎し、所望であれば適切な助剤を添加した後に、錠剤または糖衣丸の核が得られるように顆粒の混合物を加工することによって、得ることができる。適切な賦形剤は、糖質またはタンパク質充填剤、例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む糖類；トウモロコシ、コムギ、コメ、ジャガイモ、または他の植物由来のデンプン；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースまたはカルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース；アラビアゴムおよびトラガカントゴムを含むゴム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンなどのタンパク質である。所望であれば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤または可溶化剤を添加してもよい。

10

【0158】

糖衣丸の核には、濃厚糖溶液などの適切なコーティングが施され、このコーティング溶液も、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボポールゲル、ポリエチレングリコールおよび／または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合物を含むことができる。製品識別のために、または活性化合物の量、すなわち投薬量を特徴づけるために、錠剤または糖衣丸のコーティングには、染料または顔料を加えてもよい。

【0159】

経口的に使用することができる医薬調製物には、ゼラチン製のプッシュフィット式（push-fit）カプセル剤、ならびにゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールなどのコーティングで作られた密封軟カプセル剤が含まれる。プッシュフィット式カプセル剤は、ラクトースまたはデンプンなどの充填剤または結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、そして場合によっては安定化剤と混合された活性成分を含むことができる。軟カプセル剤では、活性化合物を適切な液体、例えば安定化剤を含む、または安定化剤を含まない、脂肪油、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどに溶解または懸濁することができる。

20

【0160】

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。注射のために、本発明の医薬組成物を、水溶液中に、好ましくは生理学的に適合するバッファー、例えばハンス液、リンゲル液、または生理学的緩衝食塩水中に製剤化することができる。水性注射懸濁液は、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、活性化合物の懸濁液は、適当な油性注射用懸濁剤として調製することもできる。適切な親油性の溶剤または媒体には、ゴマ油などの脂肪油、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、懸濁液は、適切な安定化剤、または高濃度溶液の調製が可能になるように化合物の溶解度を増加させる薬剤も含有してよい。

30

【0161】

局所または経鼻投与のためには、浸透すべき特定の障壁に適した浸透剤を、製剤中に使用する。そのような浸透剤は当技術分野では広く知られている。

40

【0162】

キット

本発明はさらに、上記の本発明の組成物の成分の1つ以上が充填された1つ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、医薬または生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する政府当局によって指示された形式で、当局によるヒトへの投与用の製品の製造、使用または販売の認可を反映した告知を、添付することができる。

【0163】

もう一つの実施形態において、キットは、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントをコードするDNA配列を含有してもよい。これらの抗体をコードするDNA配列は、好

50

ましくは、宿主細胞へのトランスフェクションと宿主細胞による発現に適したプラスミドに入れて提供される。プラスミドは、宿主細胞におけるDNAの発現を調節するために、プロモーター（多くの場合、誘導性プロモーター）を含有しうる。プラスミドは、プラスミド中に他のDNA配列を挿入してさまざまな抗体を生産することが容易になるように、適当な制限部位も含有しうる。プラスミドは、コードされているタンパク質のクローニングおよび発現を容易にするために、数多くの他の要素も含有しうる。そのような要素は、当業者にはよく知られており、例えば選択可能マーカー、開始コドン、終止コドンなどが含まれる。

【0164】

製造および貯蔵

本発明の医薬組成物は、当技術分野において知られている方法で、例えば従来の混合、溶解、造粒、糖衣形成、研和、乳化、カプセル化、捕捉または凍結乾燥プロセスなどによって、製造することができる。

【0165】

医薬組成物は塩として提供することができ、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸などの酸（ただしこれらに限るわけではない）を使って形成させることができる。塩は、水性溶媒または他のプロトン性溶媒に、対応する遊離塩基型よりも溶解しやすい傾向を示す。別の例では、好ましい調製物が、使用前にバッファーと混合される、pH範囲が4.5～5.5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であってもよい。

【0166】

許容される担体中に製剤化された本発明の化合物を含む医薬組成物を調製したら、それらを適当な容器に入れて、適応する状態の処置に関するラベリングをすることができる。本発明の抗体および抗原結合性フラグメントの投与に関して、そのようなラベリングには、投与の量、頻度および方法が含まれるであろう。

【0167】

治療有効量

本発明における使用に適した医薬組成物には、活性成分が、意図する目的、すなわち式1の構造を含むFXa阻害剤の中和を達成するのに有効な量で含有されている組成物が含まれる。有効量の決定は当業者の能力で十分に可能である。

【0168】

どの化合物についても、まず最初はインビトロ凝固試験（例えばPT）において、または動物モデル、通常はマウス、ウサギ、イヌ、またはブタにおいて、治療有効量を推定することができる。動物モデルを使って望ましい濃度範囲および投与経路も実現される。次に、そのような情報を、ヒトにおける投与にとって有用な用量および経路を決定するために使用することができる。

【0169】

治療有効量は、症状または状態を改善する、抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物の量を指す。そのような化合物の治療効力および毒性は、インビトロで、または実験動物において、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%にとって致死的な用量）などといった、標準的な医薬的手法によって決定することができる。治療効果と毒性効果の間の用量比が治療係数であり、これは比ED₅₀/LD₅₀として表すことができる。大きな治療係数を呈する医薬組成物は好ましい。インビトロアッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトでの使用のための投薬量範囲を策定する際に使用される。そのような化合物の投薬量は、好ましくは、ED₅₀を含み毒性はほとんどまたは全くないような循環濃度の範囲内にある。投薬量は、使用する剤形、患者の感度、および投与経路に応じてこの範囲内で変動する。

【0170】

本発明の抗体もしくは抗原結合性フラグメントまたは抗体模倣物は、対象の血漿中に存在する式1の構造を含むFXa阻害剤の効果を中和することが必要な時に、1回または数

10

20

30

40

50

回投与することができる。好ましくは、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは、単回投与で投与すれば、充分である。

【0171】

厳密な投薬量は、処置すべき患者を考慮して個々の医師が選択する。投薬量および投与は、十分なレベルの活性部分が提供されるように、または所望の効果が維持されるように、調節される。考慮することができる他の因子には、対象に投与された式1の構造を含むFXa阻害剤の実体および／または量、抗体またはその抗原結合性フラグメントの製剤および／または投与様式；患者の年齢、体重および性別；食餌、投与の時間および頻度、併用薬、反応感度、および治療に対する認容性／応答が含まれる。

【0172】

通常、投薬量は、投与経路に応じて、合計用量で0.1ミリグラムから100,000ミリグラムまで変動する。特定の投薬量および送達方法に関する指針は文献に記載されている。米国特許第4,657,760号；同第5,206,344号；または同第5,225,212号を参照されたい。当業者は、ポリヌクレオチド用には、タンパク質用またはそれらの阻害剤用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送達は、特定の細胞、状態、場所などに特異的であるだろう。放射標識抗体の場合、好ましい比放射能は、0.1mCi/mgタンパク質から10mCi/mgタンパク質までに及びうる(Rivara, Clin. Cancer Res. 5:3275-3280, 1999; Ulanerら, 2008 Radiology 246(3):895-902)。

【0173】

以下に実施例を挙げて、本発明を、さらに詳しく説明する。これらの実施例は、具体的な実施形態を参照して本発明を例証するために提供されるにすぎない。これらの実施例は、本発明の一定の具体的な態様を例解するものではあるが、限定を表すものではなく、ここに開示する発明の範囲を定めようとするものでもない。

【0174】

全ての実施例は、別段の説明が詳細になされている部分を除き、当業者にとっては周知かつ定型的な標準的技法使って行われた。下記実施例の定型的な分子生物学技法は、Sambrookら「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第2版；Cold Spring Harbor Laboratory Press, コールドスプリングハーバー, ニューヨーク, 1989などの標準的実験マニュアルに記載されているとおりに行うことができる。

【実施例】

【0175】

A) 実施例

略号：

aq. : 水溶液

cat. : 触媒

d : 日

DCI : 直接化学イオン化 (MSにおいて)

DMAp : 4-ジメチルアミノピリジン

DMF : ジメチルホルムアミド

DMSO : ジメチルスルホキシド

EDC : $\text{N}' - (3\text{-ジメチルアミノプロピル}) - \text{N} - \text{エチルカルボジイミド} \cdot \text{HCl}$

EI : 電子衝撃イオン化 (MSにおいて)

ESI : エレクトロスプレーイオン化 (MSにおいて)

Et : エチル

GC-MS : ガスクロマトグラフィー連動質量分析

h : 時間

HATU : $\text{O} - (7\text{-アザベンゾトリアゾール-1-イル}) - \text{N}, \text{N}, \text{N}', \text{N}'\text{-テト}$

10

20

30

40

50

ラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート

H O B t : 1 H - 1 , 2 , 3 - ベンゾトリアゾール - 1 - オール水和物

H P L C : 高圧高性能液体クロマトグラフィー

c o n c . : 濃

L C - M S : 液体クロマトグラフィー連動質量分析

M e t h . : 方法

m i n : 分

M S : 質量分析

N M R : 核磁気共鳴分光法

R_t : 保持時間 (H P L C において)

R T : 室温

T F A : トリフルオロ酢酸

T H F : テトラヒドロフラン

【0176】

L C - M S 法 :

方法1A : 計器 : M i c r o m a s s Q u a t t r o P r e m i e r / W a t e r s U P L C A c q u i t y ; カラム : T h e r m o H y p e r s i l G O L D 1 . 9 μ 50mm×1mm ; 移動相A : 1リットルの水+0.5mlの濃度50%のギ酸、移動相B : 1リットルのアセトニトリル+0.5mlの濃度50%のギ酸 ; 勾配 : 0.0分 90%A→0.1分 90%A→1.5分 10%A→2.2分 10%A ; 流速 : 0.33ml / 分 ; オープン : 50℃ ; U V 検出 : 210nm。

【0177】

方法2A : 計器 : M i c r o m a s s Q u a t t r o M i c r o M S と H P L C A g i l e n t シリーズ1100 ; カラム : T h e r m o H y p e r s i l G O L D 3 μ 20mm×4mm ; 移動相A : 1リットルの水+0.5mlの濃度50%のギ酸、移動相B : 1リットルのアセトニトリル+0.5mlの濃度50%のギ酸 ; 勾配 : 0.0分 100%A→3.0分 10%A→4.0分 10%A→4.01分 100%A (流速2.5ml / 分) →5.00分 100%A ; オープン : 50℃ ; 流速 : 2ml / 分 ; U V 検出 : 210nm。

【0178】

方法3A : 計器 : W a t e r s A C Q U I T Y S Q D U P L C S y s t e m ; カラム : W a t e r s A c q u i t y U P L C H S S T 3 1.8 μ 50mm×1mm ; 移動相A : 1リットルの水+0.25mlの濃度99%のギ酸、移動相B : 1リットルのアセトニトリル+0.25mlの濃度99%のギ酸 ; 勾配 : 0.0分 90%A→1.2分 5%A→2.0分 5%A ; オープン : 50℃ ; 流速 : 0.40ml / 分 ; U V 検出 : 210~400nm。

【0179】

方法4A : 計器 : W a t e r s Z Q と H P L C A g i l e n t シリーズ1100 ; U V D A D ; カラム : T h e r m o H y p e r s i l G O L D 3 μ 20mm×4mm ; 移動相A : 1リットルの水+0.5mlの濃度50%のギ酸、移動相B : 1リットルのアセトニトリル+0.5mlの濃度50%のギ酸 ; 勾配 : 0.0分 100%A→3.0分 10%A→4.0分 10%A ; オープン : 55℃ ; 流速 : 2ml / 分 ; U V 検出 : 210nm。

【0180】

エナンチオマーの分取のための分離 :

方法1B : 相 : 球状ビニルシリカゲル結合型メタクリル-L-ロイシン-tert-ブチルアミド、670mm×40mm ; 移動相 : 酢酸エチル ; 流速 : 80ml / 分、U V 検出 : 265nm。

【0181】

方法2B : 相 : 球状ビニルシリカゲル結合型メタクリル-L-ロイシン-ジシクロプロ

10

20

30

40

50

ピルメチルアミド、670mm×40mm；移動相A：酢酸エチル、移動相B：メタノール；勾配：0.0分 100%A→10.1分 100%A→13.1分 100%B→13.11分 100%A→21.0分 100%A；流速：80ml/分、UV検出：265nm。

【0182】

エナンチオマーの分析のための分離：

方法1C：相：球状ビニルシリカゲル結合型メタクリル-L-ロイシン-ジシクロプロピルメチルアミド、250mm×4.6mm；移動相：酢酸エチル；流速：2ml/分、UV検出：265nm。

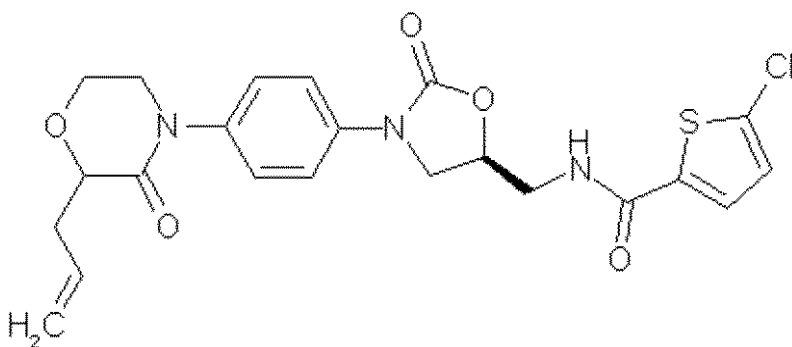
【0183】

出発物質

実施例1A

N-（{（5S）-3-〔4-（2-アリル-3-オキシモルホリン-4-イル）フェニル〕-2-オキソ-1,3-オキサゾリジン-5-イル}メチル）-5-クロロチオフエン-2-カルボキサミド〔ジアステレオマーの混合物〕

【化3】



10.9g（25.0mmol）の5-クロロ-N-（{（5S）-2-オキソ-3-〔4-（3-オキソ-4-モルホリニル）フェニル〕-1,3-オキサゾリジン-5-イル}メチル）-2-チオフエンカルボキサミド（WO 01/047919に記載）を250mlのTHFに溶解し、62.5ml（10.5g、62.5mmol）の1Nリチウムヘキサメチルジシラジド-THF溶液を、-78℃でゆっくり加えた。30分後に、2.4ml（4.4g、26.2mmol）の3-ヨード-2-プロペンを滴下した。反応混合物を室温まで温まらせ、この温度で16時間攪拌した。次に飽和塩化アンモニウム水溶液と酢酸エチルとを加えた。相を分離し、水相を酢酸エチルで抽出した。合わせた有機抽出物を水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣をジクロロメタンに溶解し、シリカゲルでのカラムクロマトグラフィー（移動相：勾配、酢酸エチル/ジクロロメタン 2：1→酢酸エチル）により精製した。収量：5.8g（理論値の49%）。

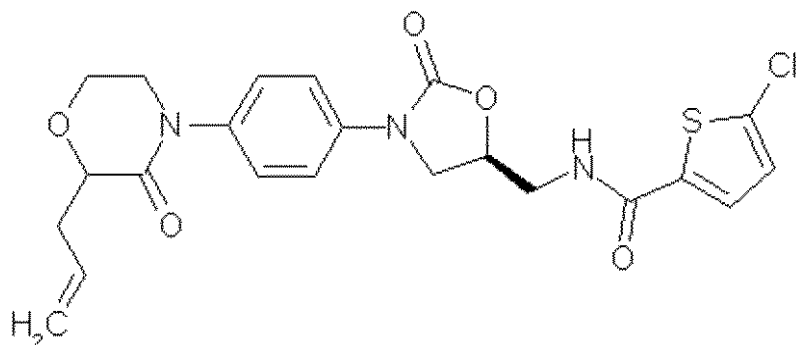
LC-MS（方法3A）：Rt=0.97分；MS（ESIpos）：m/z=476 [M+H]⁺。

【0184】

実施例1B

N-（{（5S）-3-〔4-（2-アリル-3-オキシモルホリン-4-イル）フェニル〕-2-オキソ-1,3-オキサゾリジン-5-イル}メチル）-5-クロロチオフエン-2-カルボキサミド〔エナンチオマー的に純粋なジアステレオマー2〕

【化 4】



10

実施例 1 A からの化合物 5. 7 g (12. 0 mmol) の異性体を、方法 1 B に従って分離することにより、2. 5 g の実施例 1 B (2 番目に溶出する化合物) を得た。

LC-MS (方法 3 A) : Rt = 0. 95 分; MS (ESI pos) : m/z = 476 [M+H]⁺。

HPLC (方法 1 C) : Rt = 4. 15 分。

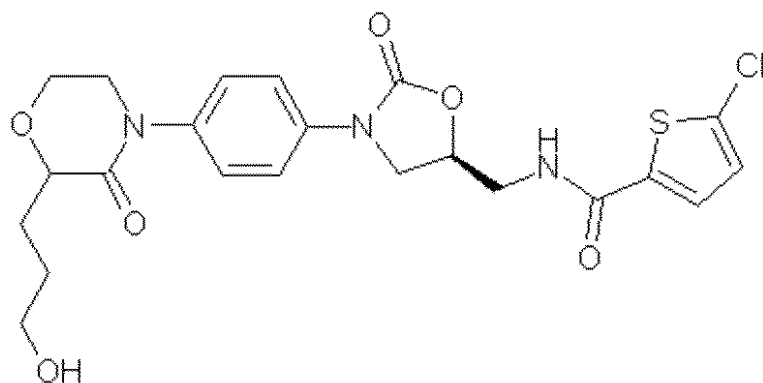
【0185】

実施例 1 C

5-クロロ-N- { [(5S) - 3 - { 4 - [2 - (3-ヒドロキシプロピル) - 3-オキソモルホリン-4-イル] フェニル } - 2-オキソ-1, 3-オキサゾリジン-5-イル] メチル } チオフェン-2-カルボキサミド [エナンチオマー的に純粋なジアステレオマー]

20

【化 5】



30

実施例 1 B からの化合物 2. 5 g (5. 25 mmol) を 35 ml の THF に溶解し、9-ボラビシクロ [3. 3. 1] ノナンの 0. 5 M THF 溶液 23. 1 ml (1. 41 g、11. 6 mmol) を 10 ~ 15 °C で加えた。反応混合物を室温まで温まらせ、この温度で 1. 5 時間攪拌した。13. 1 ml (1. 05 g、26. 3 mmol) の 2 N 水酸化ナトリウム溶液を 0 ~ 5 °C で滴下した。次に、過酸化水素の 36 % 溶液 4. 6 ml を、バス温度が 30 °C を超えないように滴下した。30 分後に酢酸エチルと水を加えた。有機相を分離した。水相を酢酸エチルで抽出した。合わせた有機抽出物を亜硫酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣を 30 ~ 35 °C で酢酸エチルと混合し、濾過し、酢酸エチルで洗浄した。残渣を減圧下で乾燥し、粗生成物を、これ以上精製することなく、さらに反応させた。

40

LC-MS (方法 3 A) : Rt = 0. 82 分; MS (ESI pos) : m/z = 494 [M+H]⁺。

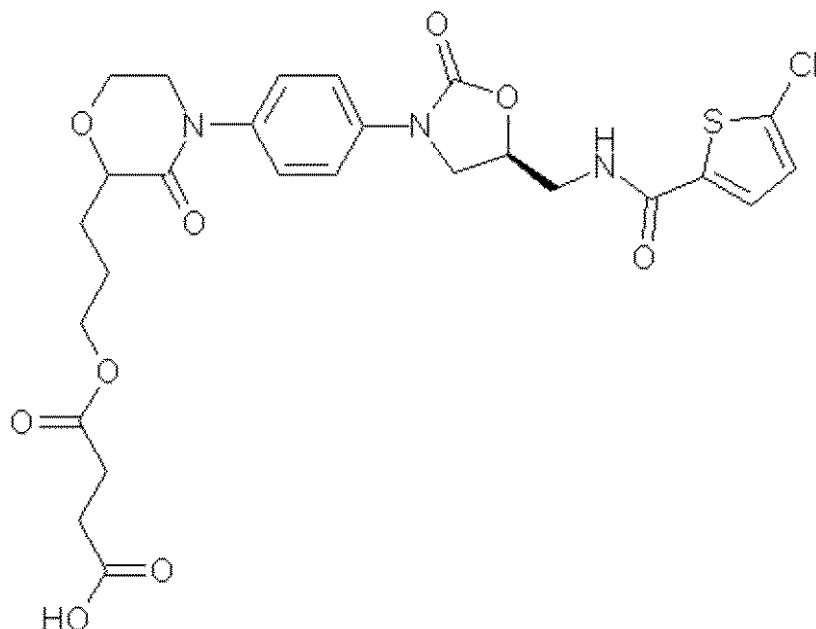
【0186】

実施例 1 D

4 - [3 - (4 - { 4 - [(5S) - 5 - ({ [(5-クロロ-2-チエニル) カルボニル] アミノ } メチル) - 2-オキソ-1, 3-オキサゾリジン-3-イル] -フェニル } - 3-オキソモルホリン-2-イル) プロポキシ] - 4-オキソブタン酸 [エナンチオマー的に純粋なジアステレオマー]

50

【化 6】



10

実施例 1 C からの化合物 300 mg (0.61 mmol)、182 mg (1.82 mmol) の無水コハク酸、0.23 ml (226 mg、2.85 mmol) のピリジンおよび 223 mg (1.82 mmol) の DMA P を、2 ml の DMF に加えて溶解した。反応混合物を室温で 1 時間攪拌した。反応混合物を分取用 HPLC で精製した。収量：134 mg (理論値の 37%)。

20

LC-MS (方法 1 A) : Rt = 0.98 分 ; MS (ESI pos) : m/z = 594 [M+H]⁺。

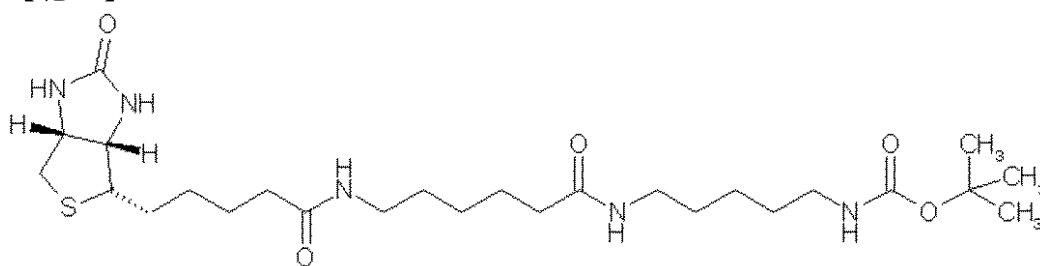
【0187】

実施例 1 E

tert-ブチル- (5- { [6- ({5- [(3aS, 4S, 6aR) -2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ [3, 4-d] イミダゾール-4-イル] ペンタノイル} -アミノ) ヘキサノイル] アミノ} ペンチル) カルバメート

30

【化 7】



30 ml の DMF に懸濁した 500 mg (1.40 mmol) の N-(+) -ビオチニル-6-アミノカプロン酸、283 mg (1.40 mmol) の tert-ブチル- (5-アミノペンチル) カルバメート、321 mg (2.10 mmol) の HOB T、0.24 ml (181 mg、1.40 mmol) の N, N-ジイソプロピルエチルアミンおよび 322 mg (1.68 mmol) の EDC を室温で 16 時間攪拌した。次に、さらに 291 mg (1.44 ml) の tert-ブチル- (5-アミノペンチル) カルバメートを追加し、その混合物を室温でさらに 16 時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、水および酢酸エチルならびに少量のジオキサンを加えた。水相を酢酸エチルで数回抽出した。合わせた有機抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮した。粗生成物を分取用 HPLC で精製した。収量：100 mg (理論値の 13%)。

40

LC-MS (方法 4 A) : Rt = 1.71 分 ; MS (ESI pos) : m/z = 542 [M+H]⁺。

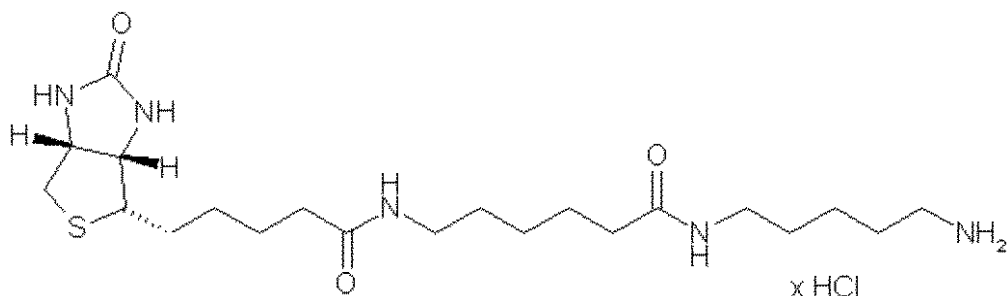
50

【0188】

実施例 1 F

N-（5-アミノペンチル）-6-（{5-[(3aS, 4S, 6aR)-2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3, 4-d]イミダゾール-4-イル]-ペンタノイル}アミノ)ヘキサナムド塩酸塩

【化 8】



10

実施例 1 Eからの化合物 100 mg (0.19 mmol) を 2 ml のメタノールに溶解し、2 ml のクロロメタンと 2 ml (2.0 mmol) の 1 N 塩酸-ジエチルエーテル溶液とを加えた。その混合物を室温で 16 時間攪拌し、減圧下で濃縮し、乾燥した。収量：90 mg (理論値の 98%)。

LC-MS (方法 3 A) : Rt = 0.46 分; MS (ESI pos) : m/z = 442 [M+H-HCl] +。

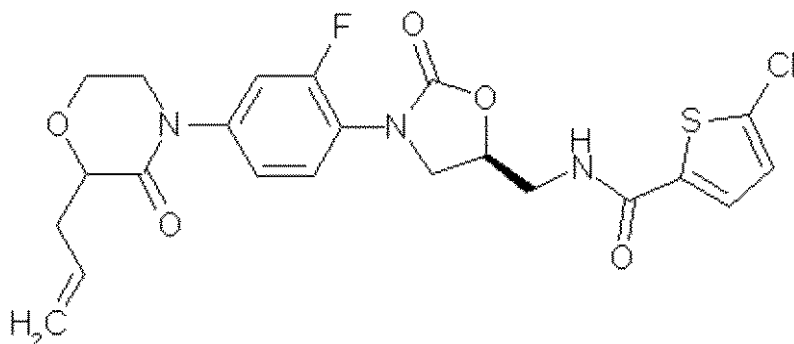
20

【0189】

実施例 1 G

N-（{(5S)-3-[4-(2-アリル-3-オキソモルホリン-4-イル)-2-フルオロフェニル]-2-オキソ-1, 3-オキサゾリジン-5-イル}メチル）-5-クロロチオフエン-2-カルボキサミド [ジアステレオマーの混合物]

【化 9】



30

10.0 g (22.0 mmol) の 5-クロロ-N-（{(5S)-3-[2-フルオロ-4-(3-オキソモルホリン-4-イル)フェニル]-2-オキソ-1, 3-オキサゾリジン-5-イル}メチル）チオフエン-2-カルボキサミド (WO 2008/155034 に記載) を 220 ml の THF に溶解し、26.4 ml (4.42 g, 26.4 mmol) の 1 N リチウムヘキサメチルジシラジド-THF 溶を -78 °C でゆっくり加えた。30 分後に、2.12 ml (3.89 g, 23.1 mmol) の 3-ヨード-2-プロペンを滴下した。反応混合物を室温までゆっくり温まらせ、この温度で 16 時間攪拌した。次に、飽和塩化アンモニウム水溶液および酢酸エチルを加えた。相を分離し、水相を酢酸エチルで抽出した。合わせた有機抽出物を水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮した。収量：3.8 g (理論値の 35%)。

40

LC-MS (方法 3 A) : Rt = 0.96 分; MS (ESI pos) : m/z = 494 [M+H] +。

【0190】

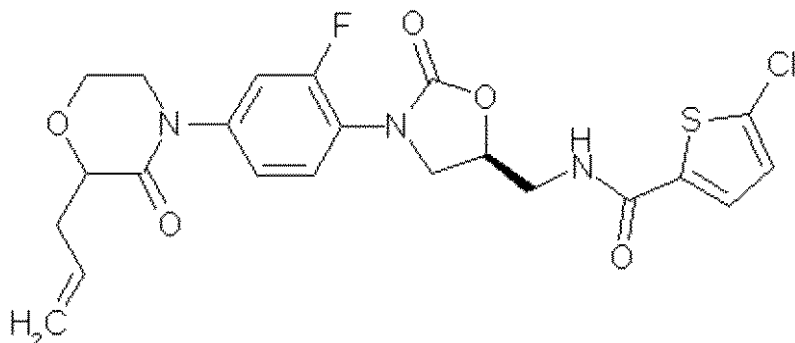
実施例 1 H

N-（{(5S)-3-[4-(2-アリル-3-オキソモルホリン-4-イル)-2

50

ーフルオロフェニル]ー2ーオキソー1, 3ーオキサゾリジンー5ーイル}メチル)ー5ークロロチオフエンー2ーカルボキサミド [エナンチオマー的に純粋なジアステレオマー1]

【化10】



10

実施例1Gからの化合物2. 90g (5.87mmol)の異性体を方法2Bに従って分離することにより、1.40gの実施例1H (最初に溶出する化合物)を得た。

LC-MS (方法2A) : $R_t = 2.02$ 分; MS (ESIpos) : $m/z = 494$ [M+H]⁺。

HPLC (方法1C) : $R_t = 2.54$ 分。

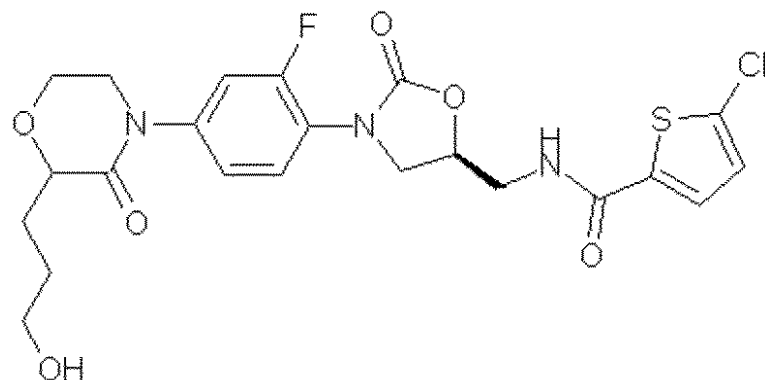
【0191】

実施例1I

20

5ークロローNー{ [(5S)ー3ー{2ーフルオロー4ー[2ー(3ーヒドロキシプロピル)ー3ーオキソモルホリンー4ーイル]フェニル}ー2ーオキソー1, 3ーオキサゾリジンー5ーイル}メチル}チオフエンー2ーカルボキサミド [エナンチオマー的に純粋なジアステレオマー]

【化11】



30

実施例1Hからの化合物1. 40g (2.83mmol)を15mlのTHFに溶解し、9ーボラビシクロ[3.3.1]ノナンの0.5M THF溶液12.5ml (0.76g, 6.24mmol)を10~15℃で加えた。反応混合物を室温まで温まらせ、この温度で1.5時間攪拌した。7.1ml (0.57g, 14.2mmol)の2N水酸化ナトリウム溶液を0~5℃で滴下した。次に、過酸化水素の35%溶液2.5mlを、バス温度が30℃を超えないように、滴下した。30分後に、酢酸エチルおよび水を加えた。有機相を分離した。水相を酢酸エチルで抽出した。合わせた有機抽出物を亜硫酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣を30~35℃で酢酸エチルと混合し、濾過し、酢酸エチルで洗浄した。残渣を減圧下で乾燥し、粗生成物を、これ以上精製することなく、さらに反応させた。

40

LC-MS (方法3A) : $R_t = 0.83$ 分; MS (ESIpos) : $m/z = 512$ [M+H]⁺。

【0192】

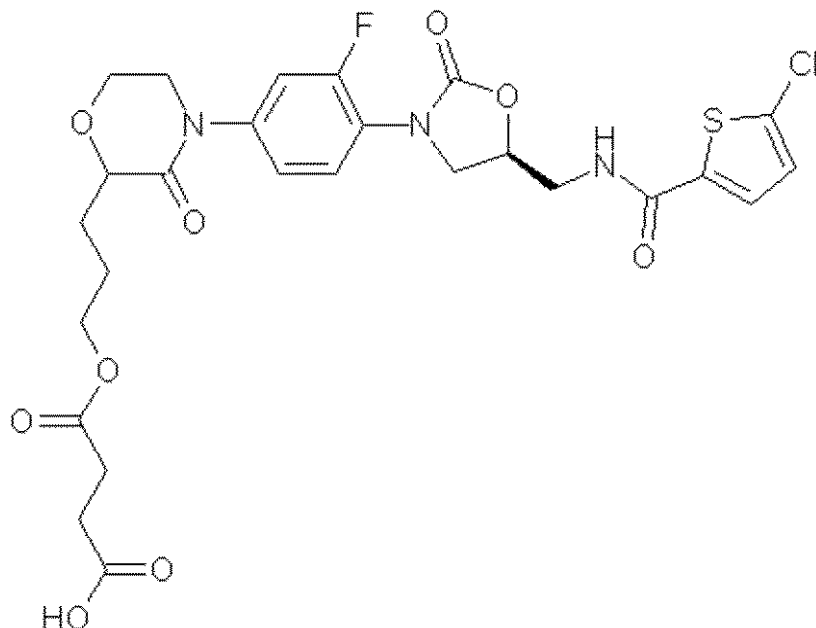
実施例1J

{4ー[(5S)ー5ー({ [(5ークロロー2ーチエニル)カルボニル]アミノ}メ

50

チル) - 2 - オキソ - 1, 3 - オキサゾリジン - 3 - イル] - 3 - フルオロフェニル} - 3 - オキソモルホリン - 2 - イル) プロポキシ] - 4 - オキソブタン酸 [エナンチオマー的に純粋なジアステレオマー]

【化 1 2】



10

20

実施例 1 I からの化合物 300 mg (0.59 mmol)、176 mg (1.76 mmol) の無水コハク酸、223 μ l (218 mg、1.76 mmol) のピリジンおよび 215 mg (1.76 mmol) の N, N - 4 - ジメチルアミノピリジンを 1 ml の DMF に加えて溶解させた。反応混合物を室温で 1 時間攪拌した。反応混合物を分取用 HPLC で精製した。収量：132 mg (理論値の 37%)。

LC-MS (方法 1 A) : Rt = 0.99 分; MS (ESI pos) : m/z = 612 [M+H]⁺。

【0193】

実施例 (Working example)

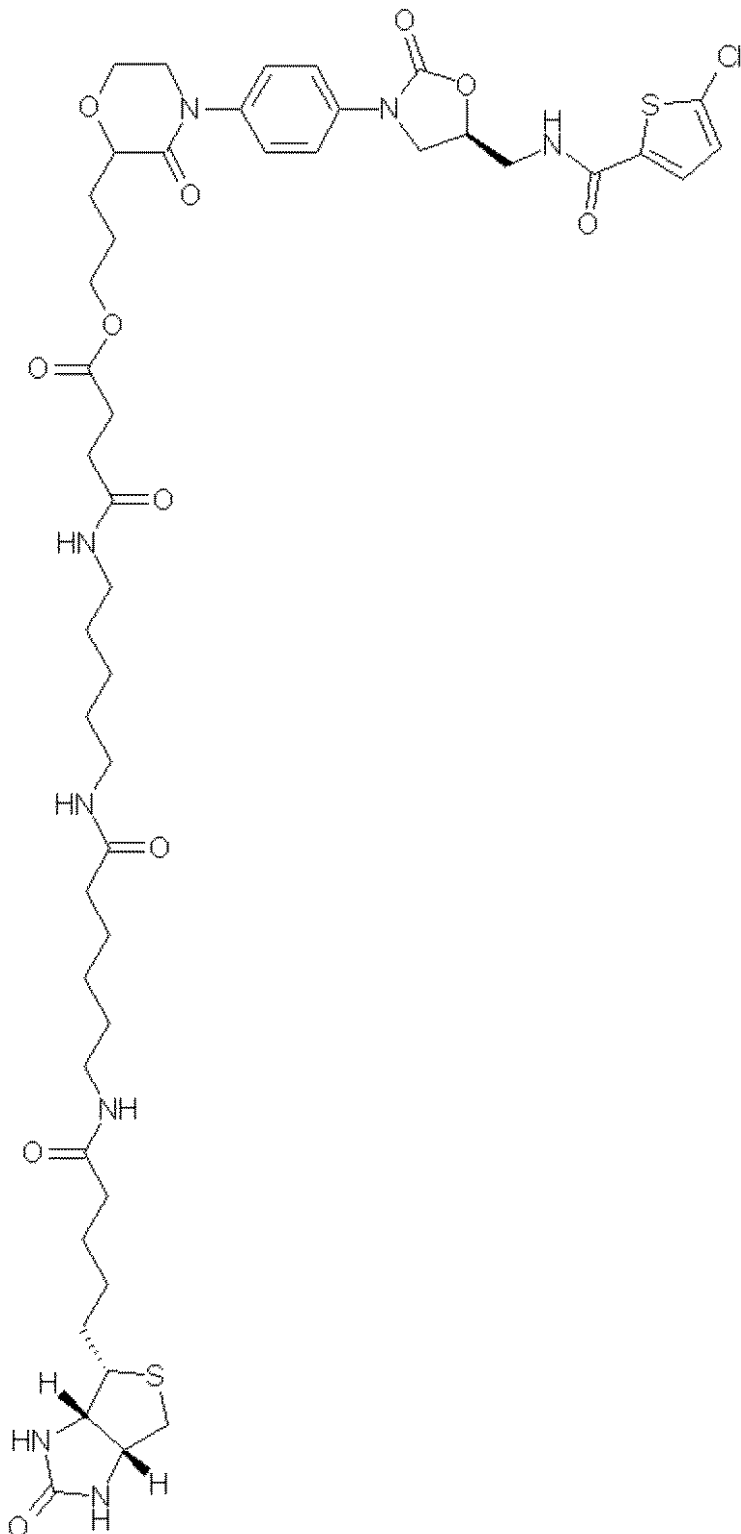
30

実施例 1 K

3 - (4 - {4 - [(5S) - 5 - ({[(5-クロロ-2-チエニル)カルボニル]アミノ}メチル) - 2 - オキソ - 1, 3 - オキサゾリジン - 3 - イル] - フェニル} - 3 - オキソモルホリン - 2 - イル) プロピル - 4 - オキソ - 4 - [(5 - { [6 - ({5 - [(3aS, 4S, 6aR) - 2 - オキソヘキサヒドロ - 1H - チエノ [3, 4-d] イミダゾール - 4 - イル] ペンタノイル} アミノ) ヘキサノイル] アミノ} ペンチル) アミノ] ブタノエート

[エナンチオマー的に純粋なジアステレオマー]

【化 1 3】



実施例 1 F からの化合物 24 mg (0.05 mmol) と実施例 1 D からの化合物 30 mg (0.05 mmol) を 1 ml の DMF に溶解してから、26 μ l (19 mg、0.15 mmol) の N, N-ジイソプロピルエチルアミンおよび 29 mg (0.08 mmol) の HATU を加えた。その混合物を室温で 1 時間攪拌し、減圧下で濃縮し、分取用 HPLC で精製した。収量：9 mg (理論値の 18%)。

LC-MS (方法 3 A) : $R_t = 0.81$ 分 ; MS (ESI pos) : $m/z = 1017$ [M+H]⁺。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) $\delta = 9.05 - 8.90$ (m, 1H), 7.86 - 7.76 (m, 1H), 7.72 - 7.66 (m, 3H), 7.55 (d,

10

20

30

40

50

2 H), 7.37 (d, 2 H), 7.19 (d, 1 H), 6.47-6.28 (m, 1 H), 4.90-4.77 (m, 1 H), 4.36-4.26 (m, 1 H), 4.25-3.99 (m, 6 H), 3.95-3.79 (m, 3 H), 3.65-3.52 (m, 3 H), 3.14-3.05 (m, 1 H), 3.03-2.96 (m, 6 H), 2.82 (d, 1 H), 2.39-2.28 (m, 2 H), 2.08-1.98 (m, 3 H), 1.94-1.86 (m, 1 H), 1.82-1.55 (m, 4 H), 1.54-1.42 (m, 5 H), 1.41-1.17 (m, 15 H)。

【0194】

実施例 1 L

3-(4-{4-[(5S)-5-({[(5-クロロ-2-チエニル)カルボニル]アミノ}メチル)-2-オキソ-1,3-オキサゾリジン-3-イル]-3-フルオロフェニル}-3-オキソモルホリン-2-イル)プロピル-4-オキソ-4-[(5-{[6-({5-[(3aS,4S,6aR)-2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル]ペンタノイル}アミノ)ヘキサノイル]アミノ}ペンチル)アミノ]ブタノエート [エナンチオマー的に純粋なジアステレオマー]

10

10



30

40

50

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 9.00–8.96 (m, 1H), 7.81 (t, 1H), 7.75–7.63 (m, 3H), 7.58–7.40 (m, 2H), 7.28 (dd, 1H), 7.21 (d, 1H), 6.46–6.31 (m, 2H), 4.93–4.82 (m, 1H), 4.36–4.27 (m, 1H), 4.27–

4. 18 (m, 1H), 4. 15–4. 05 (m, 3H), 4. 05–3. 99 (m, 2H), 3. 95–3. 84 (m, 2H), 3. 81 (dd, 1H), 3. 68–3. 55 (m, 4H), 3. 15–3. 05 (m, 1H), 3. 02–2. 99 (m, 6H), 2. 82 (dd, 1H), 2. 38–2. 26 (m, 2H), 2. 10–1. 98 (m, 4H), 1. 96–1. 55 (m, 4H), 1. 49–1. 42 (m, 4H), 1. 41–1. 30 (m, 6H), 1. 26–1. 12 (m, 4H)。

【0195】

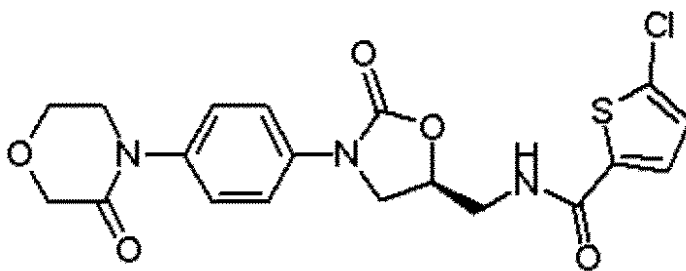
構造および名称

リパーロキサバン

5-クロロ-N-({(5S)-2-オキソ-3-[4-(3-オキソ-4-ホルホルニル)フェニル]-1, 3-オキサゾリジン-5-イル}-メチル)-2-チオフエンカルボキサミド

WO 01/047919 (実施例44)に記載されている。

【化15】



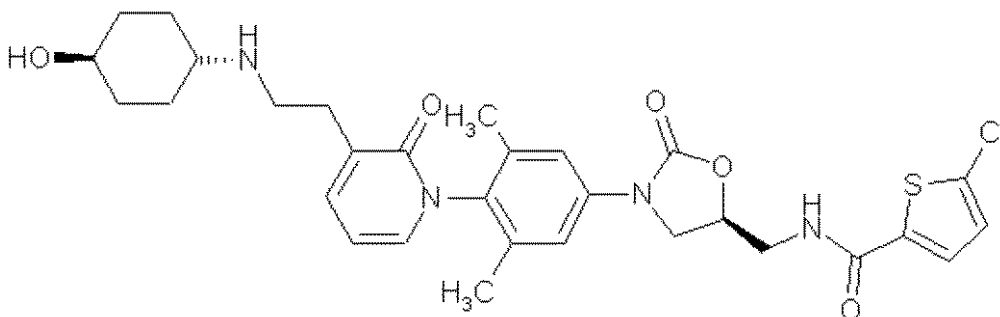
【0196】

SATI

5-クロロ-N-{[(5S)-3-{4-[3-{2-[(trans-4-ヒドロキシシクロヘキシル)アミノ]エチル}-2-オキソピリジン-1(2H)-イル]-3, 5-ジメチルフェニル}-2-オキソ-1, 3-オキサゾリジン-5-イル]メチル}-チオフエン-2-カルボキサミド

WO 2008/155032 (実施例38)のSATIに記載されている。

【化16】



【0197】

実施例2：n-CoDeRライブラリーからの抗体生成

ファージ選択：

式1の基を含むFXa阻害剤に対するヒト抗体またはその抗原結合性フラグメントの単離は、BioInvent International AB（スウェーデン・ルンド）のナীবF**ab**抗体ライブラリーn-CoDeR（これは6つのCDR全てが多様化されているF**ab**ライブラリーである）を使用するファージディスプレイ技術（Soederingら, Nat. Biotech. 2000, 18:853–856に記載されている）によって行った。

【0198】

この実施例において使用した標準的緩衝液は次のとおりである：

1×PBS:Sigma製(D5652-50l)

PBST:0.05% Tween20(Sigma、P7949)を補足した1×PBS

PBST-MP3%:3%粉乳(Cell Signaling、9999)を補足したPBST。

【0199】

簡単に述べると、Fab抗体ライブラリーの一部を、まず最初にストレプトアビジンコートDynabeads M280(Invitrogen、11206D)と共に60分間、次に濃度500nMのFITC-ビオチン(Sigma、B8889)と共に10分間、エンドツーエンド(end-to-end)ローテーターで、逐次、ブレインキュベートすることにより、望ましくない表面結合物質を枯渇させた。次に、1.5時間のインキュベーションステップにおいて、150μlの新しいストレプトアビジンコートビーズを、選択バッファーPBST中で、500nMの実施例1Kの化合物または500nMの実施例1Lの化合物にプレカップリングしてから、PBSTでビーズをよく洗浄した。次に、コートビーズを、ブロッキング緩衝液中、エンドツーエンドローテーターで、30分間インキュベートすることによってブロッキングした。ブロッキングしたコートビーズを、ブロッキング緩衝液でよく洗浄してから、ブロッキングし枯渇させたFabライブラリーの一部と混合した。エンドツーエンドローテーターで60分間のインキュベーション後に、試料をブロッキング緩衝液で3回洗浄し、次にPBSTで3回洗浄し、最後にPBS中で3回洗浄した。400μlのトリプシン溶液(PBS中、1mg/ml;Sigma、T1426)の添加によって、結合しているファージを溶出した。室温で30分間のインキュベーション後に、40μlのアプロチニン(PBS中、2mg/ml;Sigma、A1153)を加えることで、トリプシン消化を停止させた。

【0200】

溶出したファージを増殖させ、ファージ力価を既述のように決定した(Cicortas Gunnarssonら, Pprotein Eng Des Sel 2004; 17(3) 213-221)。簡単に述べると、溶出溶液の一部をタイトレーション実験のために取り置き、残りを使って指数増殖期の大腸菌HB101'(Bioinventから)を形質転換することにより、新しいファージストックを調製し、そのファージストックを、それぞれ100nMおよび20nMのターゲット分子を使用する第2および第3選択ラウンドに使用した。各選択ラウンドについて、インプットファージとアウトプットファージの両方を指数増殖期の大腸菌HB101'でタイトレートし、ファージELISAで分析するために第2および第3ラウンドからのクローンを拾った。

【0201】

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA):

ファージELISA:

異なる選択ラウンドから選択されたファージを、ファージELISAを使って、特異性について分析した。簡単に述べると、ファージ発現は、10μlの終夜培養物(100μg/mlアンピシリン(Sigma、A5354)および15μg/mlテトラサイクリン(Sigma、T3383)を補足したLB培地中)を、100μlの新鮮培地(100μg/mlアンピシリン、15μg/mlテトラサイクリンおよび0.1%グルコース(Sigma、G8769)を補足したLB培地)に加え、96ウェルMTP中、250rpm、37℃で、OD600が0.5に達するまで振とうすることによって行った。次に、ヘルパーファージM13KO7(Invitrogen、420311)を加え、試料を、37℃でさらに15分間、振とうせずにインキュベートした。IPTG(最終濃度0.25mM)を加えた後、細胞を、200rpmで振とうしながら、30℃で終夜インキュベートした。

【0202】

ストレプトアビジンがプレコートされた96ウェルELISAプレート(Pierce、15500)を、それぞれ実施例1Kおよび1Lからの化合物1μg/mlで、4℃に

において終夜コーティングした。翌日、プレートをPBSTで3回洗浄し、ブロッキング試薬で処理し、再びPBSTで3回洗浄した。その後、ファージ発現液から1ウェルあたり50 μ lずつ移し、室温で1時間インキュベートした。PBSTで3回洗浄した後、HRPにカップリングした抗M13抗体 (GE Healthcare、27-9421-01; PBSTに1:2500希釈) を加え、室温で1時間インキュベートした。50 μ lのTMB (Invitrogen、2023) の添加によって呈色反応を進行させ、5~15分後に、50 μ lのH₂SO₄ (Merck、1120801000) を加えることによって停止させた。比色反応をプレートリーダー (Tecan) において450nmで記録した。

【0203】

ELISAによるsFabのスクリーニング:

可溶性Fabフラグメント (sFab) を生成させるために、第2および第3選択ラウンドからのファージミドDNAを単離し、gene III産物を除去するために、制限酵素EagI (Fermentas、FD0334) およびEcoRI (NEB、R0101L) で、供給者の説明書に従って消化した。得られたフラグメントを再ライゲーションし、コンストラクトを、ケミカルコンピテント大腸菌Top10に、標準的方法を使って形質転換した。単クローンを拾って、LB培地 (100 μ g/ml、0.1%グルコース) が入っている96ウェルプレートに移し、250rpm、37 $^{\circ}$ Cで、OD600が0.5に達するまで振とうした。その後、IPTG (最終濃度0.5mM) の添加によって、sFab産生を誘導し、200rpmで振とうしながらインキュベーションを30 $^{\circ}$ Cで終夜続けた。翌朝、BEL緩衝液 (24.7g/lホウ酸; 18.7g/l NaCl; 1.49g/l EDTA pH8.0; 2.5mg/mlリゾチーム (Roche)) を各ウェルに加え、50 μ lの処理済み培養物を、ELISAにおけるターゲットへのsFabの結合について、検出をHRPにカップリングした抗hIgG (Fab特異的) (Sigma; A0293) で行った点以外は基本的にはファージについて述べたようにして、分析した。

【0204】

実施例3: 可溶性Fabスクリーニングヒットの小規模生産

表面プラズモン共鳴での一次キャラクタリゼーションおよび生化学的FXa活性アッセイにおけるリバーロキサバンの機能的中和のために、ユニークなスクリーニングヒットを小規模に生産した。50~100mlのLB培地 (0.1mg/mlアンピシリンおよび0.1%グルコースを補足したもの) に、最初のpBIFベクター中にクローニングされた (ただしgene III配列を欠く) ユニークなFab配列を含有する各大腸菌Top10クローンの前培養物を接種した。0.5mM IPTG (最終濃度) の添加によってsFabの生産を誘導し、250rpmで振とうしながら、30 $^{\circ}$ Cで終夜、インキュベーションを続けた。

【0205】

次に、細胞を遠心分離によって回収し、20%スクロース (w/v)、30mM TRIS、1mM EDTA、pH8.0、1mg/mlリゾチーム (Sigma、L-6876) および2.5 U/mlベンゾナーゼ (Sigma、E1014) を含有する溶解緩衝液中、4 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートすることによって、穏やかに溶解した。次に、清澄化した上清を、Capture Selectラムダアフィニティマトリックス (BAC0849.010) に適用した。そのマトリックスをPBSで洗浄してから、結合したsFabを100mMグリシン/HCl (pH3) で溶出させ、1M HEPES緩衝液で直ちに中和した。次に、試料をPBSに対して透析し、His-Multi-Trapプレート (GE) での2回目の精製ステップに、製造者の説明に従って付した。溶出したsFabをPBSに対して透析し、タンパク質含量と純度について、SDS-PAGEで分析した。

【0206】

実施例4: 生化学的第Xa因子活性アッセイにおけるリバーロキサバンの機能的中和

第Xa因子活性をリバーロキサバンによって残存FXa活性が20～30%になるまで阻害し、試験化合物（例えばFabフラグメント）によるこの阻害の中和を分析した。

【0207】

アッセイ緩衝液（50mM HEPES pH7.8、250mM NaCl、6mM CaCl₂、0.01% Brij 35、1mMグルタチオン、4mM EDTA、0.05%ウシ血清アルブミン）における試験化合物の段階希釈を行った（典型的濃度は5μMから0.0007μMまでの範囲）。

【0208】

20μLの希釈試験化合物を384ウェルマイクロタイタープレート（Greiner、ドイツ・フリッケンハウゼン）に入れてから、アッセイ緩衝液中のFXa基質Pefaf fluor Xa（100mM、DMSO中、Loxo、ドイツ・ドッセンハイム）の1：400希釈液（250μM）10μLを加えた。第Xa因子阻害剤リバーロキサバンを含有するアッセイ緩衝液中の第Xa因子（HTI、米国バーモント州エセックスジャンクション）希釈液20μLを加えることによって、酵素反応を開始させた。同時に、リバーロキサバンなしの対照反応も開始させた。

【0209】

32℃でのインキュベーション中に、蛍光マイクロタイタープレートリーダー（例えばTecan Ultra Evolution、Tecan Group Ltd.、スイス・メンネドルフ；励起360nm、蛍光465nm）を使って反応進行曲線をモニターした。

【0210】

対照反応において、反応速度が線形であり、かつ消費される基質が50%未満であるようなFXaの希釈液を選択した（アッセイにおける典型的な最終FXa濃度：0.05nM）。対照反応と比較してFXa活性が70～80%阻害されるようなリバーロキサバンの濃度を選択した（アッセイにおけるリバーロキサバンの典型的な最終濃度：0.6nM）。結果を図1に示す。

【0211】

試験化合物濃度を、50分間のインキュベーション時間後の第Xa因子活性のパーセンテージに対してプロットすることにより、EC₅₀値を決定した。EC₅₀値は、リバーロキサバン誘導性FXa阻害の50%を解消する試験化合物の濃度と定義される。

【0212】

実施例5：表面プラズモン共鳴（Biacore）によるアフィニティの決定

Fabフラグメントの結合アフィニティは、Biacore T100計器（GE Healthcare Biacore, Inc.）での表面プラズモン共鳴分析によって決定した。Fabフラグメントを最終濃度が10μg/mlになるように10mM酢酸ナトリウム（pH4.5）に希釈し、フローセル2、3および4については、それぞれアミンカップリング化学により、3000～5000RUのレベルで、CM5チップ（GE Healthcare Biacore, Inc.）に固定化した。フローセル1は参照として使用した。HEPES-EP緩衝液（GE Healthcare Biacore, Inc.）中の、さまざまな濃度の分析物、それぞれリバーロキサバン、実施例1Gからの化合物、SATI（WO 2008/155032（実施例38）に記載）、アピキサバン（WO 2003/026652（実施例18）に記載）、エドキサバン（WO 2003/000680（実施例192））、US 2005 0020645（実施例192）に記載）、ラザキサバン（WO 1998/057951（実施例34）に記載）（200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.12nM、および1.56nM）を、固定化Fabフラグメント上に、60μl/分の流速で3分間注入し、10分間、解離させた。インライン参照セル補正とその後の緩衝液試料差し引き後に、センソグラムを生成させた。BiaEvaluation Softwareを使ってセンソグラムを一次1：1結合モデルに当てはめることによって得られた会合速度定数と解離速度定数の比に基づいて、解離平衡定数（K_D）を計算した。データ

10

20

30

40

50

を表 6 および表 7 に要約する。

【 0 2 1 3 】

〔表 6〕 パニング／スクリーニングで得られたいくつかの初回 F a b ヒットと最適化変異体 M 1 8 - G 0 8 - G - D K T H T のキャラクタリゼーション： S P R 解析（B i a c o r e）から得られたリバーロキサバンに対する固定化 F a b のアフィニティデータ（ K_D ；単位 nM）およびリバーロキサバン（0.6 nM）の存在下での生化学的 F X a アッセイ（0.05 nM F X a）における F a b の半数効果濃度（ EC_{50} ；単位 μM ）の要約

【表 6】

Fab	K_D (nM)	EC_{50} (μM)
M16-D05	<500	<1
M14-G07	<50	<0.5
M15-B07	<500	<1
M25-E05	<500	<1
M18-A10	<500	<1
M16-A03	<500	<2
M18-G08	<50	<0.5
M18-G08-G-DKTHT	<10	<0.01

〔表 7〕 さまざまな F X a 阻害剤への結合に関する選ばれた F a b のキャラクタリゼーション： S P R 解析（B i a c o r e）から得られたリバーロキサバンに対する固定化 F a b のアフィニティデータ（ K_D ；単位 nM）の要約

【表 7】

Fab	リバーロキサバン	実施例 1G	SATI	アビキサバン	エドキサバン	ラザキサバン
M14-G07	<50	>1000.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
M18-G08	<50	<50	<50	n. b.	n. b.	n. b.
M18-G08-G-DKTHT	<10	n. t.	<10	n. b.	n. b.	n. b.

n. b. : 結合なし

n. t. : 未検

【 0 2 1 4 】

実施例 6：等温滴定熱量測定（ITC）によるアフィニティの決定

熱力学的パラメータを決定するために、制御および解析ソフトウェアを備えた V P - I T C 等温滴定熱量計（M i c r o c a l / G E H e a l t h c a r e、ドイツ・フライブルク）を応用した。ここでは、等温滴定熱量測定を使って、溶解状態でのリバーロキサバンへの試験化合物（例えば F a b フラグメント）結合の会合定数のオーダーを決定した。

【 0 2 1 5 】

DMSO 中のリバーロキサバンの 10 mM 溶液（Bayer Healthcare、ドイツ・ウッパタール）を PBS 緩衝液（pH 7.4、Sigma、ドイツ・タウフキルヒェン）で 1：2000 に希釈した。その溶液を脱気し、試料セル（1.4 mL）に充填した。参照セルは水で満たした。PBS 緩衝液に試験試料の 50 μM 溶液を調製した。試験化合物溶液の DMSO 濃度を試料セル中の DMSO 濃度に調節した。脱気後に、試験

化合物溶液を、計器のシリンジに吸い込んだ。

【0216】

一定の温度（25℃）で、継続的に攪拌しながら、計器の制御ソフトウェアを利用して、試験化合物溶液を試料セルに注入した（リファレンスパワー：5 μ cal／秒、各10 μ Lの12回注入、各注入の持続時間20秒、各注入間の待ち時間300秒）。結合反応中に放出された熱を経時的にモニターし、解析ソフトウェアを使ってデータを解析した。M18-G08-G-DKTHHの場合、リバーロキサバンに対する K_D は滴定曲線から<1 nMと見積もられた。

【0217】

実施例7：ダルベッコPBSにおけるリバーロキサバンに対するFab M18-G08-G-DKTHHの K_D 値の決定

M18-G08-G-DKTHHの存在下でのリバーロキサバンの未結合濃度の決定は、溶解状態でのリバーロキサバンへのFabの K_D 値の決定を可能にする。ローゼンタールスキャッチャードプロットを使って K_D 値を計算した（図2）。

【0218】

リバーロキサバンを、0.214 μ M～0.583 μ Mの濃度で、0.5 μ M Fab M18-G08-G-DKTHHと共に、ダルベッコPBS（DPBS）緩衝液中、室温で20分間インキュベートした。次に、その溶液を、30000 Daの排除サイズを有するメンブレンを含んでいる限外濾過デバイスに加えた。試料を100 gで3分間遠心分離した。50 μ Lの限外ろ過液および出発溶液に、内部標準を含有する酢酸アンモニウム／アセトニトリル（1／1 v／v）pH 3.0の溶液150 μ Lをスパイクした。API 4000（AB Sciex）を使ったLC-MS／MSによって試料を分析した。fu（＝未結合率（fraction unbound））値は、関係式fu（％）＝濾液濃度／（出発液濃度×100）に従って計算し、以前に記述されているように（Schuhmacher J.ら、J Pharm Sci. 2004；93（4）：816-30）、限外濾過デバイスへの非特異的結合について補正した。ローゼンタールスキャッチャードプロットの傾きから、 K_D 値は約0.5 nMと計算された（図2）。

【0219】

実施例8：Fab解毒剤によるトロンビン生成アッセイにおけるリバーロキサバンまたはSATIの効果の解消

Hemkerによるトロンビン生成アッセイは、化合物が凝固カスケードの動態に及ぼす効果を調べることを可能にする。組織因子およびCa²⁺をヒト乏血小板血漿に加えて外因性経路を開始させ、生成したトロンビンの活性を、特異的蛍光標識基質（Bachem、I-1140（Z-Gly-Gly-Arg-AMC））を使って決定する。反応は、20 nM Hepes、60 mg／ml BSA、102 mM CaCl₂、pH 7.5中、37℃で行った。反応を開始させるための試薬とトロンビンキャリブレーションは、Thrombinoscopeから市販されている。測定は、390／460 nmフィルターセットとディスペンサとを装着したThermo Electron蛍光計（Fluoroskan Ascent）において行う。全ての実験ステップを、製造者の説明（Thrombinoscope）に従って行う。阻害剤（リバーロキサバンまたはSATI、0.1 μ M）および解毒剤（存在する場合）を、血漿と共に37℃で5分間プレインキュベートしてから、トロンビン生成を開始させた。M18-G08-G-DKTHHは、リバーロキサバンおよびSATIの効果を、それぞれ図3および図4に示すように、濃度依存的に中和する。図5は、Fab M18-G08-G-DKTHHそのものの濃度を増加させてもトロンボグラムが変化しないことを実証し、このFabが凝固に対して固有の影響を持たないことを強調している。

【0220】

実施例9：血漿中でのFXa活性アッセイにおけるリバーロキサバンの効果の解消

リバーロキサバンによる血漿中のFXa活性の阻害およびその阻害効果の解消を調べるために、クエン酸加ヒト血漿（Octapharm）を、ヒルジンで希釈したリバーロキ

10

20

30

40

50

サバンと共にインキュベートし、37℃で3分間インキュベートする。次に、Fabを加え、37℃で5分間のインキュベーション後に、0.1mMカルシウムを含有する緩衝液中のラッセルクサリヘビ毒（RVV-X、Pentapharma、最終濃度5mU/ml）を添加することによって、FX活性化を開始する。特異的な蛍光原性標識基質（Bachem、I-1100、濃度50μM）の切断を測定することによってFXa活性を決定し、蛍光は、SpectraFlourplusリーダー（Tecan）を使って360/465nmで連続的にモニターした。

【0221】

図6に、血漿中のFXa活性に対するリバーロキサバンの効果と、一連の濃度のFab M018-G08-G-DKTHHTによるその阻害効果の解消を示す。

10

【0222】

実施例10：インビトロでのプロトロンビン時間（PT）に対するリバーロキサバンの効果の解消

クエン酸加血液（0.11Mクエン酸Na/血液、1:9 v/v）をヒト献血者から静脈穿刺によって得るか、麻酔下のウィスターラット（Charles River）から大動脈カニューレ挿入によって得て、乏血小板血漿を分離するためにそれを4000gで15分間遠心分離した。血漿試料をリバーロキサバン（図7および図8に示すとおり）の濃度、DMSOに溶解、最終DMSO濃度1%）と混合し、室温で10分間インキュベートした。その血漿-リバーロキサバン混合物に解毒剤を加え、室温でさらに10分間インキュベートした。このPTアッセイは、組織因子源としてリコンビナースチン（Instrumentation Laboratory）を使用して、AMAX 200自動凝固計（Trinity Biotech）で、製造者の説明に従って行った。最終アッセイ体積の組成は血漿が1/3、PT試薬が2/3である。各リバーロキサバン濃度がもたらすPT延長の最大半量正常化に必要な解毒剤濃度に関して、IC50値を計算した。データは5回の実験からの平均±semとして記載し、最終アッセイ濃度を表す（表8ならびに図7および図8）。

20

【0223】

〔表8〕インビトロでのプロトロンビン時間（PT）に対するM18-G08-G-DKTHHTの効果

【表8】

30

血漿の種	リバーロキサバン 濃度 (μM)	リバーロキサバン によるPT延長 (×対照)	IC ₅₀ M18-G08-G-DKTHHT (μM)
ヒト	0.17	1.8	0.07±0.01
	0.33	2.2	0.09±0.02
ラット	0.4	1.9	0.14±0.03
	0.8	2.6	0.34±0.17

40

【0224】

実施例11．抗体変異体のクローニング、発現および発現レベルの定量

2つのリバーロキサバン結合性Fab M14-G07およびM18-G08（どちらも重鎖のC末端にc-mycタグとヘキサヒスチジンタグを有するもの）の重鎖および軽鎖を、pET28a細菌発現ベクター（Novagen/Merck Chemicals Ltd.、英国ノッティンガム）にサブクローニングし、Top10F'細胞（Invitrogen GmbH、ドイツ・カールスルーエ）に形質転換した。標準的なオリゴベースの部位特異的変異誘発法によって変異を導入し、DNA配列決定によって変異を確認した。

【0225】

50

Fab抗体発現のために、変異体プラスミドをT7 Express lysY/Iq大腸菌株(New England Biolabs、C3013)に形質転換し、カナマイシン(30 µg/ml)を含むLB培地中の終夜培養物に接種し、37℃で18時間インキュベートした。カナマイシン(30 µg/ml)を含む新鮮なLB培地に5%の終夜培養物を移すことによって発現培養物を作った。6時間後に、Fab発現を誘導するために1mMイソプロピルーb-D-1-チオガラクトピラノシド(Roth、2316.5)を加え、培養物を30℃でさらに18時間インキュベートした。

【0226】

発現レベルの定量にはELISAアプローチを使用した。簡単に述べると、MTPプレート(Nunc Maxisorpブラック、460518)を、コーティング緩衝液(Candor Bioscience GmbH、121500)に希釈したFab特異的抗体(Sigma、I5260)と共に、4℃で終夜インキュベートし、PBST(リン酸緩衝食塩水:137mM NaCl Merck 1.06404.5000; 2.7mM KCl Merck 1.04936.1000; 10mM Na₂HPO₄ Merck 1.06586.2500、1.8mM KH₂PO₄ Merck 1.04871.5000; 0.05% Tween 20 Acros Organics、233360010を含有するもの)で3回洗浄し、100% Smart Block(Candor Bioscience GmbH、113500)を使って室温で1時間ブロッキングし、再び洗浄した。培養物をPBST中の10% Smart Blockに希釈し、MTPプレートに室温で1時間結合させた。PBSTで洗浄した後、捕捉されたFabをHRP(セイヨウワサビエルオキシダーゼ)結合抗c-myc抗体(Bethyl Laboratories Inc.、A190-105P)と共にインキュベートし、洗浄し、10 µM Amplex Red基質(Invitrogen、A12222)と共に、暗所、室温で、10~30分間インキュベートしてから、蛍光測定を行った。測定された定量シグナルを、精製Fab対照の希釈系列によって決定されたダイナミックレンジに従ってフィルタリングした。

【0227】

実施例12. ELISAベースのアッセイを使った抗体変異体の活性の決定

実施例1Kからの化合物に対する変異型抗体変異体の活性を決定するために、平衡または解離制限(equilibrium or dissociation limited) ELISAアッセイフォーマットを使用した。簡単に述べると、MTPプレート(Nunc Maxisorpブラック、460518)を、コーティング緩衝液(Candor Bioscience GmbH、121500)に希釈した4 µg/mlストレプトアビジン(Calbiochem、189730)でコーティングし、4℃で終夜インキュベートした。PBSTで洗浄した後、プレートを、PBST中、100% Smart Block(Candor Bioscience GmbH、113500)を使って、室温で1時間ブロッキングし、洗浄ステップを繰り返した。プレートを、さまざまな濃度(0.3~200 nM)の実施例1Kからの化合物と共に、37℃で1時間インキュベートし、PBSTで洗浄し、25 µlの粗細菌培養物を室温で1時間加えることによって抗体フラグメントを固定化した。PBSTで洗浄した後、競合ステップまたは直接検出を行った。競合の場合、PBST中の10% Smart Blockに希釈した300 nMのリバーロキサバンを加え、室温で1.5~3時間インキュベートした。まだ結合しているFabを検出するために、PBST中の10% Smart Blockに希釈したHRP結合抗ラムダ抗体(Sigma、A5175)を、室温で1時間加えた。洗浄後に、10 µM Amplex Red(Invitrogen、A12222)を加え、室温で10~30分間インキュベートした後、蛍光シグナルの測定を行った。

【0228】

実施例13. FXa脱阻害アッセイ(FXa DIA)における変異体の成績の解析

無修飾リバーロキサバンに対する野生型(wt)および変異型Fab変異体の活性を決定するために、FXa活性の脱阻害アッセイを行った。簡単に述べると、10 µlの粗細

菌培養物を1 μ lの200 nMリバーロキサバンおよび2 μ lのFXa基質 (Fluop hen、Hyphen BioMed、329011) と共に、黒色低容積プレート (Greiner、784076) 中、室温で1時間インキュベートした。次に、アッセイ緩衝液 (20 mM Tris、Merck 1.08382.2500; 100 mM NaCl、Merck 1.06404.5000; 2.5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、Merck 1.02382.1000; 0.1% ウシ血清アルブミン、Sigma A4503; 0.1% PEG8000、Sigma P2139) に希釈した28 nM FXa (Haematologic Technologies Inc.、HCXA-0060) 7 μ lを加え、マイクロプレートリーダー、例えばTecan Infinite F500を使って、440 nmで蛍光シグナルを測定することにより、酵素活性を経時的に記録した。蛍光シグナルを経時的に積分し、野生型に対する変異体の比を比較した。

10

【0229】

実施例14. 単一および多重アミノ酸置換

表9に記載するのは、M14-G07 (wt) の重鎖および／または軽鎖に導入された単一および／または二重アミノ酸置換のいくつかの例である。変異体の成績は、競合ステップなしのELISAおよびFXa脱阻害アッセイ (FXa DIA) で、四つ一組にして分析した。ELISAでは、平均を計算し、各々の平均発現レベルに対して標準化した。2～3回の独立した実験から得られる変異体対wt比を比較することによって、変異体の総合的成績を評価した。wt + 2 $\times$ SD (比の標準偏差) を上回る平均比を有する変異体は改良されたとみなして「++」の印を付け、一方、wt - 2 $\times$ SD未満の比を有する変異体は結合アフィニティが低減したとみなして「-」の印を付ける。成績が両方の閾の間にある全ての変異体に「+/-」の印を付ける。陰性対照 (非発現細胞) + 3 $\times$ SDを下回る平均蛍光カウントを有する変異体は非結合性とはみなして「--」の印を付けたが、この基準を満たす変異体は一つもなかった。FXa脱阻害アッセイでは、平均を計算し、2～3回の独立した実験から得られる変異体対wt比を比較することによって、変異体の総合的成績を評価した。wt + 2 $\times$ SDを上回る平均比を有する変異体は改良されたとみなして「++」の印を付け、一方、wt - 2 $\times$ SD未満の比を有する変異体は結合アフィニティが低減しているか非結合性であるとみなして「--」の印を付ける。成績が両方の閾の間にある全ての変異体に「+/-」の印を付ける。分析しなかった変異体には「nd」 (未決定) の印を付ける。CDRはKabattに従って定義した。

20

30

【0230】

[表9] M14-G07内の単一および二重アミノ酸置換の分析

【表 9 - 1】

可変ドメイン位置	M14-G07変異	ELISA	FXa DIA
FR1	HC_T28K	+/-	+/-
FR1	HC_T28R	+/-	+/-
FR1	HC_G30S	+/-	Nd
CDR H1	HC_D31A	+/-	+/-
CDR H1	HC_D31R	+/-	+/-
CDR H1	HC_D31S	+/-	Nd
CDR H1	HC_A33G	+/-	+/-
CDR H1	HC_S35A	++	+/-
CDR H1	HC_S35G	+/-	+/-
FR2	HC_S49G	+/-	+/-
CDR H2	HC_G50A	-	Nd
CDR H2	HC_G53R	++	+/-
CDR H2	HC_S57I	+/-	+/-
CDR H2	HC_S57K	+/-	+/-
CDR H2	HC_S57M	+/-	+/-
CDR H2	HC_S57R	+/-	+/-
CDR H2	HC_T58R	+/-	+/-
FR3	HC_A97Q	-	--
FR3	HC_R98K	-	Nd
CDR H3	HC_E99Q	+/-	+/-

10

20

30

【表 9 - 2】

CDR H3	HC_G100A	+/-	+/-
CDR H3	HC_G100S	+/-	++
CDR H3	HC_G100V	-	+/-
CDR H3	HC_E101G	-	+/-
CDR H3	HC_E101R	+/-	+/-
CDR H3	HC_E101S	+/-	+/-
CDR H3	HC_T102D	+/-	+/-
CDR H3	HC_T102F	+/-	+/-
CDR H3	HC_T102L	+/-	+/-
CDR H3	HC_T102R	+/-	+/-
CDR H3	HC_G105Y	+/-	Nd
CDR H3	HC_L106F	-	Nd
CDR H3	HC_V108A	+/-	+/-
CDR H3	HC_V108C	+/-	+/-
CDR H3	HC_V108W	-	+/-
CDR H3	HC_V108Y	+/-	Nd
FR4	HC_T118S	+/-	Nd

10

20

【表 9 - 3】

FR1	LC_Q1E	-	Nd
CDR L1	LC_S23K	+/-	++
CDR L1	LC_S23T	+/-	+/-
CDR L1	LC_S25N	+/-	+/-
CDR L1	LC_S25V	+/-	+/-
CDR L1	LC_S26A	+/-	+/-
CDR L1	LC_S27A	+/-	+/-
CDR L1	LC_S27R	+/-	+/-
CDR L1	LC_N28S	+/-	++
CDR L1	LC_S31A	+/-	++
CDR L1	LC_N32F	+/-	+/-
CDR L1	LC_N32G	+/-	+/-
CDR L1	LC_N32Y	++	++
CDR L1	LC_Y33L	+/-	+/-
CDR L1	LC_V34G	-	+/-
CDR L1	LC_V34S	+/-	+/-

30

40

【表 9 - 4】

FR2	LC_L48V	+/-	+/-
FR2	LC_Y50V	+/-	+/-
CDR L2	LC_D51R	-	Nd
CDR L2	LC_N53A	-	+/-
CDR L2	LC_N53P	+/-	++
CDR L2	LC_N53R	++	+/-
CDR L2	LC_N53S	+/-	++
CDR L2	LC_N53V	+/-	+/-
CDR L2	LC_D54Q	+/-	Nd
CDR L2	LC_R55L	+/-	+/-
CDR L2	LC_P56S	+/-	+/-
CDR L2	LC_S57W	++	+/-
FR3	LC_G58E	++	+/-
CDR L3	LC_V90A	-	Nd
CDR L3	LC_V90N	+/-	+/-
CDR L3	LC_D93E	+/-	++
CDR L3	LC_D94C	++	+/-

10

20

【表 9 - 5】

CDR L3	LC_D94V	+/-	+/-
CDR L3	LC_D94W	++	+/-
CDR L3	LC_S95V	+/-	+/-
CDR L3	LC_L96G	+/-	+/-
CDR L3	LC_L96W	++	+/-
CDR L3	LC_L96Y	+/-	+/-
CDR L3	LC_N97S	+/-	Nd
CDR L3	LC_G98L	-	+/-
CDR L3	LC_G98T	-	Nd
CDR L3	LC_H99K	-	+/-
CDR L3	LC_H99P	-	Nd
CDR L3	LC_H99T	+/-	+/-
CDR L3	LC_W100V	-	Nd
CDR L3	LC_V101F	+/-	+/-
CDR L3	LC_V101P	+/-	+/-
CDR L3	LC_V101W	+/-	++

30

40

【表 9 - 6】

HC_FR1_LC_CDR L1	HC_A23T_LC_N32W	+/-	+/-
HC_FR3_HC_CDR H3	HC_A92S_HC_T102C	-	+/-
HC_FR1_LC_CDR L3	HC_G10S_LC_G98A	-	+/-
HC_FR1_LC_CDR L2	HC_L11M_LC_S57Y	+/-	++
HC_FR1_LC_CDR L1	HC_L5M_LC_S26L	-	+/-
HC_CDR H2_HC_CDR H2	HC_S57T_HC_T58V	+/-	+/-
LC_CDR L1_LC_CDR L1	LC_S25G_LC_N32Y	++	+/-

10

【0 2 3 1】

表 1 0 に記載されているのは、M 1 4 - G 0 7 抗体内での複合的アミノ酸置換の例である。全ての組み合わせが表 1 0 に記載されているわけではないが、抗リバーロキサパン抗体は記載した修飾の任意の組合せを含みうると考えられる。変異体の成績は、競合ステップなしの E L I S A で、四つ一組にして解析した。平均を計算し、コーティングに使用した実施例 1 K からの化合物の濃度が 1 0 n M 未満である場合には、実施例 1 K からの化合物を含まないストレプトアビジンコートプレートで決定された平均バックグラウンドシグナルを差し引き、シグナルを各々の平均発現レベルに対して標準化した。変異体の総合的成績は、w t と比較して 2 倍改良された参照変異体を使って、2 ～ 3 回の独立した実験から得られる変異体対参照比を比較することによって評価した。参照 + 2 × S D を上回る平均比を有する変異体に「+++」の印を付し、一方、参照 - 2 × S D 未満の比を有する変異体には「+/-」の印を付ける。成績が両方の閾の間にある全ての変異体に「++」の印を付ける。0 . 5 未満の比を有する変異体には「-」の印を付けるが、この基準を満たす変異体は一つもなかった。C D R は K a b a t に従って定義した。

20

【0 2 3 2】

[表 1 0] M 1 4 - G 0 7 内の多重アミノ酸置換の例

【表 10 - 1】

M14-G07-X ; X =	HC									LC											ELISA	
	FR1	FR1	CDR H1	FR2		CDR H3			FR4	CDR L1					FR2	CDR L2			CDR L3			
	T28	G30	D31	V37	S49	E99	E101	G105	T118	S23	S26	S27	S31	N32	Q38	N53	D54	D94	L96	N97		H99
1	R	S	S		G	Q	R	Y	S			R		F			Q		W	S	T	+++
2		S	S		G	Q	R	Y	S	C		R		Y			Q		W	S	T	+++
3		S	S			Q	R	Y	S			R		Y		R	Q		W	S	T	+++
4	R	S	S		G	Q	R	Y	S			R	A	Y		R	Q		Y	S	T	+++
5	R	S	S			Q	R	Y	S			R		Y		R	Q		Y	S	T	+++
6	R	S	S	I	G	Q	R	Y	S			R		Y		R	Q		Y	S	T	+++
7	R	S	S		G	Q	R	Y	S			R		Y			Q		W	S		+++
8		S	S		G	Q	R	Y	S			R	A	F		R	Q		Y	S	T	+++
9	R	S	S		G	Q	R	Y	S			R		F			Q	V		S		+++
10		S	S		G	Q	R	Y	S			R		F			Q		W	S		+++
11	R	S	S		G	Q	R	Y	S			R	A	F		R	Q		W	S		+++
12		S	S			Q	R	Y	S			R		Y			Q		W	S	T	+++
13		S	S		G	Q	R	Y	S			R		F		R	Q		W	S	T	+++
14		S	S		G	Q	R	Y	S			R		Y		R	Q		Y	S	T	+++
15		S	S		G	Q	R	Y	S					Y			Q		W	S		+++
16	R	S	S		G	Q	R	Y	S			R		F		R	Q		Y	S	T	+++
17		S	S		G	Q	R	Y	S			R	A	F		R	Q		W	S	T	+++

10

20

30

【表 10 - 2】

18	R	S	S		G	Q	R	Y	S			R		Y			Q		W	S	T	+++
19		S	S			Q	R	Y	S			R		F		R	Q			S		+++
20	R	S	S		G	Q	R	Y	S				A	Y			Q			S	T	+++
21	R	S	S		G	Q		Y	S					Y	H		Q		W	S	T	+++
22		S	S		G	Q	R	Y	S				A	Y			Q		W	S	T	+++
23	R	S	S		G	Q	R	Y	S			R	A	F			Q			S	T	+++
24		S	S			Q	R	Y	S			R		Y			Q			S	T	+++
25	R	S	S		G	Q	R	Y	S				A	Y			Q		Y	S	T	+++
26		S	S		G	Q	K	Y	S					F			Q		Y	S	T	+++
27		S	S		G	Q	R	Y	S				A	Y			Q		Y	S		+++
28		S	S		G	Q	R	Y	S					Y			Q		Y	S		+++
29	R	S	S			Q	R	Y	S				A	Y			Q	W	W	S	T	+++
30		S	S			Q	R	Y	S			R		F			Q			S		+++
31		S	S		G	Q	R	Y	S				A	F			Q	W		S	T	+++
32	R	S	S		G	Q	R	Y	S				A	Y		R	Q			S		+++
33	R	S	S		G	Q	R	Y	S			R	A	F			Q	W	Y	S		+++
34	R	S	S		G	Q	R	Y	S		T			Y		R	Q			S	T	+++
35		S	S					Y	S								Q			S		++*
36		S	S					Y	S					Y			Q			S		+++
37		S	S					Y	S					Y			Q		W	S		+++
38																	Q			S		+/-
39		S	S					Y	S													++
40			S					Y	S								Q			S		+/-

*参照物質

【0233】

表 11 に記載するのは、M18-G08 (wt) の重鎖および／または軽鎖に導入された単一および／または二重アミノ酸置換のいくつかの例である。変異体の成績は、競合ステップありの ELISA および FXa 脱阻害アッセイ (FXa DIA) で、四つ一組にして分析した。ELISA では、平均を計算し、1～3 回の独立した実験から得られる変異体対 wt 比を比較することによって、変異体の総合的成績を評価した。wt + 2 × SD (比の標準偏差) を上回る平均比を有する変異体は改良されたとみなして「++」の印を付け、一方、wt - 2 × SD 未満の比を有する変異体は結合アフィニティが低減したとみなして「-」の印を付ける。成績が両方の閾の間にある全ての変異体に「+/-」の印を付ける。陰性対照 (非発現細胞) + 3 × SD を下回る平均蛍光カウントを有する変異体は非結合性として「--」の印を付けた。FXa 脱阻害アッセイでは、平均を計算し、2～3 回の独立した実験から得られる変異体 / wt 比を比較することによって、変異体の総合的成績を評価した。wt + 2 × SD を上回る平均比を有する変異体は改良されたとみなして「++」の印を付け、一方、wt - 2 × SD 未満の比を有する変異体は結合アフィニティが低減しているか非結合性であるとみなして「--」の印を付ける。成績が両方の閾の間にある全ての変異体に「+/-」の印を付ける。分析しなかった変異体には「nd」(未決定) の印を付ける。CDR は K a b a t に従って定義した。

【0234】

[表 11] M18-G08 内の単一および二重アミノ酸置換の分析

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 1】

可変ドメイン位置	M18-G08変異	ELISA	FXa-DIA
FR1	HC_G9S	++	++
FR1	HC_G26A	+/-	+/-
FR1	HC_T28D	+/-	+/-
FR1	HC_S30E	+/-	+/-
FR1	HC_S30G	+/-	+/-
FR1	HC_S30N	+/-	+/-
FR1	HC_S30P	+/-	+/-
CDR H1	HC_N31D	+/-	+/-
CDR H1	HC_N31H	+/-	+/-
CDR H1	HC_N31S	+/-	nd
CDR H1	HC_A32E	+/-	+/-
CDR H1	HC_A32F	+/-	+/-

10

20

【表 1 1 - 2】

CDR H1	HC_A32H	+/-	++
CDR H1	HC_A32S	+/-	+/-
CDR H1	HC_A32Y	++	++
CDR H1	HC_M34I	-	Nd
CDR H1	HC_S35A	+/-	+/-
CDR H1	HC_S35N	-	Nd
FR2	HC_S49A	+/-	+/-
FR2	HC_S49G	+/-	+/-
CDR H2	HC_I51V	+/-	+/-
CDR H2	HC_S52D	+/-	+/-
CDR H2	HC_S52G	+/-	+/-
CDR H2	HC_S53I	+/-	+/-
CDR H2	HC_S53T	+/-	+/-

30

40

【表 1 1 - 3】

CDR H2	HC_S54D	+/-	+/-
CDR H2	HC_S54E	++	+/-
CDR H2	HC_S55D	+/-	+/-
CDR H2	HC_G56S	+/-	Nd
CDR H2	HC_I58A	+/-	+/-
CDR H2	HC_I58R	+/-	++
CDR H2	HC_I58S	+/-	+/-
CDR H2	HC_I58T	+/-	+/-
CDR H2	HC_Y59F	+/-	+/-
CDR H2	HC_L64V	+/-	Nd
FR3	HC_A97M	-	+/-
FR3	HC_R98M	+/-	+/-
FR3	HC_R98S	-	++
FR3	HC_R98V	+/-	+/-
CDR H3	HC_W100E	+/-	+/-
CDR H3	HC_W100M	+/-	+/-
CDR H3	HC_R101E	+/-	+/-

10

20

【表 1 1 - 4】

CDR H3	HC_N102D	-	Nd
CDR H3	HC_H103A	++	++
CDR H3	HC_H103C	+/-	+/-
CDR H3	HC_H103N	+/-	++
CDR H3	HC_H103S	++	++
CDR H3	HC_H103T	++	+/-
CDR H3	HC_H103Y	+/-	+/-
CDR H3	HC_L104F	-	Nd
CDR H3	HC_D105K	+/-	+/-
CDR H3	HC_D105S	+/-	+/-
CDR H3	HC_Y106D	+/-	+/-
CDR H3	HC_Y106V	+/-	++
FR4	HC_W107I	+/-	+/-
FR4	HC_W107V	+/-	+/-
FR4	HC_T116S	+/-	Nd
FR1	LC_Q1E	+/-	Nd

30

40

【表 1 1 - 5】

FR1	LC_Q6H	+/-	+/-
CDR L1	LC_S23C	-	+/-
CDR L1	LC_G24L	-	+/-
CDR L1	LC_S25G	+/-	+/-
CDR L1	LC_S26G	+/-	+/-
CDR L1	LC_S26K	+/-	+/-
CDR L1	LC_S26R	+/-	+/-
CDR L1	LC_S26V	-	+/-
CDR L1	LC_D28N	+/-	Nd
CDR L1	LC_S31W	+/-	+/-
CDR L1	LC_T33F	+/-	+/-
CDR L1	LC_T33K	++	++
FR2	LC_Q38K	+/-	+/-
FR2	LC_L47I	+/-	+/-
FR2	LC_L47K	+/-	++
FR2	LC_L47S	+/-	+/-
FR2	LC_L47V	+/-	+/-

10

20

【表 1 1 - 6】

FR2	LC_I49G	+/-	+/-
FR2	LC_I49L	+/-	+/-
FR2	LC_Y50W	+/-	+/-
CDR L2	LC_D51S	+/-	++
CDR L2	LC_Q54V	+/-	+/-
CDR L2	LC_R55A	+/-	+/-
CDR L2	LC_R55G	+/-	++
CDR L2	LC_P56K	+/-	+/-
CDR L2	LC_P56R	+/-	+/-
CDR L2	LC_S57R	+/-	+/-
FR3	LC_V59F	+/-	+/-
FR3	LC_S77T	+/-	Nd
FR3	LC_R80Q	+/-	Nd
FR3	LC_S81A	+/-	Nd
CDR L3	LC_Q90E	-	+/-
CDR L3	LC_Q90V	-	+/-

30

40

【表 1 1 - 7】

CDR L3	LC_Q90W	-	+/-
CDR L3	LC_S91N	-	+/-
CDR L3	LC_D93S	+/-	+/-
CDR L3	LC_S95C	-	+/-
CDR L3	LC_S95E	+/-	+/-
CDR L3	LC_S95T	+/-	+/-
CDR L3	LC_L96G	+/-	+/-
CDR L3	LC_S97G	+/-	+/-
CDR L3	LC_S97V	+/-	+/-
CDR L3	LC_G98E	+/-	+/-
CDR L3	LC_W99V	-	Nd
HC_FR1_LC_CDR L1	HC_G9V_LC_D51S	+/-	++
HC_FR1_LC_CDR L1	HC_G10C_LC_Q54R	++	++
HC_FR1_HC_CDR H2	HC_L11M_HC_S54D	++	+/-
HC_FR1_HC_CDR H2	HC_Q13K_HC_S53V	+/-	+/-
HC_FR1_LC_CDR L1	HC_S21T_LC_S25A	+/-	+/-
HC_FR2_LC_CDR L3	HC_A40T_LC_L96S	+/-	+/-
HC_CDR H2_LC_FR4	HC_S53T_HC_L112P	+/-	+/-
HC_CDR H2_LC_FR1	HC_Q54W_LC_R17H	+/-	+/-

10

20

【0 2 3 5】

表 1 2 に記載されているのは、M 1 8 - G 0 8 抗体内での複合的アミノ酸置換のいくつかの例である。全ての組み合わせが表 1 2 に記載されているわけではないが、M 1 8 - G 0 8 抗リバーロキサバン抗体は記載した修飾の任意の組合せを含みうると考えられる。変異体の成績は、競合ステップありの E L I S A で、四つ一組にして解析した。平均を計算し、コーティングに使用した実施例 1 K からの化合物の濃度が 1 0 n M 未満である場合には、実施例 1 K からの化合物を含まないストレプトアビジンコートプレートで決定された平均バックグラウンドシグナルを差し引き、シグナルを各々の平均発現レベルに対して標準化した。変異体の総合的成績は、w t と比較して 1 0 倍改良された参照変異体を使って、2 ~ 3 回の独立した実験から得られる変異体対参照比を比較することによって評価した。さらなる印が何もない変異体には、参照 1 (「*」の印を付ける) を使用し、# の印を付けた変異体には、参照 2 (「**」の印を付ける) を使用した。参照 + 2 × S D を上回る平均比を有する変異体には「+++」の印を付け、一方、各参照の < 0 . 1 の比を有する変異体には「+/-」の印を付けるが、この基準を満たす変異体は一つもなかった。成績が両方の閾の間にある全ての変異体に「++」の印を付ける。C D R は K a b a t に従って定義した。

30

40

【0 2 3 6】

[表 1 2] M 1 8 - G 0 8 内の多重アミノ酸置換の例

【表 1 2 - 1】

M18-G08-X ; X=	HC											LC														ELISA	
	FR1		CDR H1		CDR H2				CDR H3		FR4	FR1	CDR L1		FR2			CDR L2		FR3			CDR L3				
	G8	P14	N31	A32	S53	G56	S63	L64	H103	D105	T116	A10	D28	T33	A44	L47	Y50	D51	R55	S57	G58	S77	R80	S81	D93		S97
1			D	Y	T	S		V	Y		S		N	K		S	W	S				T	Q	A			+++
2			D	Y	T	S		V	Y		S		N	K		V	W	S				T	Q	A		V	+++
3			D	Y		S		V	Y	S	S		N	K		V	W	S				T	Q	A			+++
4			D	Y	T	S		V	Y	S	S		N	K		V	W	S				T	Q	A			+++
5			D	Y		S		V	Y	S	S		N	K		S		S				T	Q	A	S		+++
6			D	Y	T	S		V	Y	S	S		N	K		S		S				T	Q	A	S	V	+++
7			D	Y		S		V	Y	S	S		N	K		S	W	S				T	Q	A		V	+++
8			D	Y	T	S		V	Y	S	S		N	K		S	W	S				T	Q	A	S		+++
9			D	Y	T	S		V			S		N	K	S	I	W	S				T	Q	A	S	V	+++
10			D	S	T	S		V	S		S		N	K			W	S				T	Q	A		V	+++
11			D	S	T	S		V	S		S		N	K			W	S				T	Q	A			+++
12			D	Y	T	S		V	Y	S	S		N			V	W	S				T	Q	A	S		+++
13			D	Y		S		V	Y	S	S		N			S		S				T	Q	A	S		+++
14			D	Y		S		V	Y	S	S		N	K		V	W	S	H			T	Q	A		V	+++
15	S		D	Y		S		V	S	S	S		N			S		S				T	Q	A	S		++
16			D	Y	T	S	G	V	Y	S	S		N	K		I	W	S				T	Q	A			+++
17			D	Y		S		V	Y	S	S		N	K		V		S				T	Q	A	S	V	+++
18			D	Y	T	S		V	Y	S	S		N	K		V		S				T	Q	A		V	+++
19			D	Y		S		V	Y	S	S		N	K		S	W	S		N		T	Q	A			+++

10

20

30

【表 1 2 - 2】

20		D	Y		S		V	Y		S		N	K		I	W	S				T	Q	A	S	V	++
21		D	Y	T	S		V	Y	S	S		N	K		S		S				T	Q	A	S		+++
22		D	Y	T	S		V	Y		S		N			S	W	S				T	Q	A	S		+++
23		D	Y	T	S		V	Y		S		N			S	W	S				T	Q	A	S		+++
24		D	Y		S		V	Y	S	S		N	K		S		S				T	Q	A		V	+++
25		D	Y	T	S		V	Y	S	S		N	K		I	W	S				T	Q	A	S		+++
26		D	Y		S		V	Y	S	S		N	K		V	W	S				T	Q	A	S	V	+++
27		D	Y	T	S		V	Y		S		N	K		S	W	S				T	Q	A	S	V	+++
28		D	Y		S		V	Y	S	S	T	N			V		S				T	Q	A	S		+++
29		D	Y	T	S		V	A		S		N	K				S				T	Q	A	S		+++
30		D	S	T	S		V	A		S		N				W	S				T	Q	A	S	V	++
31		D	Y		S		V	Y	S	S		N	K		I	W	S				T	Q	A	S	V	+++
32		D	Y	T	S		V	Y	S	S		N	K		V	W	S		S		T	Q	A	S		+++
33	T	D	Y	T	S		V		S	S		N	K		V	W	S				T	Q	A	S	V	+++
34		D	Y	T	S		V	Y	S	S		N	K		S	W	S				T	Q	A		V	+++
35		D	Y	T	S		V	Y	S	S		N			I	W	S				T	Q	A	S		+++
36		D	S	T	S		V	Y		S		N	K		S	W	S				T	Q	A	S		++
37		D	Y	T	S		V	Y	S	S		N	K		V		S		N		T	Q	A	S		+++
38		D	Y	T	S		V	Y	S	S		N	K		I	W	S				T	Q	A			+++
39		D	H	T	S		V	Y	S	S		N	K		V	W	S				T	Q	A		V	+++
40		D	Y		S		V	Y	S	S		N	K		S	W	S				T	Q	A	S	V	+++
41		D	Y	T	S		V	A	S	S		N				W	S				T	Q	A			+++
42		D	Y	T	S		V	Y	S	S		N			S		S				T	Q	A	S	V	+++
43		D	Y		S		V	Y		S		N			V	W	S				T	Q	A	S	V	+++
44		D	Y	T	S		V	A	S	S		N			I	W	S				T	Q	A	S	V	+++
45		D	Y	T	S		V	Y	S	S		N	K		S		S				T	Q	A			+++
46		D	Y	T	S		V	S	S	S		N	K		S		S				T	Q	A	S	V	+++
47		D	Y	T	S		V	Y	S	S		N	K		I	W	S				T	Q	A	S	V	+++

10

20

30

【表 1 2 - 3】

48			D	Y	T	S		V	Y		S		N	K		V		S					T	Q	A	S	V	+++
49			D	Y	T	S		V	Y	S	S		N	K		S	W	S					T	Q	A			+++
50			D	Y	T	S		V	Y		S		N	K		I	W	S					T	Q	A	S	V	+++
51			D	Y	T	S		V	Y	S	S		N			I	W	S					T	Q	A	S		+++
52			S	Y		S		V	S		S		N					S					T	Q	A		V	++
53			S	Y		S		V	S		S		N					S					T	Q	A			++*
54			S	Y		S		V	Y		S		N					S					T	Q	A		V	++
55				Y				V	Y		S		N					S					T	Q	A			++
56				Y				V	Y		S		N					S					T	Q	A		V	++
57				Y				V	S		S		N					S					T	Q	A		V	++
58				Y				V	S		S		N					S					T	Q	A			+++
G			S	Y		S		V	Y		S		N					S					T	Q	A			++**
62				Y				V	Y		S												T	Q	A			++#
63			S	Y		S		V	Y		S												T	Q	A			++#
64			S	Y		S		V	Y		S																	++#
65													N					S					T	Q	A			++#

*参照物質1；**参照物質2；

#参照物質2を使って解析した変異体

【0 2 3 7】

実施例 1 5．H i s タグ付き F a b フラグメントの精製

細胞を、4℃、9 0 0 0 r p m で、3 0 分間の遠心分離によって回収し、- 2 0℃で保存した。抗体フラグメントを上清から 2 段階精製法を使って精製した。最初に、上清を緩衝液 A（5 0 m M N a H₂ P O₄、3 0 0 m M N a C l、1 0 m M イミダゾール、p H 8. 0）に対して再緩衝化し、濃縮し、1 0 0 m l を 5 m l N i - N T A スーパーフローカラム（Q i a g e n、1 0 1 8 1 4 2）にローディングした。ローディング後に、カラムをまず 2 0 カラム体積の緩衝液 A で洗浄し、次に 1 5 カラム体積の 4. 3 % 緩衝液 B（5 0 m M N a H₂ P O₄、3 0 0 m M N a C l、2 5 0 m M イミダゾール、p H 8. 0）で洗浄し、1 5 体積の緩衝液 B で溶出させた。フラクションを合わせ、P D - 1 0 カラム（G E H e a l t h c a r e、1 7 - 0 8 5 1 - 0 1）を製造者のプロトコールに従って使用することにより、緩衝液を P B S に交換した。第 2 の精製ステップでは、N i - N T A 精製抗体を C a p t u r e S e l e c t ラムダアフィニティマトリックス（B A C 0 8 4 9. 0 1 0）と共にインキュベートした。4℃で終夜インキュベートした後、マトリックスをカラムにローディングし、5 体積の P B S、5 体積の 5 0 0 m M アルギニン、1 0 0 m M N a H₂ P O₄、1 0 0 m M N a C l、p H 6. 0 で洗浄し、再び 5 体積の P B S で洗浄した。抗体を、6 体積の 1 0 0 m M グリシン（p H 3. 0）、次に 3 体積の 1 0 0 m M グリシン（p H 2. 0）で、溶出液を中和するための総体積の 1 / 1 5 の 1 M H E P E S（p H 7. 5）中に溶出させた。最後に溶出液を、4℃で終夜、P B S に対して透析した。精製抗体を S D S - P A G E および質量分析によって分析した。

【0 2 3 8】

実施例 1 6：大腸菌および H E K 2 9 3 における非タグ付き F a b フラグメントの生産
発現コンストラクトのクローニング

S a m b r o o k ら（「M o l e c u l a r C l o n i n g」コールドスプリングハーバー、1 9 8 9）に従って定型的なクローニング作業を行った。大腸菌からのプラスミド D N A の単離（ミニプレップ）には Q i a g e n - t i p（Q i a g e n）を使用した

。形質転換に使用した宿主生物は大腸菌 DH5 α 株 (Invitrogen) である。アガロースゲルからの DNA フラグメントの抽出は、Qiagen ゲル抽出キットを利用して、製造者のプロトコール (Qiagen) に従って行った。PCR およびシーケンス反応のオリゴヌクレオチドは、metabion から購入し、合成遺伝子 (サッカロミセス・セレビスシア (S. cerevisiae) のコドン使用頻度に最適化したもの) は Geneart から購入した。PCR 実験には Merck の KOD ポリメラーゼを製造者のプロトコールに従って使用した。全てのベクターコンストラクトを外部機関 (Eurofins) による配列決定で確認した。

【0239】

大腸菌発現ベクター pMC11 および pMC14

M18-G08-DKTHHT と M18-G08-G-DKTHHT の両者を pET28a から pUC 系大腸菌発現ベクター (それぞれ pMC14 および pMC11) の pLAC プロモーター制御下に再クローニングする操作は、軽鎖 (LC) および重鎖 (HC) 配列を別個に増幅した後、pUC 系ベクターのユニーク制限部位を利用することによって行った。

【0240】

コード配列の 5' 側および 3' 側の追加オリゴヌクレオチドには、pUC 系大腸菌発現ベクターへの LC および HC のインフレームサブクローニングに使用した制限酵素認識部位が含まれる。

【0241】

LC 配列の増幅は、NheI 制限部位を持ち pelB リーダーに結合するフォワードプライマーと LC 配列の 3' 端と対合するリバースプライマーとを使って行った。制限消化は NheI/XhoI で行った。続いて、NheI/XhoI 消化した pUC 系ベクターへのライゲーションを行った。ライゲートした DNA を大腸菌 DH5 α (Invitrogen) に形質転換した。

【0242】

HC 配列の増幅は、NcoI 制限部位を有し pelB リーダーに結合するフォワードプライマーと、LC 配列の 3' 端に対合し、末端 5 アミノ酸 DKTHHT をコードする追加ヌクレオチドとそれに続く SacII 制限部位とを有するリバースプライマーとを使って行った。制限消化は NcoI/SacII で行った。次に、NcoI/SacII 消化した pUC 系ベクターへのライゲーションを行った。ライゲートした DNA を大腸菌 DH5 α (Invitrogen) に形質転換した。

【0243】

M18-G08-DKTHHT の LC をコードする遺伝子のタンパク質配列は次のとおりである。

【化17】

```
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNQRPESGVP
DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEADYYCQSYDSSLGWFVGGGKLTVLGQPKAAPSVT
LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASS
YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
```

【0244】

M18-G08-DKTHHT の HC をコードする遺伝子のタンパク質配列は次のとおりである。

【化18】

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVSSISSSSGYIYY
ADSLKGRETISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVWRNHLDIYWGQGLTVTTSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
```

【0245】

M18-G08-G-DKTH TのLCをコードする遺伝子のタンパク質配列は次のとおりである。

【化19】

```
QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVP
DRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGWFVGGGKTLTVLGQPKAAPSVT
LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS
YLSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS
```

【0246】

M18-G08-G-DKTH TのHCをコードする遺伝子のタンパク質配列は次のとおりである。

【化20】

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFESSYWMSWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYY
ADSVKGRETISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVWRNYLDYWGQGTILVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
```

【0247】

哺乳類発現ベクターpMC19およびpMC32

プラスミドpMC19 (M18-G08-G-DKTH Tをコードする) およびpMC32 (M18-G08-DKTH Tをコードする) に関するコード配列はGeneartから合成遺伝子として購入した (哺乳類コドン使用頻度に最適化されたもの)。コード配列の5'側および3'側の追加オリゴヌクレオチドには、各配列を一本鎖哺乳類発現ベクターのpCMV5プロモーターの制御下にインフレームサブクローニングするために使用した制限酵素認識部位が含まれる。

【0248】

HEK293 6E細胞におけるFab発現

一過性にトランスフェクトされたHEK293 6E細胞を使用する哺乳動物細胞培養によって、いくつかのFabフラグメントを生産した。重鎖と軽鎖をどちらも、上述のように、単一ベクター系のCMV5プロモーターの制御下にクローニングした。発現規模は、トランスフェクションの24時間後に0.5%トリプトンTN1 (Organotect hnie、注文番号: 19553) と1%FCS ultra low IgG (Invitrogen、注文番号: 16250) を補足したF17培地 (Invitrogen、注文番号: 05-0092DK) を使って、20Lウェーブ (wave) バッグ (Cultibag、Sartorius) 中で10Lとした。5%CO₂、37℃、角度8°の揺動18回/分で、細胞を6日間培養した。発現レベルは約120mg/Lだった。細胞を遠心分離 (Sorvall RC12BP、30分、4℃、4000rpm) によって回収した。細胞を捨てた。Fabフラグメントを含有する上清を0.2μm滅菌フィルター (Sartorius Sartopore 2 XLG、注文番号: 5445307G8--00) で濾過した。

【0249】

大腸菌BL21におけるFab発現

Fabフラグメントは、上記の発現コンストラクトに基づく大腸菌系で発現させることもできる。10g/Lグルコース水和物 (Sigma、注文番号: G5767) および100mg/Lカルベニシリン (AppliChem、注文番号: A1491, 0010) を補足した200mlの2×YT培地 (Difco 2×YT培地: Becton Dickinson (BD)、注文番号: 244020) に、例えばpMC11で形質転換した大腸菌BL21の凍結培養物1000μlを接種し、250rpm、37℃で、16時間培養した。このシードトレイン (seed train) を、1g/Lグルコース水和物、100mg/Lカルベニシリンおよび0.1ml/LポリグリコールP2000

10

20

30

40

50

(BASF)を補足した2×YT培地20Lの接種に使用した。生産培養物は、50Lウェーブバック中、30℃、揺動35回/分、角度9°および曝気速度0.52L空気/分のSartorius Cultibagでインキュベートした。0.5~0.6のOD600において、Fabフラグメントの発現を、0.75mM IPTGで誘導した。さらに20時間のインキュベーション後に、遠心分離(Sorvall RC12BP、1時間、4℃、4000rpm)によって培養物を回収した。そのバイオマスを-20℃で凍結し、上清を0.2μm滅菌フィルター(Sartorius Sartopore 2 XLG、注文番号:5445307G8--00)で濾過し、Millipore Pellicon-Mini-Holderと2つのSartorius SliceカセットHydrosart 10kとを使ったMillipore Pro Flux M12クロスフロー濾過で濃縮した。使用したパラメータは、入口圧2バール;出口圧1.5バール;圧力差0.5バールであり、これが当初は50秒間で100mlの濾液をもたらした。

【0250】

100gの大腸菌細胞ペレットを、320mlの30mM Tris/HCl (pH 8.0)+200g/Lスクロース+6錠のEDTAフリープロテアーゼ阻害剤(Roché)+25U/mlベンゾナーゼ(Sigma E1014)+1mg/mlリゾチーム(Sigma)に再懸濁し、4℃で2時間インキュベートした。40KPSIヘッド(使用圧力36.1KPSI)を装着したTS細胞破碎システム(Constant Systems, Ltd.)を使って細胞を破碎した(2サイクル、セル温度10℃;供給溶液およびフロースルーは4℃に維持した)。4℃、35,000×gで35分間の遠心分離によって細胞残渣を除去した。清澄化した上清(粗抽出物)を滅菌濾過し、さらなる加工のために-20℃で保存した。

【0251】

非タグ付きFabの精製

本発明のFabフラグメントを滅菌濾過したHEK2936E上清もしくは大腸菌上清から、または滅菌濾過した大腸菌粗抽出物(上述のように生成したもの)から、2段階精製法を使って精製した。捕捉ステップとして「ラムダセレクト(lambda select)」アフィニティカラム(BAC)を使用した。細胞上清または大腸菌培養物10Lに対して、40mlのラムダセレクト樹脂を使用した。さらなる精製ステップは全て20℃で行い、以後のどのステップでも、使用した流速は6ml/分である。カラムを5カラム体積(=CV)のPBS (pH 7.4)で平衡化した。試料のpHを1M NaOH溶液でpH 7.4に調節し、カラムに適用した。次に、10CVのPBS (pH 7.4)で洗浄した。Fabフラグメントを3CVの50mM酢酸Na、500mM NaCl (pH 3.5)で溶出させた。溶出プールのpHを2.5M TrisでpH 7.0に調節し、滅菌濾過し、限外濾過デバイス(Amicon Ultra 10kDa、Millipore UFC901008)を使って17.8mgまで濃縮した。試料を、PBS (pH 7.4)で平衡化した35/500 Superdex 75サイズ排除カラム(GE Healthcare)に適用した。カラムを3ml/mlの流量で2CVにわたって溶出させ、各6mlのフラクションを集めた。Fabフラグメントを含有するフラクションをプールし、SDS PAGE (4-12% NuPage, Invitrogen)によって分析した。図9に示すように、M18-G08-G-DKTHHの調製物は、>98%の純度であり、軽鎖=L Cおよび重鎖=H Cの両方が等量ずつ存在する。

【0252】

実施例17:エキスピボでのプロトンピン時間(PT)(ラットPD/PK)

リバーロキサパンを、経口胃管法によって、EtOH-PEG-水(10-50-40%、5ml/kg)に溶解した1.5mg/kgの用量で、雄ウィスターラット(Charles River)に投与した。経口投与の約75分後に、Fab解毒剤注入用の静脈(頸静脈)カテーテルと血液試料採取用の動脈(頸動脈)カテーテルとを埋め込むために、イソフルラン麻酔を誘導した。経口リバーロキサパン投与の90分後に、Fab M

18-G08-G-DKTHHの注入を、1時間以内に85mg/kgの用量で開始した（PBS中、投与体積15ml/kg/時間）。プロトロンビン時間および血漿中濃度を実施例10で述べたように決定した。リバーロキサバン誘導性PT延長の正常化を図10に示す。この実験設定に関する未結合リバーロキサバンの血漿中濃度の時間経過を実施例18で述べる。

【0253】

実施例18：ラットにおけるFab解毒剤による未結合リバーロキサバン濃度の低減

リバーロキサバンの薬物動態に対するFab解毒剤のインビボ効果を調べるために、Fab M18-G08-G-DKTHHを共投与した後のラットにおけるリバーロキサバンの未結合濃度を、（実施例17に記載のプロトコールに従って）麻酔下のラットで決定した。薬物の未結合濃度だけが薬理学的効果を駆動するので、未結合濃度は、薬理学的効果の良い予測因子である。未結合濃度を決定するために、血漿試料をDPBSで希釈し（1/1 v/v）、排除サイズ30,000Daのメンブレンを有する限外濾過デバイスに加えた。試料を1200gで2分間遠心分離した。25μLの限外ろ過液をDPBSで希釈し（1/1 v/v）、排除サイズ30000Daのメンブレンを有する限外濾過デバイスに加えた。試料を1200gで2分間遠心分離した。25μLの限外ろ過液を25μLのDPBSで希釈し、内部標準を含有する酢酸アンモニウム/アセトニトリル（1/1 v/v）pH6.8の溶液150μLをスパイクした。血漿試料に300μLのアセトニトリルをスパイクし、4℃、2000gで、10分間遠心分離した。全ての試料をAPI 4000（AB Sciex）を使ったLC-MS/MSで分析した。fu値は、関係式 $fu(\%) = (\text{濾液濃度} / \text{血漿試料濃度}) \times 100$ に従って計算し、以前に記述されているように（Schuhmacher J.ら, J Pharm Sci. 2004; 93(4):816-30）、限外濾過デバイスへの非特異的結合および血漿希釈について補正した。

【0254】

図11に、1.5mg/kgのリバーロキサバンを経口投与し、リバーロキサバンの投与の1.5時間後から開始して1時間にわたって85mg/kgのFab M18-G08-G-DKTHHを注入した後の、ラット血漿における未結合リバーロキサバンの濃度/時間プロファイルを図示する。Fabの注入後に起こるリバーロキサバンの未結合血漿中濃度の迅速な低減が示されている。いくつかの試料では、リバーロキサバンの未結合濃度が定量下限（LLOQ）未満であったため、リバーロキサバンの未結合濃度を決定することができなかった。

【0255】

実施例19：ラットにおける出血時間

リバーロキサバンによって延長された出血を妨害するFab M18-G08-G-DKTHHの潜在的な能力を、ラット尾横切開モデルで研究した。薬物投与用および血液試料採取用の静脈（頸静脈）および動脈（頸動脈）カテーテルを埋め込むために、動物（雄ウィスターラット、Charles River）をイナクチン（180mg/kg i.p.）で麻酔した。1mg/kgリバーロキサバン（EtOH-PEG-水、10-50-40%中、3ml/kg）のiv. ボーラス投与の5分後に、先端から2~3mmの距離で尾を横切断することによって、出血を開始させた。出血事象を観察し記録するために出血中の尾を37℃の0.9%食塩水に浸漬した。出血開始の1分後に、107.5mg/kg（PBS中、1.33ml/kg/分）の用量で10分間にわたるFab M18-G08-G-DKTHHの注入を開始した。出血を30分間記録し、処置に関する知識のない観察者がスコア化した（0=出血なし、1=軽微、2=軽度、3=中等度、4=最大出血）。スコアは30秒間隔で取得し、累積出血時間は、30分間のスコア4出血の場合に達成される1800秒を最大値として計算した。各群5匹の中央出血時間は、無処置群、リバーロキサバン群およびリバーロキサバン+Fab解毒剤群において、それぞれ195、1425および368秒だった（図12）。

【0256】

実施例 20 : Fab M18-G08-G-DKTH T-リバーロキサバン複合体の結晶化および X 線構造決定

結晶化

Fab M18-G08-G-DKTH Tを含むタンパク質を、10 mM HEPES pH 7.0 中で 30 mg/ml まで濃縮した。結晶化に先だって、タンパク質溶液を、50 mM DMSO に溶解した 3 倍モル過剰のリバーロキサバンと混合し、氷上で 1 時間インキュベートした。Fab M18-G08-G-DKTH T とリバーロキサバンとを含むタンパク質コンストラクトの共結晶を、静置液滴法を使って 20 °C で成長させ、等体積のタンパク質溶液と沈殿剤としてのウェル溶液 (100 mM Tris pH 7.0、20 % PEG 4000、2 M NaCl) とを混合することによって結晶化させた。結晶は 1 日後に現れ、14 日後にその最終サイズまで成長した。

10

【0257】

データの収集と処理

クライオバッファーを使用せずに結晶を液体窒素中で急速冷凍した。結晶のデータは、BESSY シンクロトロン (ベルリン) のビームライン BL14.1 において、MARCCD 検出器で収集した。データを指数付けし、XDS (Kabsch, W. (2010) Acta Cryst. D66, 125-132) で積分し、POINTLESS でスケーリングに備え、SCALA (P. R. Evans, (2005) Acta Cryst. D62, 72-82) でスケーリングした。結晶は 2.25 Å まで回折し、格子定数 $a = 120.4$ の立方晶空間群 $P23$ と、非対称ユニット中に 1 つの Fab M18-G08-G-DKTH T-リバーロキサバン複合体とを有している。

20

【0258】

構造の決定と精密化

BALBES (F. Long, A. Vagin, P. Young および G. N. Murshudov (2008) Acta Cryst. D64, 125-132) を使用し、pdb コード 1rzf をサーチモデルとして、リバーロキサバンとモノクローナル抗体 Fab M18-G08-G-DKTH T の共構造を分子置換法で解いた。COOT (P. Emsley ら. (2010) Acta Cryst. D66: 486-501) によるモデル構築と、REFMAC5.5 (G. N. Murshudov ら. (1997) Acta Cryst. D53, 240-255) を使った最尤精密化 (maximum likelihood refinement) を繰り返すことでモデルを完成させた。データセットおよび精密化の統計情報を表 13 に要約する。

30

【0259】

[表 13] Fab M18-G08-G-DKTH T-リバーロキサバン複合体に関するデータセットおよび精密化の統計情報

【表 1 3】

波長	0.9184 Å
分解能 (最外殻)	37.44~2.25 (2.31~2.25) Å
反射 (観測/独立)	402848/27895
完全性 ^a	100.0% (100.0%)
I/s ^a	8.28 (1.59)
R _{merge} ^{a, b}	0.07 (0.43)
空間群	P23
単位格子パラメータ	120.43 Å
<i>a</i>	
R _{cryst} ^c	0.183
R _{free} ^d	0.234
ウィルソン温度因子	39.9 Å ²
RMSD結合長 ^e	0.023 Å
RMSD結合角	2.045°
タンパク質原子	3233
水分子	258

10

^a 括弧内の値は最外殻の値

20

^b $R_{\text{merge}} = \sum hkl |I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum hkl \langle I_{hkl} \rangle$ (式中、 I_{hkl} は反射 hkl の強さであり、 $\langle I_{hkl} \rangle$ は複数の観察の平均強さである。^c $R_{\text{cryst}} = \sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum F_{\text{obs}}$ (式中、 F_{obs} および F_{calc} はそれぞれ構造因子振幅の観察値および計算値である。^d 5%テストセット^e RMSD、理想的立体化学についてのパラメータセットからの二乗平均平方根偏差

【0 2 6 0】

実施例 2 1 : X線構造ベースのエピトープマッピング

F a b M 1 8 - G 0 8 - G - D K T H T とリバーロキサバンの複合体 (図 1 3) は、非対称ユニットあたり 1 コピーの複合体として結晶化した。リバーロキサバンと接触している F a b M 1 8 - G 0 8 - G - D K T H T の残基 (パラトープ)。2つの方法を使って、F a b M 1 8 - G 0 8 - G - D K T H T に対するリバーロキサバンの結合エピトープを決定し、表 1 4 a および表 1 4 b に列挙する。

30

【0 2 6 1】

方法 1 : 埋没表面を CCP 4 プログラム AREA IMOL (P. J. Briggs (2000) CCP 4 Newsletter No. 38) で解析し、リバーロキサバンの結合ありとリバーロキサバンの結合なしとで計算した場合に総面積差を示す残基 (表 1 4 a)。

【0 2 6 2】

方法 2 : 計算のために、F a b M 1 8 - G 0 8 - G - D K T H T の全てのアミノ酸とリバーロキサバンに、水素原子を付加した。次に、結晶構造における結合リバーロキサバンの 4 Å 環境にある残基を、プログラム Discovery Studio バージョン 3.1 (Accelrys Software Inc.、2005-11) を使って計算した (表 1 4 b)。

40

【0 2 6 3】

両方の計算から得られる残基は全てリバーロキサバンに接触しているとみなした。

【0 2 6 4】

[表 1 4 a] 方法 1 を使った場合にリバーロキサバンと接触している F a b M 1 8 - G 0 8 - G - D K T H T の残基

50

【表 1 4 - 1】

鎖	残基	面積差
LC	GLN90	-6.00
LC	TRP99	-25.30
LC	PHE101	-1.80
HC	SER 31	-4.40
HC	TRP33	-67.30
HC	SER35	-0.70
HC	TRP47	-4.60
HC	SER50	-6.50
HC	SER53	-6.00
HC	TYR57	-3.40
HC	VAL99	-18.70
HC	TRP100	-0.20
HC	ARG101	-11.20
HC	ASN102	-27.20
HC	TYR103	-0.80
HC	LEU104	-15.00

10

〔表 1 4 b〕 方法 2 を使って計算されたリバーロキサバンと接触している Fab M18-G08-G-DKTH T の残基。全ての距離を Å で列挙する。

【表 1 4 - 2】

鎖	残基	原子1	距離[Å]	原子2
LC	ASN35	HD21	3,21	H2
LC	ASN35	HD22	3,92	H2
LC	ASN35	ND2	3,95	H2
LC	TYR37	HH	3,20	H2
LC	TYR37	OH	3,93	H2
LC	GLN90	CD	2,89	H2
LC	GLN90	HE21	3,73	H2
LC	GLN90	HE22	2,67	H2
LC	GLN90	NE2	2,96	H2
LC	GLN90	OE1	2,54	H2
LC	GLN90	HG2	3,86	CL29
LC	GLN90	HG1	3,19	CL29
LC	GLN90	CG	3,82	CL29
LC	GLN90	CD	3,75	CL29
LC	GLN90	OE1	3,54	C28
LC	GLN90	NE2	3,60	C28
LC	GLN90	HE22	3,31	C28
LC	GLN90	CD	3,71	C28
LC	TRP99	HB2	3,57	S24
LC	TRP99	HB1	3,91	S24
LC	TRP99	CG	3,57	S24
LC	TRP99	CD2	3,79	S24
LC	TRP99	CD1	3,96	S24
LC	TRP99	CB	3,93	S24
LC	TRP99	CZ2	3,86	O20
LC	TRP99	CH2	3,94	O20
LC	TRP99	CE2	3,95	O20
LC	TRP99	NE1	3,67	N14
LC	TRP99	HZ2	3,33	N14
LC	TRP99	HE1	3,56	N14
LC	TRP99	CZ2	3,45	N14
LC	TRP99	CE2	3,55	N14
LC	TRP99	HZ2	3,89	H8
LC	TRP99	CE2	3,94	H6
LC	TRP99	CZ2	3,22	H6
LC	TRP99	HE1	3,49	H6
LC	TRP99	HZ2	2,30	H6
LC	TRP99	CE2	3,78	H5
LC	TRP99	CH2	3,14	H5
LC	TRP99	CZ2	2,92	H5
LC	TRP99	HH2	3,12	H5
LC	TRP99	HZ2	2,72	H5
LC	TRP99	CE2	3,62	H3
LC	TRP99	CZ2	3,71	H3
LC	TRP99	HE1	3,04	H3
LC	TRP99	HZ2	3,46	H3
LC	TRP99	NE1	3,37	H3
LC	TRP99	CD1	3,98	H2
LC	TRP99	HD1	3,52	H2
LC	TRP99	CD1	3,82	H1
LC	TRP99	HD1	3,86	H1
LC	TRP99	HE1	3,39	H1
LC	TRP99	NE1	3,59	H1
LC	TRP99	HB2	3,65	CL29
LC	TRP99	HB1	3,13	CL29
LC	TRP99	CB	3,85	CL29
LC	TRP99	HZ2	3,05	C7
LC	TRP99	CZ2	3,82	C7
LC	TRP99	HZ2	3,92	C3
LC	TRP99	HD1	3,41	C28
LC	TRP99	HB1	3,87	C28
LC	TRP99	CG	3,95	C28
LC	TRP99	CD1	3,56	C28
LC	TRP99	HD1	3,79	C27
LC	TRP99	HB2	3,69	C27
LC	TRP99	HB1	3,29	C27
LC	TRP99	CG	3,68	C27
LC	TRP99	CD1	3,77	C27
LC	TRP99	CB	3,77	C27
LC	TRP99	NE1	3,52	C25
LC	TRP99	HE1	3,61	C25
LC	TRP99	HD1	3,61	C25
LC	TRP99	CG	3,98	C25

10

20

30

40

【表 1 4 - 3】

鎖	残基	原子1	距離 [Å]	原子2
LC	TRP99	CD1	3.48	C25
LC	TRP99	NE1	3.56	C19
LC	TRP99	HE1	3.67	C19
LC	TRP99	CG	3.76	C19
LC	TRP99	CE2	3.64	C19
LC	TRP99	CD2	3.78	C19
LC	TRP99	CD1	3.65	C19
LC	TRP99	NE1	3.80	C16
LC	TRP99	HZ2	3.92	C16
LC	TRP99	CZ2	3.65	C16
LC	TRP99	CE2	3.51	C16
LC	TRP99	CD2	3.94	C16
LC	TRP99	HZ2	3.15	C12
LC	TRP99	CZ2	3.51	C12
LC	PHE101	HZ	3.53	CL29
LC	PHE101	HE1	3.40	CL29
LC	PHE101	CZ	3.83	CL29
LC	PHE101	CE1	3.75	CL29
HC	TRP33	HE3	3.20	O20
HC	TRP33	HE1	3.60	N15
HC	TRP33	CZ2	3.83	H9
HC	TRP33	HZ2	3.62	H9
HC	TRP33	CD2	2.95	H7
HC	TRP33	CE2	2.88	H7
HC	TRP33	CE3	2.96	H7
HC	TRP33	CG	3.65	H7
HC	TRP33	CH2	2.87	H7
HC	TRP33	CZ2	2.88	H7
HC	TRP33	CZ3	2.92	H7
HC	TRP33	HE3	3.62	H7
HC	TRP33	HH2	3.48	H7
HC	TRP33	HZ2	3.52	H7
HC	TRP33	HZ3	3.58	H7
HC	TRP33	NE1	3.73	H7
HC	TRP33	CD2	3.86	H5
HC	TRP33	CE3	2.96	H5
HC	TRP33	CH2	3.95	H5
HC	TRP33	CZ3	3.03	H5
HC	TRP33	HE3	2.81	H5
HC	TRP33	HZ3	2.95	H5
HC	TRP33	CB	3.63	H4
HC	TRP33	CD2	3.25	H4
HC	TRP33	CE3	2.89	H4
HC	TRP33	CG	3.61	H4
HC	TRP33	CZ3	3.65	H4
HC	TRP33	HB1	3.20	H4
HC	TRP33	HB2	3.41	H4
HC	TRP33	HE3	2.66	H4
HC	TRP33	HZ3	3.98	H4
HC	TRP33	HE1	2.59	H14
HC	TRP33	NE1	3.57	H14
HC	TRP33	HE1	3.31	H13
HC	TRP33	CD1	3.78	H12
HC	TRP33	HD1	3.21	H12
HC	TRP33	HE1	3.78	H12
HC	TRP33	CD1	3.48	H11
HC	TRP33	CG	3.88	H11
HC	TRP33	HB2	3.60	H11
HC	TRP33	HD1	3.38	H11
HC	TRP33	NE1	3.95	H11
HC	TRP33	HE1	3.55	H10
HC	TRP33	HZ2	3.96	H10
HC	TRP33	NE1	3.62	C6
HC	TRP33	HZ2	3.79	C6
HC	TRP33	HE1	3.43	C6
HC	TRP33	CZ2	3.93	C6
HC	TRP33	CE2	3.80	C6
HC	TRP33	NE1	3.46	C5
HC	TRP33	HE1	3.52	C5
HC	TRP33	HD1	3.39	C5
HC	TRP33	CD1	3.37	C5
HC	TRP33	CZ3	3.94	C3
HC	TRP33	CZ2	3.88	C3

10

20

30

40

【表 1 4 - 4】

鎖	残基	原子1	距離 [Å]	原子2
HC	TRP33	CH2	3.90	C3
HC	TRP33	CE3	3.92	C3
HC	TRP33	CE2	3.83	C3
HC	TRP33	CD2	3.88	C3
HC	TRP33	NE1	3.53	C2
HC	TRP33	HE1	3.64	C2
HC	TRP33	CE2	3.75	C2
HC	TRP33	CD1	3.83	C2
HC	TRP33	HE1	3.30	C18
HC	TRP33	NE1	3.60	C13
HC	TRP33	HE1	3.00	C13
HC	TRP33	HD1	4.00	C13
HC	TRP33	HZ3	3.90	C12
HC	TRP33	HE3	3.23	C12
HC	TRP33	CZ3	3.78	C12
HC	TRP33	CE3	3.40	C12
HC	TRP33	CD2	3.98	C12
HC	TRP33	NE1	3.64	C11
HC	TRP33	HZ2	3.97	C11
HC	TRP33	HE1	3.09	C11
HC	TRP33	NE1	3.52	C10
HC	TRP33	HE1	3.24	C10
HC	TRP33	HD1	3.28	C10
HC	TRP33	CD1	3.54	C10
HC	SER35	OG	3.83	S24
HC	SER35	HB2	3.62	S24
HC	SER35	HB2	3.55	O20
HC	TRP47	NE1	3.63	S24
HC	TRP47	HE1	3.38	S24
HC	TRP47	HD1	3.23	S24
HC	TRP47	CD1	3.55	S24
HC	TRP47	HE1	3.98	O20
HC	TRP47	HD1	3.36	CL29
HC	TRP47	HB2	3.34	CL29
HC	TRP47	CD1	3.96	CL29
HC	TRP47	HD1	3.76	C27
HC	SER50	OG	3.46	S24
HC	SER50	HG	2.90	S24
HC	SER50	OG	2.49	O20
HC	SER50	HG	1.73	O20
HC	SER50	HB2	3.45	O20
HC	SER50	HB1	2.75	O20
HC	SER50	CB	3.08	O20
HC	SER50	HG	3.86	N14
HC	SER50	HB1	3.87	H5
HC	SER50	HG	3.79	H5
HC	SER50	OG	3.98	C19
HC	SER50	HG	3.19	C19
HC	SER50	OG	3.55	C16
HC	SER50	HG	2.70	C16
HC	SER50	HB1	3.97	C16
HC	SER53	OG	3.73	H13
HC	VAL99	HG23	3.34	O9
HC	VAL99	HG22	3.25	O9
HC	VAL99	HG21	3.13	O9
HC	VAL99	CG2	3.48	O9
HC	VAL99	HG23	2.87	O8
HC	VAL99	HG22	3.89	O8
HC	VAL99	HG21	3.51	O8
HC	VAL99	CG2	3.63	O8
HC	VAL99	HG23	3.72	O20
HC	VAL99	HG13	2.97	O20
HC	VAL99	HG23	2.74	N14
HC	VAL99	HG21	4.00	N14
HC	VAL99	HG13	3.66	N14
HC	VAL99	HB	4.00	N14
HC	VAL99	CG2	3.75	N14
HC	VAL99	HG23	3.76	H5
HC	VAL99	CG1	3.92	H4
HC	VAL99	CG2	3.20	H4
HC	VAL99	HG13	3.17	H4
HC	VAL99	HG21	3.82	H4
HC	VAL99	HG22	3.43	H4

10

20

30

40

【表 1 4 - 5】

鎖	残基	原子1	距離[Å]	原子2
HC	VAL99	HG23	2.18	H4
HC	VAL99	CG2	3.89	H3
HC	VAL99	HG21	3.86	H3
HC	VAL99	HG23	3.00	H3
HC	VAL99	HG22	3.38	H11
HC	VAL99	HB	3.87	H1
HC	VAL99	HG23	3.96	H1
HC	VAL99	HG23	3.54	C7
HC	VAL99	HG23	3.16	C4
HC	VAL99	HG22	3.55	C4
HC	VAL99	HG21	3.57	C4
HC	VAL99	CG2	3.67	C4
HC	VAL99	HB	3.91	C25
HC	VAL99	HG13	3.92	C19
HC	VAL99	HB	3.83	C19
HC	VAL99	HG23	3.26	C16
HC	VAL99	HG13	3.20	C16
HC	VAL99	HB	3.80	C16
HC	VAL99	HG23	2.83	C12
HC	VAL99	HG13	3.90	C12
HC	VAL99	CG2	3.91	C12
HC	ARG101	N	3.36	O9
HC	ARG101	HN	3.27	O9
HC	ARG101	HA	2.36	O9
HC	ARG101	CA	3.13	O9
HC	ARG101	C	3.33	O9
HC	ARG101	HA	3.93	H11
HC	ARG101	HN	3.87	H11
HC	ARG101	HA	3.46	C4
HC	ASN102	N	2.65	O9
HC	ASN102	HN	1.80	O9
HC	ASN102	HB2	3.87	O9
HC	ASN102	HA	3.45	O9
HC	ASN102	CA	3.67	O9
HC	ASN102	OD1	3.05	O8
HC	ASN102	N	3.07	O8
HC	ASN102	HN	2.53	O8
HC	ASN102	HB2	3.41	O8
HC	ASN102	HA	2.43	O8
HC	ASN102	CG	3.57	O8
HC	ASN102	CB	3.57	O8
HC	ASN102	CA	3.13	O8
HC	ASN102	OD1	3.04	N14
HC	ASN102	HA	3.01	N14
HC	ASN102	HN	3.82	N1
HC	ASN102	CG	3.33	H6
HC	ASN102	HA	3.56	H6
HC	ASN102	HD21	3.98	H6
HC	ASN102	OD1	2.56	H6
HC	ASN102	C	3.88	H3
HC	ASN102	CA	3.20	H3
HC	ASN102	CB	3.79	H3
HC	ASN102	CG	3.25	H3
HC	ASN102	HA	2.15	H3
HC	ASN102	HN	3.80	H3
HC	ASN102	N	4.00	H3
HC	ASN102	OD1	2.16	H3
HC	ASN102	O	3.58	H2
HC	ASN102	C	2.91	H1
HC	ASN102	CA	3.16	H1
HC	ASN102	CB	3.96	H1
HC	ASN102	CG	3.64	H1
HC	ASN102	HA	2.47	H1
HC	ASN102	O	2.93	H1
HC	ASN102	OD1	2.90	H1
HC	ASN102	OD1	3.19	C7
HC	ASN102	HN	3.98	C7
HC	ASN102	HA	3.47	C7
HC	ASN102	CG	3.97	C7
HC	ASN102	N	3.25	C4
HC	ASN102	HN	2.48	C4
HC	ASN102	HB2	3.89	C4
HC	ASN102	HA	3.37	C4

10

20

30

40

【表 1 4 - 6】

鎖	残基	原子1	距離[Å]	原子2
HC	ASN102	CA	3.85	C4
HC	ASN102	OD1	3.67	C25
HC	ASN102	O	3.81	C25
HC	ASN102	HA	3.50	C25
HC	ASN102	C	3.89	C25
HC	ASN102	OD1	3.70	C12
HC	ASN102	HA	3.73	C12
HC	TYR103	HA	3.01	H2
HC	TYR103	CA	3.96	H1
HC	TYR103	HA	3.43	H1
HC	TYR103	N	3.50	H1
HC	TYR103	HA	3.68	C28
HC	TYR103	HA	3.88	C25
HC	LEU104	HD23	3.04	S24
HC	LEU104	HD13	3.78	S24
HC	LEU104	HG	3.05	H2
HC	LEU104	HG	3.60	CL29
HC	LEU104	HD23	3.97	CL29
HC	LEU104	HD13	2.83	CL29
HC	LEU104	HD12	3.44	CL29
HC	LEU104	CD1	3.53	CL29
HC	LEU104	HG	3.16	C28
HC	LEU104	HD23	3.42	C28
HC	LEU104	HD21	3.95	C28
HC	LEU104	CG	3.99	C28
HC	LEU104	CD2	3.97	C28
HC	LEU104	HG	3.32	C27
HC	LEU104	HD23	3.14	C27
HC	LEU104	HD13	3.26	C27
HC	LEU104	CG	3.91	C27
HC	LEU104	CD2	3.91	C27
HC	LEU104	CD1	3.94	C27
HC	LEU104	HG	3.92	C25
HC	LEU104	HD23	3.53	C25
HC	LEU104	HD21	3.88	C25
HC	LEU104	HD23	3.33	C19

10

20

【0 2 6 5】

要約すると、F a b M 1 8 - G 0 8 - G - D K T H T は、次に挙げる残基によって、リバーロキサバンを認識する。

軽鎖：

A s n 3 5 [L - C D R 1]、T y r 3 7、G l n 9 0 [L - C D R 3]、T r p 9 9 [L - C D R 3]、P h e 1 0 1

重鎖：

S e r 3 1 [H - C D R 1]、T r p 3 3 [H - C D R 1]、S e r 3 5 [H - C D R 1]、T r p 4 7、S e r 5 0 [H - C D R 2]、V a l 9 9 [H - C D R 3]、T r p 1 0 0 [H - C D R 3]、A r g 1 0 1 [H - C D R 3]、A s n 1 0 2 [H - C D R 3]、T y r 1 0 3 [H - C D R 3]、L e u 1 0 4 [H - C D R 3]。

30

【0 2 6 6】

リバーロキサバンのクロロチオフエン部分はT r p 9 9 (L - C D R 3) への π -スタッキングおよびL e u 1 0 4 (H - C D R 3) への疎水性スタッキングによって相互作用する。リバーロキサバンの中央アミドは、S e r 5 0 (H - C D R 2) およびA s n 1 0 2 (H - C D R 3) の側鎖に水素結合している。リバーロキサバンのオキサゾールのカルボニル酸素は、A s n 1 0 2 (H - C D R 3) の主鎖アミドに水素結合している。ここに記載した相互作用は全て式 1 に移し換えることができる。

40

【0 2 6 7】

リバーロキサバンのフェニル環は、T r p 3 3 (H - C D R 1) への π -スタッキングによって相互作用する。これらの相互作用は式 2 に移し換えることができる。

【0 2 6 8】

図 1 3 に、スティックで示されたリバーロキサバンと複合体を形成しているF a b M 1 8 - G 0 8 - G - D K T H T の模式図を図示する。図 1 4 に、F a b M 1 8 - G 0 8 - G - D K T H T とリバーロキサバンの結合および相互作用を図示する。

【0 2 6 9】

実施例 2 2：競合 E L I S A によるリバーロキサバン含量の決定および定量

50

PBS T : 0.05% Tween 20 (Sigma、P7949) を補足した 1 × P
BS

PBS T-MP 3% : 3% 粉乳 (Cell Signaling、9999) を補足し
た PBS T

与えられた試料中のリバーロキサバンの含量を決定するために、競合 ELISA を確立
した。簡単に述べると、ストレプトアビジンをプレコートした MTP プレート (Greiner、No. 655990) を、実施例 1 K からの化合物 100 nM と共に、室温で 1
時間インキュベートした。PBS T で洗浄した後、プレートを室温で 1 時間、PBS T-MP 3% でブロッキングし、洗浄ステップを繰り返した。競合ステップのために、PBS
中に段階希釈したさまざまな量のリバーロキサバンを含有する試料を、最終濃度 2.5 μg/ml の Fab M18-G08-G-DKTH T と混合し、室温で 1 時間インキュベ
ートしてから、前処理したウェルに移した。インキュベーションと PBS T による洗浄後
に、残留結合 Fab の検出を、HRP にカップリングされた抗 h Ig G (Fab 特異的)
(Sigma; A0293) によって行った。100 μl の TMB (Invitrogen、2023) の添加によって呈色反応を進行させ、5~15 分後に、100 μl の H₂
SO₄ (0.25 M; Merck、1120801000) を添加することによって停止
させた。比色反応をプレートリーダー (Tecan) において 450 nm で記録した。

10

【0270】

図 15 に示すように、シグナルの用量依存的現象を検出することができた。

【0271】

20

実施例 23 : Fab 解毒剤の存在下での トロンビン 生成 アッセイ における アピキサバン
および ダビガトラン の 活性

トロンビン 生成 アッセイ は本質的に 実施例 8 で述べた ように 行った。実験は、それぞれ
3 μM アピキサバン (図 16) または 0.75 μM ダビガトラン (図 17) の存在下で行
った。Fab 解毒剤 だけを 加えた 場合 (最終濃度はそれぞれ 1.43 μM および 0.72
μM) も、Fab 解毒剤 を リバーロキサバン (最終濃度 0.1 μM) と 組み合わせて 加え
た場合も、トロンビン 生成 に対する 効果は 検出 できなかつた。

【0272】

文献

- Benton, T. et al. (2002) Cytotechnology 2002 ; 38 : 43-46) 30
- Cicortas Gunnarsson et al., Protein Eng Des Sel 2004 ; 17 (3) : 213-21
- Emsley P. et al. (2010) Acta Cryst. D66 : 486-501
- Evans P. R, (2005) Acta Cryst. D62, 72-82
- Garcia, D. et al., Blood 2010 ; 115 (1) : 15-20 G
- Gebauer M. et al., Curr. Opinion in Chem Biol. 2009 ; 13 : 245-255 40
- Guertin et al., Current Medicinal Chemistry 2007, 14, 2471-2781
- Long et al. F (2008) Acta Cryst. D64, 125-132
- Murshudov G. N. et al. (1997) Acta Cryst. D53, 240-255
- Kabsch, W. (2010) Acta Cryst. D66, 125-132
- Keefe AD., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 2010 ; 9 : 537-550) 50

Levi, M. et al., . N Engl J Med. 2010; 363 (19): 1791-800.

Nuttall S.D. et al., Curr. Opinion in Pharmacology 2008; 8: 608-617

Perzborn E. et al., Nat. Rev. Drug Discov. 2011; 10 (1): 61-75

Romualdi et al.; Curr. Pharm. Des. 2010; 16 (31): 3478-82

Schlehuber S. and Skerra A., Drug Discov. Today 2005; 10 (1): 23-33)

Schuhmacher J, et al. J Pharm Sci. 2004; 93 (4): 816-30

Sheedy, C. et al., Biotech Adv 2007; 25: 333-52.

Soderling et al., Nature Biotech. 2000, 18: 853-856

Sorbera et al. Drugs of the Future 2005, 30 (9): 877-885

Vaughan et al, Nat. Biotech. 1996; 14 (3): 309-314

Virnekaes B. et al., Nucl. Acids Res. 1994, 22: 5600

WO 2009/042962 A2

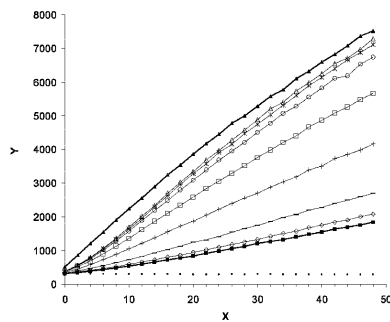
WO 97/08320

10

20

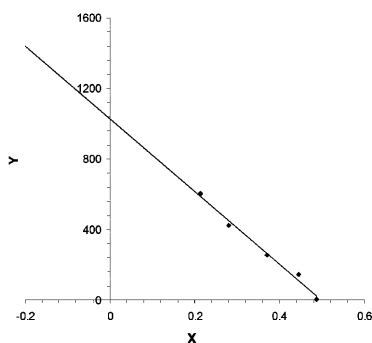
【図 1】

Fig. 1:



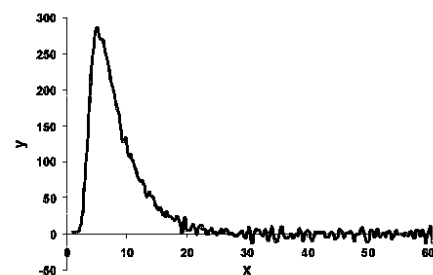
【図 2】

Fig. 2:



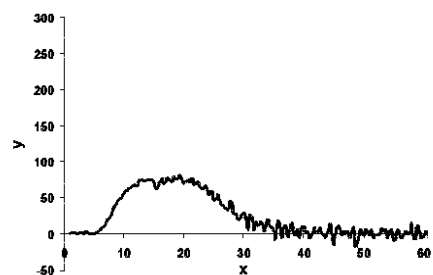
【図 3 a)】

a)



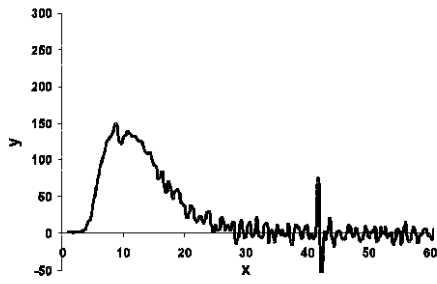
【図 3 b)】

b)



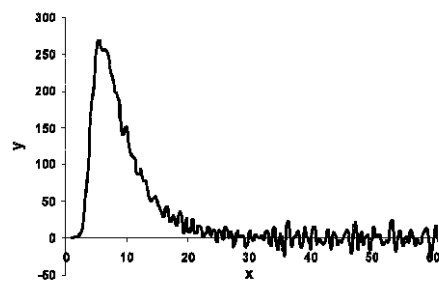
【図 3 c）】

c)



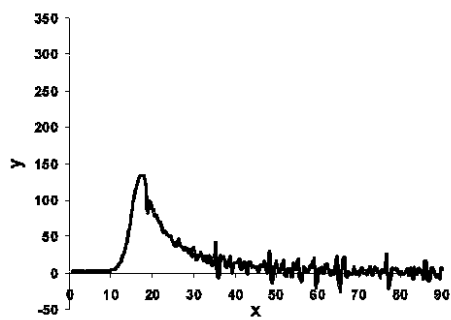
【図 3 d）】

d)



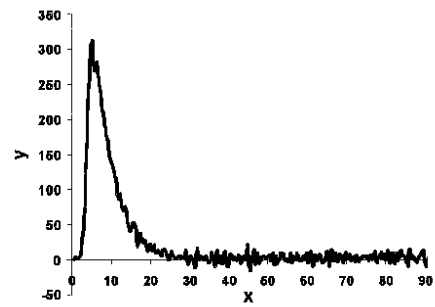
【図 4 c）】

c)



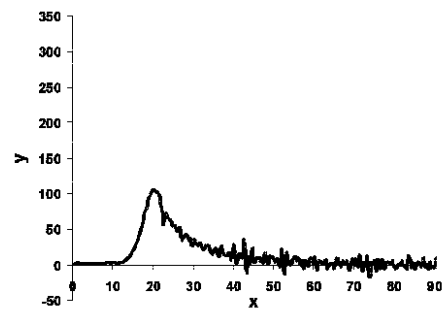
【図 4 a）】

a)



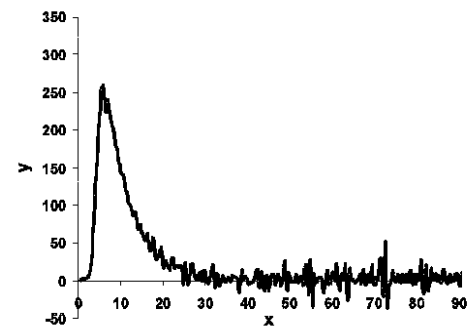
【図 4 b）】

b)



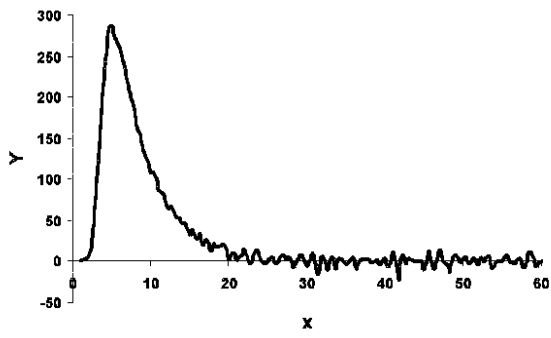
【図 4 d）】

d)



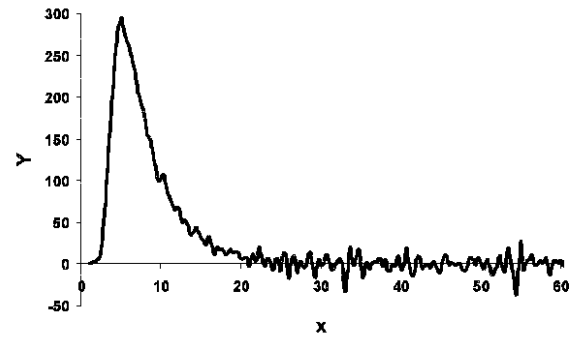
【図 5 a)】

a)



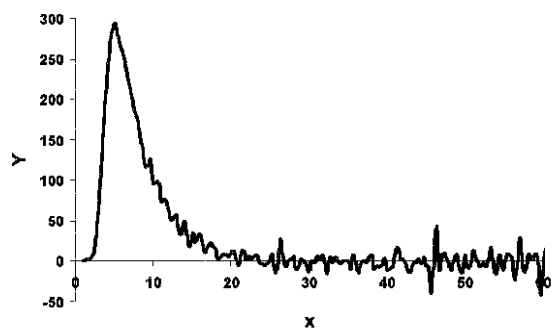
【図 5 b)】

b)



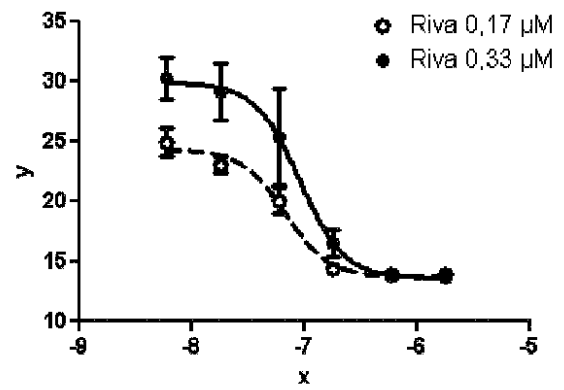
【図 5 c)】

c)



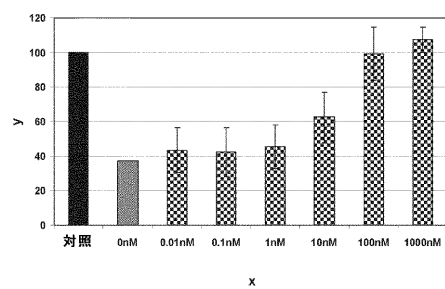
【図 7】

Fig. 7:



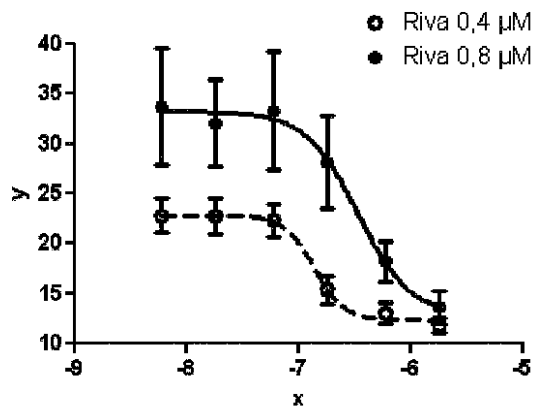
【図 6】

Fig. 6:



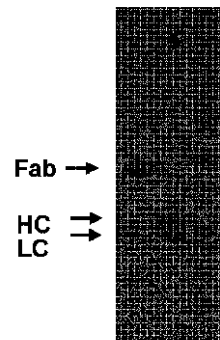
【 図 8 】

Fig. 8:



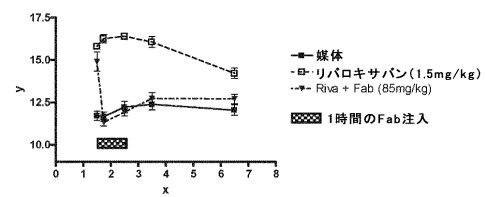
【 図 9 】

Fig. 9:



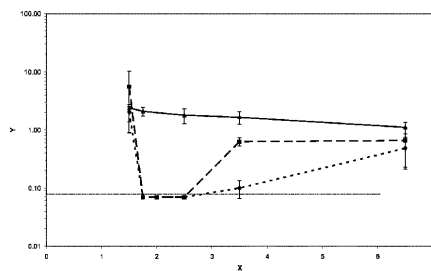
【 図 10 】

Fig. 10:



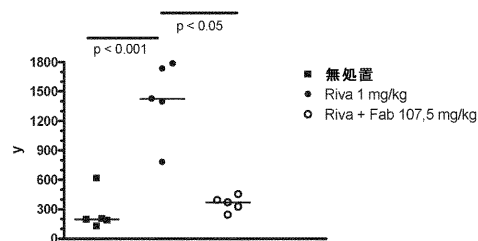
【 図 11 】

Fig. 11:



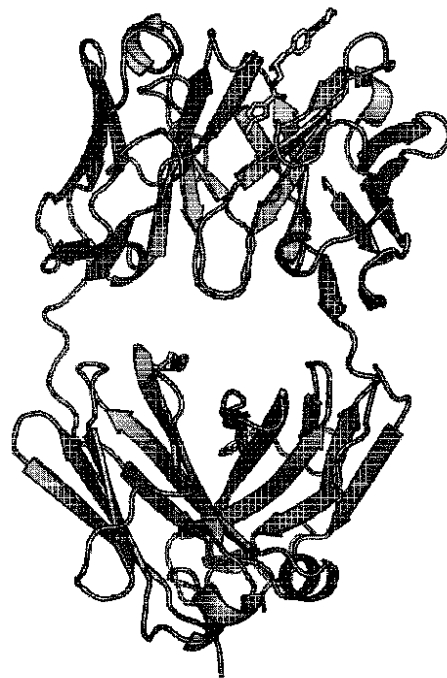
【 図 12 】

Fig. 12:



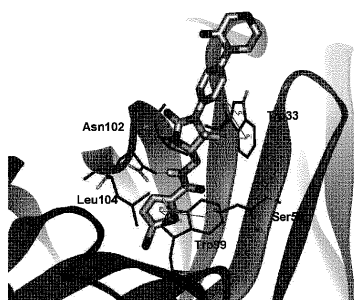
【 図 13 】

Fig. 13:



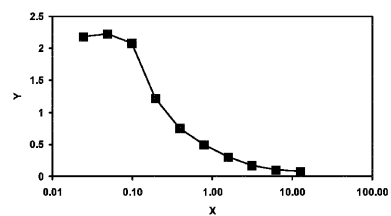
【図 14】

Fig. 14:



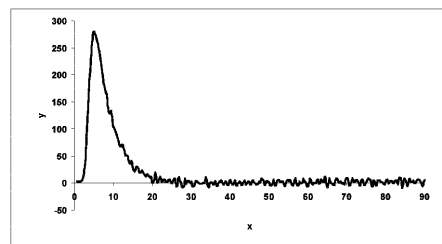
【図 15】

Fig. 15:



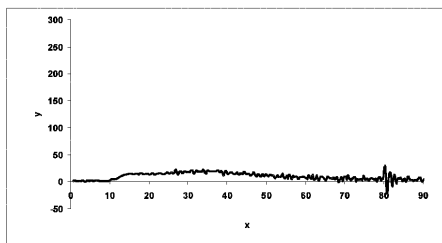
【図 16 a)】

a)



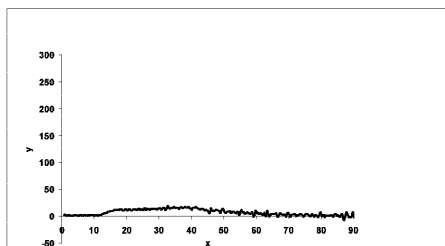
【図 16 b)】

b)



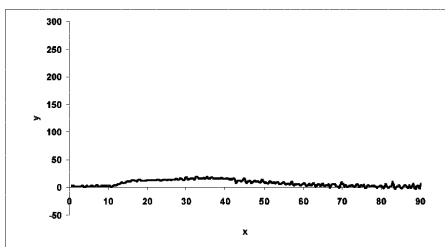
【図 16 c)】

c)



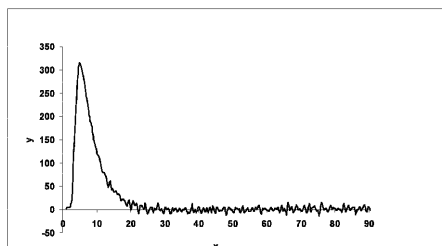
【図 16 d)】

d)



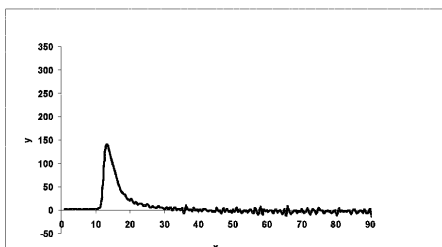
【図 17 a)】

a)



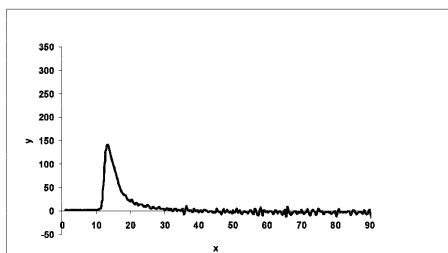
【図 17 b)】

b)



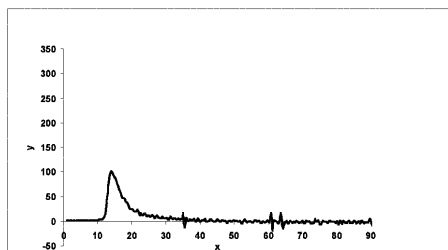
【図 17 c)】

c)



【図 17 d)】

d)



【配列表】

2014506448000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/050595

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/44 A61K39/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EIGENBROT C ET AL: "Structural Insight into How An Anti-idiotypic Antibody Against D3H44 (Anti-tissue Factor Antibody) Restores Normal Coagulation", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 331, no. 2, 8 August 2003 (2003-08-08), pages 433-446, XP004441509, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00735-6	1-3, 18-28
Y	abstract page 442, left-hand column, paragraph 1 - page 443, left-hand column, paragraph 3 ----- -/--	4-17, 29-41

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 March 2012

Date of mailing of the international search report

27/03/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Irion, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/050595

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZIKRIA JENNIFER CARREIRO ET AL: "Oral anticoagulation with factor Xa and thrombin inhibitors: on the threshold of change", CURRENT OPINION IN HEMATOLOGY, RAPID SCIENCE PUBLISHERS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 16, no. 5, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 347-356, XP009131923, ISSN: 1065-6251 table 1 page 355, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1 -----	1-41
A	SCHULMAN ET AL: "Anticoagulants and Their Reversal", TRANSFUSION MEDICINE REVIEWS, GRUNE AND STRATTON, ORLANDO, FL, US, vol. 21, no. 1, 13 December 2006 (2006-12-13), pages 37-48, XP005749419, ISSN: 0887-7963, DOI: 10.1016/J.TMRV.2006.08.002 abstract page 46, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 3 -----	1-41
Y	US 2001/051158 A1 (OWENS SAMUEL M [US] ET AL) 13 December 2001 (2001-12-13) abstract -----	4-17, 29-41
Y	FRÄ CR DÄ CR RIC LAPOSTOLLE ET AL: "Assessment of digoxin antibody use in patients with elevated serum digoxin following chronic or acute exposure", INTENSIVE CARE MEDICINE, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 34, no. 8, 4 April 2008 (2008-04-04), pages 1448-1453, XP019619076, ISSN: 1432-1238 abstract -----	4-17, 29-41
Y	HARDIN J S ET AL: "Pharmacodynamics of a monoclonal antiphenylcyclidine Fab with broad selectivity for phenylcyclidine-like drugs", JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, US, vol. 285, no. 3, 1 June 1998 (1998-06-01), pages 1113-1122, XP002577101, ISSN: 0022-3565 abstract page 1121, right-hand column, paragraph 1 -----	4-17, 29-41
	----- -/--	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/050595

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HURSTING M J ET AL: "Drug-specific Fab therapy in drug overdose", 1 August 1987 (1987-08-01), 19870801, XP002577102, abstract page 697, right-hand column, paragraph 2 -----	4-17, 29-41
Y	COLBURN W A: "Specific antibodies and Fab fragments to alter the pharmacokinetics and reverse the pharmacologic/toxicologic effects of drugs", DRUG METABOLISM REVIEWS, MARCEL DEKKER, NEW YORK, NY, US, vol. 11, no. 2, 1 January 1980 (1980-01-01), pages 223-262, XP002577103, ISSN: 0360-2532 pages 238-252 -----	4-17, 29-41
Y	PENTEL PAUL R ET AL: "DRUG-SPECIFIC ANTIBODIES FOR TRICYCLIC ANTIDEPRESSANT OVERDOSE", TOXICOLOGY LETTERS, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 82-83, 1 December 1995 (1995-12-01), pages 801-806, XP008070621, ISSN: 0378-4274, DOI: 10.1016/0378-4274(95)03596-6 abstract -----	4-17, 29-41
Y	WO 2010/056765 A2 (PORTOLA PHARM INC [US]; LU GENMIN [US]; SINHA UMA [US]) 20 May 2010 (2010-05-20) paragraph [0002] example 12 -----	4-17, 29-41
A	RUSCONI C P ET AL: "RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa", NATURE: INTERNATIONAL WEEKLY JOURNAL OF SCIENCE, NATURE PUBLISHING GROUP, UNITED KINGDOM, vol. 419, 5 September 2002 (2002-09-05), pages 90-94, XP002956811, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE00963 the whole document -----	1-41
X,P	WO 2011/089183 A2 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]; VAN RYN JOANNE [DE]; PARK JOHN EDWARD []) 28 July 2011 (2011-07-28) page 2, line 25 - page 3, line 3 page 7, lines 11-16 page 7, lines 21-22 pages 40-68; examples I-III -----	1-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/050595

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2001051158 A1	13-12-2001	US 2001051158 A1	13-12-2001
		US 2003119083 A1	26-06-2003

WO 2010056765 A2	20-05-2010	AU 2009314153 A1	20-05-2010
		CA 2743496 A1	20-05-2010
		CN 102316893 A	11-01-2012
		EP 2364165 A2	14-09-2011
		KR 20110095317 A	24-08-2011
		US 2010125052 A1	20-05-2010
		WO 2010056765 A2	20-05-2010

WO 2011089183 A2	28-07-2011	US 2012027780 A1	02-02-2012
		UY 33196 A	31-08-2011
		WO 2011089183 A2	28-07-2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2012/050595

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☒ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
			A 6 1 P 7/04	

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

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 フランク・ディットマー

ドイツ40627デュッセルドルフ、ザントシュトラーク4番

(72)発明者 アンヤ・ビュッフミュラー

ドイツ45259エッセン、バーダーヴェーク72アー番

(72)発明者 クリストフ・ゲルデス

ドイツ51063ケルン、デュッセルドルファー・シュトラーク75番

(72)発明者 アドリアン・テルステーゲン

ドイツ42111ヴッパータール、リュベツァールヴェーク8番

(72)発明者 マルク・イエアン・グノート

ドイツ40822メットマン、アム・ハング53番

(72)発明者 ラルス・リンデン

ドイツ40235デュッセルドルフ、ブルッフシュトラーク72番

(72)発明者 アクセル・ハレンガ

ドイツ42115ヴッパータール、ザドヴァシュトラーク17番

(72)発明者 ヨアンナ・グルジンスカーゲーベル

ドイツ10247ベルリン、アン・デン・エルデナー・ヘーフェン37番

(72)発明者 マリオ・イエスケ

ドイツ42699ゾーリンゲン、シュネーバッハー・ヴェーク20番

(72)発明者 マルティナ・シェフェル

ドイツ13465ベルリン、グルネマンツプファット77番

(72)発明者 イェルク・ビルケンフェルト

ドイツ60486フランクフルト・アム・マイン、クアフルシュテンシュトラーク3番

(72)発明者 ホルガー・パウルゼン

ドイツ40724ヒルデン、ディートリッヒーボンヘッファーシュトラーク19番

(72)発明者 リカルダ・フィナーン

ドイツ52074アーヘン、ドライレンダーヴェーク107番

(72)発明者 アンケ・マイヤーバルトシュミット

ドイツ42489ヴェルフラート、ファイルヒェンヴェーク22番

(72)発明者 アンドレア・アイカー

ドイツ41238メンヒェングラートバッハ、ルッケス101番

(72)発明者 ジモーネ・グレフェン

ドイツ 4 1 5 4 1 ドルマゲン、アム・シュネッケナッカー 4 5 番

(72)発明者 ズザンネ・シュタイニヒ

ドイツ 5 0 8 2 9 ケルン、ウンテレ・ドルフシュトラッセ 4 1 アー番

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA01 DA06 DA12 EA04 GA11 HA01

4B064 AG27 BJ12 CA02 CA06 CA19 CC24 DA01

4B065 AA26X AA72X AA90Y AB01 BA02 CA25 CA44

4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 BB41 BB43 BB44 DD62 EE01 GG01

GG02 GG04

4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA24 FA74