【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】令和1年9月5日(2019.9.5)

【公表番号】特表2018-520684(P2018-520684A)
【公表日】平成30年8月2日(2018.8.2)
【年通号数】公開・登録公報2018-029
【出願番号】特願2018-501883(P2018-501883)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/13　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　16/36　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　16/46　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/66　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　1/15　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　1/19　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　1/21　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)
Ｃ１２Ｐ　21/08　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　39/395　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　35/76　(2015.01)
Ａ６１Ｐ　7/02　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　27/02　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　9/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　11/00　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/13
Ｃ０７Ｋ　16/36　ＺＮＡ
Ｃ０７Ｋ　16/46
Ｃ１２Ｎ　15/66　Ｚ
Ｃ１２Ｎ　1/15
Ｃ１２Ｎ　1/19
Ｃ１２Ｎ　1/21
Ｃ１２Ｎ　5/10
Ｃ１２Ｐ　21/08
Ａ６１Ｋ　39/395　Ｎ
Ａ６１Ｋ　48/00
Ａ６１Ｋ　35/76
Ａ６１Ｐ　7/02
Ａ６１Ｐ　43/00　１１１
Ａ６１Ｐ　27/02
Ａ６１Ｐ　9/00
Ａ６１Ｐ　11/00

【手続補正書】
【提出日】令和1年7月19日(2019.7.19)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更
【補正の内容】
【発明の詳細な説明】
【発明の名称】第ＸＩＩａ因子のモノクローナル抗体阻害剤
【技術分野】
【０００１】
（関連出願の相互参照）
本出願は、２０１５年７月２１日に出願された米国仮出願第６２／１９４９５７号、２０１５年１２月３１日に出願された米国仮出願第６２／２７３６５７号、および２０１６年３月３１日に出願された米国仮出願第６２／３１６３１０号の出願日の利益を主張するものである。これらの参照される出願の各内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
第ＸＩＩ因子（ＦＸＩＩ）は、内因系凝固の開始およびプレカリクレインの血漿カリクレイン（ｐＫａｌ）への変換の両方に関与する血漿接触活性化系の成分である。活性ｐＫａｌは高分子キニノーゲン（ＨＭＷＫ）を切断して、浮腫および疼痛の強力な活性化物質であるブラジキニンを放出する。血液凝固の内因系経路の活性化によりフィブリンの生成および血塊（血栓）の形成が生じる。
【発明の概要】
【０００３】
本開示は、第ＸＩＩａ因子（ＦＸＩＩａ）に特異的に結合するが第ＸＩＩ因子（ＦＸＩＩ）に特異的に結合しない複数の抗体の同定に基づく。これらの抗体は、ＦＸＩＩａに対して高い結合親和性を有し（例えば、K_{D}^{app}＜５０ｐＭ）、血漿カリクレインの活性化を上手く減少させ、活性化部分トロンボプラスチン時間（ＡＰＴＴ）を遅らせるがプロトロンビン時間（ＰＴ）には影響を与えなかった。
【０００４】
従って、本開示の一態様は第ＸＩＩａ因子（ＦＸＩＩａ）に結合し、かつ第ＸＩＩ因子（ＦＸＩＩ）には結合しないモノクローナル抗体を特徴とする。いくつかの実施形態では、本抗体は完全長抗体またはＦａｂなどのその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、本抗体はヒト抗体またはヒト化抗体である。
【０００５】
いくつかの実施形態では、本抗体はＦＸＩＩａのＣ鎖中の１つ以上のアミノ酸残基と相互作用する。いくつかの例では、当該アミノ酸残基は、配列番号１２８中のＬ３９０、Ｙ３９１、Ｗ３９２、Ｇ３９３、Ｈ３９４、Ｓ３９５、Ｆ３９６、Ｃ３９７、Ｈ４１２、Ｃ４１３、Ｌ４１４、Ｑ４１５、Ｄ４１６、Ｒ４３２、Ｎ４３３、Ｖ４５６、Ｙ４５８、Ｈ５０７、Ｆ５０９、Ｅ５１０、Ｇ５１１、Ａ５１２、Ｅ５１３、Ｙ５１５、Ｄ５５７、Ａ５５８、Ｃ５５９、Ｑ５６０、Ｇ５６１、Ｄ５６２、Ｓ５６３、Ｉ５８４、Ｓ５８５、Ｗ５８６、Ｇ５８７、Ｓ５８８、Ｇ５８９、Ｃ５９０、Ｇ５９１、Ｄ５９２およびＧ５９７から選択される。いくつかの実施形態では、本抗体は、配列番号１２８の残基３９０～３９７、４１２～４１６、４３２～４３３、４５６～４５８、５０７～５１５、５５７～５６３または５８４～５９２を含むＦＸＩＩａ断片に結合する。
【０００６】
いくつかの例では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体は、（ａ）重鎖相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、重鎖相補性決定領域２（ＣＤＲ２）および重鎖相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域を含む重鎖と、任意に（ｂ）軽鎖ＣＤＲ１、軽鎖ＣＤＲ２および軽鎖ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む軽鎖とを含む。
【０００７】
いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、ＱＲＹＲＧＰＫＹＹＹＹＭＤＶ（配列番号１１１）、ＱＲＹＲＧＰＫＹＹＹＹＭＤＡ（配列番号１１２）またはＱＲＹＲＧＰＲＹＹ

ＹＹＩＤＡ（配列番号１１３）のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３を含む。そのような重鎖可変領域は、式$X_1YX_3MX_5$（配列番号１１７）（式中、X_1はＲ、Ｑ、Ｗ、Ｈ、Ｆ、Ｐ、ＭまたはＮであり、X_3はＩ、Ｖ、Ｔ、Ｈ、ＳまたはＮであり、X_5はＨ、Ｇ、Ｖ、Ａ、Ｒ、Ｑ、Ｙ、Ｌ、ＮまたはＳである）を含む重鎖ＣＤＲ１をさらに含んでいてもよい。いくつかの例では、ＣＤＲ１のX_1はＷまたはＱであり、ＣＤＲ１のX_3はＳまたはＶであり、かつ／またはX_5はＨである。いくつかの例では、重鎖ＣＤＲ１は配列番号４１～７３および１２１のいずれかのアミノ酸配列を含んでいてもよい。

【０００８】

代わりまたは追加として、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体の重鎖可変領域は、式$X_1IX_3PSGX_7X_8TX_{10}YX_{12}$ＤＳＶＫＧ（配列番号１１８）（式中、$X_1$はＳ、Ｒ、Ｖ、ＹまたはＧであり、$X_3$はＹ、Ｗ、ＶまたはＳであり、$X_7$はＧまたはＳであり、$X_8$はＶ、Ｋ、Ｍ、Ｎ、Ｌ、Ｆ、Ａ、Ｉ、Ｓ、ＨまたはＲであり、X_{10}はＫ、Ｒ、Ｔ、Ｑ、Ｓ、Ｎ、ＨまたはＬであり、X_{12}はＡまたはＴである）を含む重鎖ＣＤＲ２をさらに含んでいてもよい。いくつかの例では、ＣＤＲ２のX_1はＶまたはＳであり、ＣＤＲ２のX_3はＹまたはＷであり、ＣＤＲ２のX_7はＧであり、ＣＤＲ２のX_8はＫまたはＨであり、ＣＤＲ２のX_{10}はＲであり、かつ／またはＣＤＲ２のX_{12}はＡである。いくつかの例では、重鎖ＣＤＲ２は配列番号７４～１１０、１２２～１２４および１２７のいずれかのアミノ酸配列を含む。

【０００９】

特定の実施形態では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体の重鎖可変領域は、表１に示されている重鎖ＣＤＲ１、重鎖ＣＤＲ２および重鎖ＣＤＲ３の組み合わせを含む。

【００１０】

いくつかの例では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体の重鎖は、配列番号１～３９および配列番号１２５のいずれかのアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【００１１】

本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体の重鎖のいずれかは重鎖定常領域をさらに含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、重鎖定常領域は野生型対応物と比較した場合に本抗体の半減期を長くする少なくとも１つの突然変異（例えばアミノ酸置換）を含む。そのような突然変異した重鎖定常領域は、例示的な野生型ヒト重鎖定常領域のアミノ酸配列を表す配列番号１１９の位置１４５、１４７または１４９に対応する位置に少なくとも１つの突然変異を含んでいてもよい。少なくとも１つの突然変異はＭ１４５Ｙ、Ｓ１４７Ｔおよび／またはＴ１４９Ｅのアミノ酸置換であってもよい。いくつかの例では、突然変異した重鎖定常領域は、配列番号１１９の位置１４５、１４７および１４９にアミノ酸置換を含む（例えば、Ｍ１４５Ｙ、Ｓ１４７ＴおよびＴ１４９Ｅ）。そのような突然変異した重鎖は配列番号１２０のアミノ酸配列を含んでいてもよい。

【００１２】

本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体の軽鎖可変領域は、ＭＱＡＬＱＴＰＷＴ（配列番号１１６）のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を含んでいてもよい。いくつかの例では、軽鎖可変領域は、ＲＳＳＱＳＬＬＨＳＮＧＹＮＹＬＤ（配列番号１１４）のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１をさらに含んでいてもよい。代わりまたは追加として、軽鎖可変領域は、ＬＧＳＮＲＡＳ（配列番号１１５）のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２をさらに含んでいてもよい。いくつかの例では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体の軽鎖は、配列番号４０または配列番号１２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでいてもよい。

【００１３】

本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体のいずれかは完全長抗体またはその抗原結合断片であってもよい。いくつかの例では、本抗体はヒト抗体またはヒト化抗体であってもよい。

【００１４】

本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体のいずれかをまとめてコードする（例えば、抗体の少なくとも重鎖および軽鎖可変領域をコードする）単離された核酸または核酸セット、核酸または核酸セットを含むベクターまたはベクターセット（例えば発現ベクター）、およびベクターまたはベクターセットを含む宿主細胞または宿主細胞セットも本開示の範囲内である。例示的な宿主細胞としては、限定されるものではないが、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞およびＣＨＯ細胞などの哺乳類細胞が挙げられる。

【００１５】

さらに、本開示は、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体のいずれかを産生する方法を提供する。上記方法は、本抗体をまとめてコードするベクターまたはベクターセットを含む宿主細胞または宿主細胞セットを培養する工程と、本抗体の単離のために培養細胞または培地を回収する工程とを含む。そのような方法は本抗体を培養細胞または培地から単離する工程をさらに含んでもよい。

【００１６】

別の態様では、本開示は、対象における第ＸＩＩ因子に関連する疾患、例えば、接触系活性化に関連する疾患、遺伝性血管浮腫すなわちＨＡＥなどのｐＫａｌシグナル伝達経路に関連する疾患または眼疾患（例えば、黄斑浮腫、糖尿病性網膜症、高血圧性網膜症、加齢性黄斑変性症または網膜静脈閉塞症）の治療方法を提供する。そのような方法は、それを必要とする対象にＦＸＩＩａに結合し、かつＦＸＩＩには結合することができない抗体（例えば、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体のいずれか）、本抗体をまとめてコードする１種以上の核酸またはそのような核酸を含む発現ベクターを含む有効量の組成物を投与する工程を含んでもよい。いくつかの実施形態では、本抗体はＦＸＩＩａの触媒ドメインに特異的に結合する。他の実施形態では、本抗体はＦＸＩのＦＸＩａへの活性化を阻害する。さらに他の実施形態では、本抗体のK_{i}^{app}は約１１０ｐＭよりも低い（例えば、約５０ｐＭまたは１０ｐＭよりも低い）。

【００１７】

本明細書に記載されている方法によって治療される対象は、ｐＫａｌ関連疾患（例えばＨＡＥ）を有するかそれを有する疑いがあるかそのリスクがあるヒトの対象であってもよい。いくつかの例では、対象はＩ型、ＩＩ型もしくはＩＩＩ型ＨＡＥを有するかそれを有する疑いがあるかそのリスクがある。

【００１８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている方法によって治療される対象は、本明細書に開示されている疾患などの第ＸＩＩ因子に関連する疾患（例えば、接触系活性化に関連する疾患）を有するかそれを有する疑いがあるかそのリスクがあるヒトの対象であってもよい。例えば対象は、心房細動に関連する血栓症、深部静脈血栓症（ＤＶＴ）、肺塞栓症、脳卒中または動脈もしくは静脈血栓塞栓イベントを含む血栓症などの接触系活性化に関連する疾患を有するかそれを有する疑いがあるかそのリスクがあってもよい。別の例では、対象はｐＫａｌシグナル伝達経路に関連する疾患、例えばＩ型、ＩＩ型もしくはＩＩＩ型ＨＡＥなどのＨＡＥを有するかそれを有する疑いがあるかそのリスクがあってもよい。さらに別の例では、対象は、黄斑浮腫、糖尿病性網膜症、高血圧性網膜症、加齢性黄斑変性症または網膜静脈閉塞症であり得る眼疾患を有するかそれを有する疑いがあるかそのリスクがあってもよい。

【００１９】

本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体のいずれかと薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物も本開示の範囲内である。そのような医薬組成物は、ｐＫａｌシグナル伝達経路に関連する疾患（例えば、Ｉ型、ＩＩ型もしくはＩＩＩ型ＨＡＥなどのＨＡＥ）を治療するのに使用される医薬組成物、またはそのような疾患を治療するのに使用される薬の製造で使用される医薬組成物であってもよい。

【００２０】

以下の説明では本発明の１つ以上の実施形態の詳細が記載されている。本発明の他の特徴または利点は、いくつかの実施形態の以下の図面および詳細な説明ならびに添付の特許

請求の範囲からも明らかになるであろう。
【００２１】
以下の図面は本明細書の一部をなし、本開示の特定の態様をさらに示すために含まれており、それらは本明細書に提供されている具体的な実施形態の詳細な説明と共に図面を参照することによってさらに理解することができる。
【図面の簡単な説明】
【００２２】
【図１】第ＸＩＩ因子が関与する凝固カスケードを示す概略図である。
【図２】抗体選択戦略を示す概略図である。
【図３】生体外活性アッセイ、血漿活性アッセイおよび結合優先アッセイなどのＦＸＩＩａ阻害剤の活性を特徴づけるために使用されるバイオアッセイを示す概略図である。
【図４】ヒトＦＸＩＩａ（左のパネル）およびマウスＦＸＩＩａ（右のパネル）に対する親抗体５５９Ｃ－Ｍ７１－Ｆ０６（ヒトＩｇＧ１抗体）の阻害活性を示す図である。
【図５】ＡＰＴＴによって決定されるＭ７１－Ｆ０６の種間交差反応を示す図である。
【図６】抗ＦＸＩＩａ抗体の注射後の様々な時点におけるラットの血漿中の例示的な抗ＦＸＩＩａ抗体Ｍ１９１－Ｅ０９およびＭ１９２－Ｈ１１の濃度を示す。
【図７】抗ＦＸＩＩａ抗体５５９Ｃ－Ｘ２１１－Ａ０１（Ａ０１）の存在下でのＡＰＴＴおよびＰＴの延長（秒）の経時的変化を示すチャートである。Ａ：１０ｍｇ／ｋｇのＡ０１後のＡＰＴＴ動態。Ｂ：１０ｍｇ／ｋｇのＡ０１の存在下でのベースラインに対するＡＰＴＴの経時的変化。Ｃ：１０ｍｇ／ｋｇのＡ０１の存在下でのＰＴ（秒）の経時的変化。
【図８】指示された治療薬の投与前の指示された時点（薬物前、灰色の棒）、当該研究開始の５分前（研究前、黒色の棒）および当該研究終了の５分前（研究後、白色の棒）における抗体ＤＸ－４０１２のＡＰＴＴ活性を示す図である。値は平均ＡＰＴＴ±標準誤差（秒）を示す。Ａ：ＡＰＴＴ時間。Ｂ：ベースライン値に対するＡＰＴＴの倍数増加（対照研究日数に対する同じ動物における研究前および研究後の測定値の平均）。
【図９】指示された治療薬の投与前の指示された時点（薬物前、灰色の棒）、当該研究開始の５分前（研究前、黒色の棒）および当該研究終了の５分前（研究後、白色の棒）における抗体ＤＸ－４０１２のＰＴ活性を示す図である。値は平均ＰＴ±標準誤差（秒）を示す。Ａ：ＰＴ時間。Ｂ：ベースライン値に対するＰＴの倍数増加（対照研究日数に対する同じ動物における研究前および研究後の測定値の平均）。
【図１０】非ヒト霊長類における血栓症研究中の慢性動静脈（ＡＶ）シャントの外部ループの概略図である。血小板沈着のリアルタイム測定のために外部ループがガンマカメラの上まで引き延ばされている。
【図１１】コラーゲン被覆したグラフトにおける血小板沈着の経時的変化を示すチャートである。Ａ：血栓頭部。Ｂ：血栓尾部。
【図１２】コラーゲン被覆したグラフトにおける血小板沈着の経時的変化を示すチャートである。
【図１３】コラーゲン被覆したグラフトにおける血小板沈着（総血栓）の経時的変化を示すチャートである。
【図１４】５分間隔で血小板沈着として測定したコラーゲン被覆したグラフトにおける血栓増加率を示すチャートである。
【図１５】組織因子被覆したグラフトにおける血小板沈着の経時的変化を示すチャートである。Ａ：血栓頭部。Ｂ：血栓尾部。
【図１６】組織因子被覆したグラフトにおける血小板沈着の経時的変化を示すチャートである。
【図１７】組織因子被覆したグラフトにおける血小板沈着の経時的変化を示すチャートである。
【図１８】５分間隔で血小板沈着として測定した組織因子被覆したグラフトにおける血栓増加率を示すチャートである。

【図１９】コラーゲン被覆したグラフト（灰色の棒）および組織因子被覆したグラフト（白色の棒）における血栓全体（頭部および尾部）の末端フィブリン含有量および血小板沈着を示す図である。Ａ：血小板沈着。Ｂ：フィブリン含有量。
【図２０】ＳＥＣ分析によるＤＸ－４０１２のＦａｂ断片とＦＸＩＩａとの複合体形成を示すチャートである。Ａ：ＦＸＩＩａおよびＦａｂ。Ｂ：ＦＸＩＩａ、Ｆａｂおよび５０μＭのＦＸＩＩａと３０μＭのＦａｂとのＦＸＩＩａ－Ｆａｂ複合体。Ｃ：ＦＸＩＩａ、Ｆａｂおよび５０μＭのＦＸＩＩａと４０μＭのＦａｂとのＦＸＩＩａ－Ｆａｂ複合体。Ｄ：ＦＸＩＩａ、Ｆａｂおよび５０μＭのＦＸＩＩａと５０μＭのＦａｂとのＦＸＩＩａ－Ｆａｂ複合体。Ｅ：ＦＸＩＩａ、Ｆａｂおよび５０μＭのＦＸＩＩａと６０μＭのＦａｂとのＦＸＩＩａ－Ｆａｂ複合体。
【図２１】ヒトＦＸＩＩａに対する抗ＦＸＩＩａ抗体Ｍ１９２－Ｈ１１の阻害活性を示す図である。
【図２２】ＤＸ－４０１２に関連する止血測定を示すチャートである。Ａ：出血時間。Ｂ：出血体積。
【発明を実施するための形態】
【００２３】
接触系の成分は凝固の内因系経路を開始し、炎症誘発性ペプチドであるブラジキニンの放出により炎症を促進する。ハーゲマン因子としても知られている第ＸＩＩ因子（ＦＸＩＩ）は、凝固の内因系経路の活性化ならびにカリクレイン・キニン系に関与するセリンプロテアーゼである。ＦＸＩＩは陰性荷電表面（例えば、ポリアニオン系表面、ガラス、ポリリン酸塩、エラグ酸）によって活性化されて活性型ＦＸＩＩａになる。活性化型のＦＸＩＩａは、プレカリクレインを切断して活性ｐＫａｌを産生する能力を有する。その後、活性化ｐＫａｌはＦＸＩＩを切断してＦＸＩＩａにすることができ、ＦＸＩＩａがさらに多くのｐＫａｌを産生する正のフィードバックループが生じ、これによりさらなるＦＸＩＩを活性化させてＦＸＩＩａにする。活性化ｐＫａｌは高分子キニノーゲン（ＨＭＷＫ）を切断してブラジキニンを放出することもできる。ＦＸＩＩが関与する凝固カスケードが図１に示されている。
【００２４】
ＨＡＥなどの接触系活性化に関連する疾患では、上昇したレベルのブラジキニンは浮腫性ＨＡＥ発作を引き起こす血管拡張および炎症を誘発することができる。従って、接触系の活性化によって潜在的に媒介される様々な疾患を治療するための新規な治療薬を開発することが望まれている。
【００２５】
ＦＸＩＩａに結合して阻害する抗体ならびにＦＸＩＩａの阻害および接触系活性化に関連する疾患の治療におけるその使用が本明細書に記載されている。以下の実施例に示されているように、複数の例示的な抗ＦＸＩＩａ抗体が産生され、ＦＸＩＩａに特異的に結合してその活性を阻害することが分かった。本明細書に例示されているそのような抗体は、接触系活性化に関連する疾患の治療、特に病徴に関連するブラジキニン産生、血管拡張および病的血栓形成の減少において高い治療効果を示すことが期待される。
【００２６】
ＦＸＩＩａへの抗体の結合
本開示は、ＦＸＩＩａ、例えばＦＸＩＩａの触媒ドメインに結合する抗体を提供する。そのような抗体はＦＸＩＩに結合することはできない。
【００２７】
抗体（複数形も互換可能に使用）は、免疫グロブリン分子の可変領域に位置する少なくとも１つの抗原認識部位を介して炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチドなどの標的に特異的に結合することができる免疫グロブリン分子である。本明細書で使用される「抗体」という用語は、そのままの（すなわち完全長）ポリクローナルもしくはモノクローナル抗体だけでなく、その抗原結合断片（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖなど）、一本鎖（ｓｃＦｖ）、それらの突然変異体、抗体の一部を含む融合タンパク質、

ヒト化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ナノボディ、直鎖抗体、一本鎖抗体、多特異性抗体（例えば二重特異性抗体）ならびに必要な特異性を有する抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子のあらゆる他の修正された構成、例えば、抗体のグリコシル化変異体、抗体のアミノ酸配列変異体および共有結合的に修正された抗体なども包含する。抗体はＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、ＩｇＡまたはＩｇＭ（あるいはそれらのサブクラス）などのあらゆるクラスの抗体を含み、本抗体はどの特定のクラスのものであってもよい。その重鎖の定常領域の抗体アミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンを異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンの５つの主要なクラス、すなわちＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭがあり、これらのいくつかをサブクラス（アイソタイプ）、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２にさらに分けることができる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常領域をそれぞれα、δ、ε、γおよびμと呼ぶ。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および３次元構成は周知である。

【００２８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体は、ＦＸＩＩａに結合してその活性を少なくとも５０％（例えば、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％またはそれ以上）阻害することができる。阻害能力の尺度を提供する見かけの阻害定数（K_i^{app}または$K_{i,app}$）は、酵素活性を低下させるのに必要な阻害剤濃度に関係し、かつ酵素濃度には依存しない。本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体の阻害活性は当該技術分野で知られている通常の方法によって決定することができる。

【００２９】

反応の程度（例えば酵素活性）に対する異なる濃度の本抗体の阻害効果を測定することによって抗体のK_i^{app}値を決定してもよく、阻害剤濃度の関数として擬一次速度定数（ｖ）における変化を修正されたモリソン式（式１）に当てはめて、見かけのK_i値の推定を得る。競合的阻害剤では、基質濃度に対するK_i^{app}のプロットの線形回帰分析から引き出されるｙ切片からK_i^{app}を得ることができる。

【数１】

$$v = A \cdot \frac{([E]-[I]-K_i^{app}) + \sqrt{\left([E]-[I]-K_i^{app}\right)^2 + 4[E]\cdot K_i^{app}}}{2} \qquad \text{（式１）}$$

【００３０】

式中、Ａは、阻害剤（Ｉ）の非存在下での酵素反応の初速度（v_o）を総酵素濃度（Ｅ）で割ったv_o／Ｅに等しい。

【００３１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体は、標的抗原または抗原エピトープに対して１０００、９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００、２００、１００、５０、４０、３０、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５ｐＭまたはそれ以下のK_i^{app}値を有していてもよい。いくつかの実施形態では、抗ＦＸＩＩａ抗体は第２の標的（例えばＦＸＩＩ）と比較して第１の標的（例えばＦＸＩＩａ）に対してより低いK_i^{app}を有していてもよい。K_i^{app}における差（例えば、特異性または他の比較のため）は、少なくとも１．５、２、３、４、５、１０、１５、２０、３７．５、５０、７０、８０、９１、１００、５００、１０００、１０，０００または10^5倍であってもよい。いくつかの例では、抗ＦＸＩＩａ抗体は、第２の抗原（例えば、第２の立体構造の同じ第１のタンパク質もしくはその模倣体または第２のタンパク質）と比較して第１の抗原（例えば、第１の立体構造の第１のタンパク質もしくはその模倣体）をより良好に阻害する。いくつかの実施形態では、抗ＦＸＩＩａ抗体のいずれかをさらに親和性成熟させて標的抗原またはその抗原エピトープに対する本抗体のK_i^{app}を低下させてもよい。

【００３２】

本明細書に記載されている抗体は、マウス、ラット、ヒトまたはあらゆる他の生物に由来していてもよい（キメラもしくはヒト化抗体を含む）。そのような抗体は天然に生じない、すなわちヒトの行為（例えば、そのような動物の所望の抗原またはその断片による免疫）なしで動物において産生されない。

【００３３】

本明細書に記載されている抗体のいずれかはモノクローナルまたはポリクローナルのいずれであってもよい。「モノクローナル抗体」とは均質な抗体集団を指し、「ポリクローナル抗体」とは不均質な抗体集団を指す。これらの２つの言葉は抗体の供給源またはその作製方法を限定しない。

【００３４】

一例では、本明細書に記載されている方法で使用される抗体はヒト化抗体である。ヒト化抗体とは、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含む特異的なキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその抗原結合断片である非ヒト（例えばマウスの）抗体の形態を指す。大抵の場合、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（ＣＤＲ）からの残基が所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト生物種（ドナー抗体）のＣＤＲからの残基で置換されているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク領域（ＦＲ）残基は対応する非ヒト残基で置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体の中または移入されたＣＤＲまたはフレームワーク配列の中にも存在しないが、抗体性能をさらに改良および最適化するために含められる残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、ＣＤＲ領域の全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのそれらに対応し、かつＦＲ領域の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のそれらに対応する少なくとも１つ、典型的には２つの可変領域の実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部（Ｆｃ）、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部も含むと最適である。抗体は国際公開第９９／５８５７２号に記載されているように修正されたＦｃ領域を有していてもよい。他の形態のヒト化抗体は元の抗体に対して変更された１つ以上（１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ）のＣＤＲを有し、これらは元の抗体からの１つ以上のＣＤＲに「由来する」１つ以上のＣＤＲとも呼ばれる。ヒト化抗体は親和性成熟を含んでいてもよい。

【００３５】

別の例では、本明細書に記載されている抗体は、ヒト抗体からの重鎖定常領域および軽鎖定常領域を含むことができるキメラ抗体である。キメラ抗体とは、第１の生物種からの可変領域または可変領域の一部と第２の生物種からの定常領域とを有する抗体を指す。典型的には、これらのキメラ抗体では、軽鎖および重鎖の両方の可変領域は哺乳類種の１種（例えば、マウス、ウサギおよびラットなどの非ヒト哺乳類）由来の抗体の可変領域を模倣しているが、その定常部分はヒトなどの別の哺乳類由来の抗体の配列に相同である。いくつかの実施形態では、可変領域および／または定常領域においてアミノ酸修飾を行うことができる。

【００３６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体は、対応する標的抗原またはそのエピトープに特異的に結合する。抗原またはエピトープに「特異的に結合する」抗体は当該技術分野においてよく理解されている用語である。分子は他の標的と反応する場合よりも頻繁かつ速く、より長い持続期間および／またはより高い親和性で特定の標的抗原と反応する場合に「特異的な結合」を示すと言われる。抗体は他の物質に結合する場合よりも高い親和性および結合活性で、より容易かつ／またはより長い持続期間で結合する場合に標的抗原またはエピトープに「特異的に結合する」。例えば、抗原（ＦＸＩＩａ）またはその中の抗原エピトープに特異的（または優先的）に結合する抗体は、他の抗原または同じ抗原の他のエピトープに結合する場合よりも高い親和性および結合活性で、より容易かつ／またはより長い持続期間でこの標的抗原に結合する抗体である。この定義により、例えば第１の標的抗原に特異的に結合する抗体は第２の標的抗原に特異的

または優先的に結合しても結合しなくてもよいということも理解される。従って、「特異的に結合」または「優先的な結合」は必ずしも排他的な結合を必要とするものではない（但し、排他的な結合を含むことはできる）。いくつかの例では、標的抗原またはそのエピトープに「特異的に結合する」抗体は、他の抗原または同じ抗原の他のエピトープに結合しなくてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗体はＦＸＩＩａに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗体はＦＸＩＩａに特異的に結合し、かつＦＸＩＩに結合しない。

【００３７】

本明細書で使用される「第ＸＩＩａ因子」または「ＦＸＩＩａ」という用語は第ＸＩＩ因子の活性型を指し、「第ＸＩＩ因子」または「ＦＸＩＩ」という用語は第ＸＩＩ因子プロ酵素すなわち酵素前駆体（不活性型）を指す。ＦＸＩＩは約８０ｋＤの分子量を有する一本鎖糖タンパク質である。ＦＸＩＩは活性化されると、ジスルフィド結合によって保持されている２種類の鎖、すなわち重鎖（ヒトＦＸＩＩａ重鎖の３５３個の残基）および軽鎖（ヒトＦＸＩＩａ軽鎖の２４３個の残基）を含む活性型ＦＸＩＩａに変換される。ヒトＦＸＩＩは遺伝子Ｆ１２によってコードされる。ヒトＦＸＩＩのアミノ酸配列は当該技術分野において周知である（例えば、ジェンバンク受入番号ＮＰ＿０００４９６．２）。

【００３８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体は標的抗原（例えばＦＸＩＩａ）またはその抗原エピトープに対して好適な結合親和性を有する。本明細書で使用される「結合親和性」は、見かけの結合定数すなわちK_Aを指す。K_Aは解離定数（K_D）の逆数である。本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体は、標的抗原または抗原エピトープに対して少なくとも10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}Ｍまたはそれよりも低い結合親和性（K_D）を有していてもよい。結合親和性の増加はK_Dの低下に一致する。第２の抗原と比較して第１の抗原に対する抗体のより高い親和性結合は、第２の抗原に結合するためのK_A（または数値K_D）よりも高い第１の抗原に結合するためのK_A（またはより小さい数値K_D）によって示すことができる。そのような場合、本抗体は、第２の抗原（例えば、第２の立体構造の同じ第１のタンパク質もしくはその模倣体または第２のタンパク質）と比較して第１の抗原（例えば、第１の立体構造の第１のタンパク質もしくはその模倣体）に対して特異性を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体は、ＦＸＩＩ酵素前駆体またはｐＫａｌシグナル伝達系における別のタンパク質に対する結合親和性と比較した場合にＦＸＩＩａに対してより高い結合親和性（より高いK_Aまたはより小さいK_D）を有する。結合親和性における差（例えば、特異性または他の比較のため）は、少なくとも１．５、２、３、４、５、１０、１５、２０、３７．５、５０、７０、８０、９１、１００、５００、１０００、１０，０００または10^5倍であってもよい。いくつかの実施形態では、抗ＦＸＩＩａ抗体のいずれかは、本抗体の標的抗原またはその抗原エピトープへの結合親和性を高めるためにさらに親和性成熟されていてもよい。

【００３９】

結合親和性（または結合特異性）は、平衡透析、平衡結合、ゲル濾過、ＥＬＩＳＡ、表面プラズモン共鳴または分光法（例えば蛍光アッセイを用いる）などの様々な方法によって決定することができる。結合親和性を評価するための例示的な条件は、ＨＢＳ－Ｐ緩衝液（１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）、１５０ｍＭのＮａＣｌ、０．００５％（ｖ／ｖ）の界面活性剤Ｐ２０）中である。これらの技術を使用して、標的タンパク質濃度の関数として結合されている結合タンパク質の濃度を測定することができる。以下の方程式によれば、結合されている結合タンパク質（［Ｂｏｕｎｄ］）の濃度は一般に遊離している標的タンパク質（［Ｆｒｅｅ］）の濃度に関係している。

［Ｂｏｕｎｄ］＝［Ｆｒｅｅ］／（Ｋｄ＋［Ｆｒｅｅ］）

【００４０】

但し、K_Aの正確な決定を行うことは必ずしも必要ではなく、その理由は、例えばＥＬＩＳＡまたはＦＡＣＳ分析などの方法を用いて測定される親和性の定量的測定値を得るだ

けで十分な場合もあり、それはK_Aに比例するため、より高い親和性が例えば２倍より高いか否かの決定などの比較のためにそれを使用して、例えば機能的アッセイ、例えば生体外または生体内アッセイにおける活性によって親和性の定性的測定値を得ることや親和性の推論を得ることができるからである。

【００４１】

いくつかの実施形態では、抗ＦＸＩＩａ抗体は、重鎖ＣＤＲ１、重鎖ＣＤＲ２および重鎖ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域を含む重鎖を含む。場合によっては、重鎖ＣＤＲ３領域は配列番号１１１、１１２または１１３のアミノ酸配列（表１を参照）を含む。本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体のいずれかの重鎖可変領域は、本明細書に記載されている式$X_1YX_3MX_5$を含むＣＤＲ１領域（配列番号１１７）および／または同様に本明細書に記載されている式$X_1IX_3PSGX_7X_8TX_{10}YX_{12}$ＤＳＶＫＧを含むＣＤＲ２領域（配列番号１１８）をさらに含んでいてもよい。いくつかの例では、抗ＦＸＩＩａ抗体は、配列番号４１～７３および１２１（表１を参照）から選択される重鎖ＣＤＲ１領域および／または配列番号７４～１１０および１２２～１２４から選択されるＣＤＲ２領域を含む。いくつかの特定の例では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体の重鎖可変領域は配列番号１～３９のいずれかのアミノ酸配列を含む。

【００４２】

表１は、例示的な抗ＦＸＩＩａ抗体の重鎖ＣＤＲのアミノ酸配列を示す。例示的な抗ＦＸＩＩａ抗体と同じ重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３領域を有する抗体も本開示の範囲内である。

【表１】

抗ＦＸＩＩａ抗体の重鎖ＣＤＲ配列

例示的な抗体	CDR1	CDR2	CDR3
M0191-E09	WYSMH (配列番号41)	VIYPSGGKTRYADSVKG (配列番号74)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0192-H11	QYVMH (配列番号42)	SIWPSGGHTRYADSVKG (配列番号75)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0184-F12	WYVMH (配列番号43)	GIWPSGGRTKYADSVKG (配列番号76)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0292-D07	NYVMH (配列番号44)	SIWPSGGKTKYADSVKG (配列番号77)	QRYRGPKYYYYMDA (配列番号112)
M0182-D04	MYTMN (配列番号45)	RIYPSGGKTLYADSVKG (配列番号78)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)

M0192-F07	QYVMS (配列番号46)	RIYPSGGVTKYADSVKG (配列番号79)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0183-C03	WYNMH (配列番号47)	YISPSGGKTKYTDSVKG (配列番号80)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0183-H08	RYIMH (配列番号48)	SIYPSGGVTKYADSVKG (配列番号81)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0183-D08	RYIMG (配列番号49)	SIYPSGGVTRYADSVKG (配列番号82)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0192-G03	QYNMV (配列番号50)	RIWPSGGKTTYADSVKG (配列番号83)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0310-C06	RYVMV (配列番号51)	RIYPSGGMTQYADSVKG (配列番号84)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0192-F01	WYNMA (配列番号52)	RIYPSGGMTQYADSVKG (配列番号84)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0191-A03	QYIMH (配列番号53)	SIYPSGGNTKYADSVKG (配列番号85)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0192-A01	HYVMH (配列番号54)	SIYPSGGLTKYADSVKG (配列番号86)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0191-H10	WYTMH (配列番号55)	SIYPSGGFTRYADSVKG (配列番号87)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0177-C12	FYHMH (配列番号56)	RIVPSGGMTRYADSVKG (配列番号88)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0184-B04	FYSMH (配列番号57)	RIYPSGGVTKYADSVKG (配列番号89)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0308-H03	QYVMH (配列番号58)	SIWPSGGKTTYADSVKG (配列番号90)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0192-D02	QYVMH (配列番号58)	SIWPSGGFTKYADSVKG (配列番号91)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0310-G07	FYNMH (配列番号59)	SIYPSGGVTRYADSVKG (配列番号92)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0192-F06	WYVMH (配列番号43)	SIYPSGGKTSYADSVKG (配列番号93)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0310-A04	PYIMH (配列番号60)	VIYPSGSKTNYADSVKG (配列番号94)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0310-F02	RYTMR (配列番号61)	SIWPSGGMTRYADSVKG (配列番号95)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0310-B09	QYVMH NO: 58)	SIYPSGGLTRYADSVKG (配列番号96)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0310-G06	WYIMG (配列番号62)	YIYPSGGNTRYADSVKG (配列番号97)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0182-H01	RYVMH (配列番号63)	SIWPSGGMTKYADSVKG (配列番号98)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0178-A08	FYIMG (配列番号64)	RIYPSGGATQYADSVKG (配列番号99)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0184-D01	FYVMG (配列番号65)	RIYPSGGLTQYADSVKG (配列番号100)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0177-A06	FYSMH (配列番号66)	RIYPSGGITSYADSVKG (配列番号101)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)

M0191-E04	MYIMH (配列番号67)	SIYPSGGMTKYADSVKG (配列番号102)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0191-H09	MYVMH (配列番号68)	SIYPSGGLTKYADSVKG (配列番号103)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0192-H04	QYVMH (配列番号58)	RIYPSGGLTNYADSVKG (配列番号104)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0192-A03	WYVMQ (配列番号69)	SIYPSGGMTKYADSVKG (配列番号102)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0310-G08	WYIMG (配列番号62)	RIYPSGGSTHYADSVKG (配列番号105)	QRYRGPRYYYYIDA (配列番号113)
M0192-G05	QYTMV (配列番号70)	RIYPSGGVTQYADSVKG (配列番号106)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0183-B12	WYVMY (配列番号71)	RIYPSGGITHYADSVKG (配列番号107)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0308-F04	FYVML (配列番号72)	SIWPSGGVTKYADSVKG (配列番号108)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0182-B04	WYVMQ (配列番号69)	YIYPSGGHTKYADSVKG (配列番号109)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
M0310-F04	RYSMN (配列番号73)	GIYPSGGKTKYADSVKG (配列番号110)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)
X211-A01 (DX-4012)	QYVMH (配列番号58)	SIWPSGGHTRYADSVKG (配列番号75)	QRYRGPKYYYYMDV (配列番号111)

【００４３】

表１に列挙されている例示的な抗ＦＸＩＩａ抗体の重鎖可変領域が以下に示されている（ＣＤＲ領域は太字で示されている）。他の実施形態では、抗ＦＸＩＩａ抗体のHC CDR1はＱＹＳＭＨ（配列番号１２１）であってもよく、これは配列番号７４のHC CDR2および／または配列番号１１１のHC CDR3との組み合わせであってもよい。さらに他の実施形態では、抗ＦＸＩＩａ抗体のHC CDR2はＳＩＹＰＳＧＧＫＴＲＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１２２）、ＶＩＷＰＳＧＧＫＴＲＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１２３）またはＶＩＹＰＳＧＧＨＴＲＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１２４）であってもよく、これは配列番号４１のHC CDR1および／または配列番号１１１のHC CDR3との組み合わせであってもよい。さらに別の実施形態では、抗ＦＸＩＩａ抗体のHC CDR2はＳＩＷＰＳＧＧＨＴＲＹＡＤＳＶＨＧ（配列番号１２７）であってもよく、これは配列番号５８のHC CDR1および／または配列番号１１１のHC CDR3との組み合わせであってもよい。

Ｍ０１９１－Ｅ０９の重鎖可変領域配列（配列番号１）：

【化１】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**WYSMH**WVRQAPGKGLEWVS**VIYPSGGKTRYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１９２－Ｈ１１の重鎖可変領域配列（配列番号２）：

【化２】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**QYVMH**WVRQAPGKGLEWVS**SIWPSGGHTRYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１８４－Ｆ１２の重鎖可変領域配列（配列番号３）：

【化３】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**WYVMH**WVRQAPGKGLEWVS**GIWPSGGRTKYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０２９２－Ｄ０７の重鎖可変領域配列（配列番号４）：

【化４】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**NYVMH**WVRQAPGKGLEWVS**SIWPSGGKTKYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDA**WGQGTTVTVSS

Ｍ０１８２－Ｄ０４の重鎖可変領域配列（配列番号５）：

【化５】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**MYTMN**WVRQAPGKGLEWVS**RIYPSGGKTLYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ１９２－Ｆ０７の重鎖可変領域配列（配列番号６）：

【化６】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**QYVMS**WVRQAPGKGLEWVS**RIYPSGGVTKYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１８３－Ｃ０３の重鎖可変領域配列（配列番号７）：

【化７】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**WYNMH**WVRQAPGKGLEWVS**YISPSGGKTKYTDSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１８３－Ｈ０８の重鎖可変領域配列（配列番号８）：

【化８】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**RYIMH**WVRQAPGKGLEWVS**SIYPSGGVTKYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１８３－Ｄ０８の重鎖可変領域配列（配列番号９）：

【化９】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**RYIMG**WVRQAPGKGLEWVS**SIYPSGGVTRYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１９２－Ｇ０３の重鎖可変領域配列（配列番号１０）：

【化１０】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**QYNMV**WVRQAPGKGLEWVS**RIWPSGGKTTYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０３１０－Ｃ０６の重鎖可変領域配列（配列番号１１）：

【化１１】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**RYVMV**WVRQAPGKGLEWVS**RIYPSGGMTQYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１９２－Ｆ０１の重鎖可変領域配列（配列番号１２）：

【化１２】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**WYNMA**WVRQAPGKGLEWVS**RIYPSGGMTQYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１９１－Ａ０３の重鎖可変領域配列（配列番号１３）：

【化１３】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**QYIMH**WVRQAPGKGLEWVS**SIYPSGGNTKYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１９２－Ａ０１の重鎖可変領域配列（配列番号１４）：

【化１４】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**HYVMH**WVRQAPGKGLEWVS**SIYPSGGLTKYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１９１－Ｈ１０の重鎖可変領域配列（配列番号１５）：
【化１５】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**WYTMH**WVRQAPGKGLEWVS**SIYPSGGFTRYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１７７－Ｃ１２の重鎖可変領域配列（配列番号１６）：
【化１６】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**FYHMH**WVRQAPGKGLEWVS**RIVPSGGMTRYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１８４－Ｂ０４の重鎖可変領域配列（配列番号１７）：
【化１７】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**FYSMH**WVRQAPGKGLEWVS**RIYPSGGVTKYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０３０８－Ｈ０３の重鎖可変領域配列（配列番号１８）：
【化１８】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**QYVMH**WVRQAPGKGLEWVS**SIWPSGGKTTYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１９２－Ｄ０２の重鎖可変領域配列（配列番号１９）：
【化１９】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**QYVMH**WVRQAPGKGLEWVS**SIWPSGGFTKYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０３１０－Ｇ０７の重鎖可変領域配列（配列番号２０）：
【化２０】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**FYNMH**WVRQAPGKGLEWVS**SIYPSGGVTRYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１９２－Ｆ０６の重鎖可変領域配列（配列番号２１）：
【化２１】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**WYVMH**WVRQAPGKGLEWVS**SIYPSGGKTSYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０３１０－Ａ０４の重鎖可変領域配列（配列番号２２）：
【化２２】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**PYIMH**WVRQAPGKGLEWVS**VIYPSGSKTNYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０３１０－Ｆ０２の重鎖可変領域配列（配列番号２３）：
【化２３】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**RYTMR**WVRQAPGKGLEWVS**SIWPSGGMTRYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGQGTTVTVSS

Ｍ０３１０－Ｂ０９の重鎖可変領域配列（配列番号２４）：

【化２４】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**QYVMH**WVRQAPGKGLEWVS**SIYPSGGLTRYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGQGTTVTVSS

Ｍ０３１０－Ｇ０６の重鎖可変領域配列（配列番号２５）：
【化２５】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**WYIMG**WVRQAPGKGLEWVS**YIYPSGGNTRYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１８２－Ｈ０１の重鎖可変領域配列（配列番号２６）：
【化２６】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**RYVMH**WVRQAPGKGLEWVS**SIWPSGGMTKYADSVKG**RFTISRDNSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１７８－Ａ０８の重鎖可変領域配列（配列番号２７）：
【化２７】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**FYIMG**WVRQAPGKGLEWVS**RIYPSGGATQYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１８４－Ｄ０１の重鎖可変領域配列（配列番号２８）：
【化２８】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**FYVMG**WVRQAPGKGLEWVS**RIYPSGGLTQYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１７７－Ａ０６の重鎖可変領域配列（配列番号２９）：
【化２９】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**FYSMH**WVRQAPGKGLEWVS**RIYPSGGITSYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１９１－Ｅ０４の重鎖可変領域配列（配列番号３０）：
【化３０】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**MYIMH**WVRQAPGKGLEWVS**SIYPSGGMTKYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１９１－Ｈ０９の重鎖可変領域配列（配列番号３１）：
【化３１】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**MYVMH**WVRQAPGKGLEWVS**SIYPSGGLTKYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１９２－Ｈ０４の重鎖可変領域配列（配列番号３２）：
【化３２】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**QYVMH**WVRQAPGKGLEWVS**RIYPSGGLTNYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１９２－Ａ０３の重鎖可変領域配列（配列番号３３）：
【化３３】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**WYVMQ**WVRQAPGKGLEWVS**SIYPSGGMTKYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０３１０－Ｇ０８の重鎖可変領域配列（配列番号３４）：

【化３４】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**WYIMG**WVRQAPGKGLEWVS**RIYPSGGSTHYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPRYYYYIDA**WGQGTTVTVSS

Ｍ０１９２－Ｇ０５の重鎖可変領域配列（配列番号３５）：
【化３５】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**QYTMV**WVRQAPGKGLEWVS**RIYPSGGVTQYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１８３－Ｂ１２の重鎖可変領域配列（配列番号３６）：
【化３６】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**WYVMY**WVRQAPGKGLEWVS**RIYPSGGITHYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０３０８－Ｆ０４の重鎖可変領域配列（配列番号３７）：
【化３７】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**FYVML**WVRQAPGKGLEWVS**SIWPSGGVTKYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０１８２－Ｂ０４の重鎖可変領域配列（配列番号３８）：
【化３８】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**WYVMQ**WVRQAPGKGLEWVS**YIYPSGGHTKYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｍ０３１０－Ｆ０４の重鎖可変領域配列（配列番号３９）：
【化３９】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**RYSMN**WVRQAPGKGLEWVS**GIYPSGGKTKYADSVKG**RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

Ｘ２１１－Ａ０１の重鎖可変領域配列（配列番号１２５）
【化４０】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**QYVMH**WVRQAPGKGLEWVS**SIWPSGGHTRYADSVKG**RFTISRD
NSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**QRYRGPKYYYYMDV**WGKGTTVTVSS

【００４４】
本開示は、本明細書に開示されている例示的な抗ＦＸＩＩａ抗体のいずれかの生殖系列変異体も提供する。生殖系列変異体は、対応する生殖系列配列に対するその親抗体と比較した場合、フレームワーク領域に１つ以上の突然変異を含む。生殖系列変異体を作製するために、抗体生殖系列配列データベース（例えば、ｗｗｗ．ｂｉｏｉｎｆｏ．ｏｒｇ．ｕｋ／ａｂｓ／、ｗｗｗ．ｖｂａｓｅ２．ｏｒｇまたはｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ）への問い合わせとして親抗体の重鎖もしくは軽鎖可変領域配列またはその一部（例えばフレームワーク配列）を使用して、親抗体によって使用される対応する生殖系列配列および生殖系列配列と親抗体との間のフレームワーク領域の１つ以上におけるアミノ酸残基変異を同定することができる。次いで、生殖系列配列に基づいて１つ以上のアミノ酸置換を親抗体に導入して生殖系列変異体を作製することができる。例として、クローンＸ２１１－Ａ０１（ＤＸ－４０１２）はクローンＭ１９２－Ｈ１１の生殖系列変異体である。本明細書に記載されているように、抗ＦＸＩＩａ抗体は、限定されるものではないが、そのままの（すなわち完全長）抗体、その抗原結合断片（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖなど）および一本鎖抗体などのあらゆる抗体の形態であってもよい。
【００４５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体のいずれかの重鎖は、重鎖定常領域（ＣＨ）またはその一部（例えば、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３またはそれらの組み合わせ）をさらに含んでいてもよい。重鎖定常領域は、あらゆる好適な生物、例えば、ヒト、マウス、ラットまたはウサギに由来していてもよい。１つの特定の例では、重鎖定常領域はヒトＩｇＧ（γ重鎖）からのものである。１つの例示的なヒト重鎖定常領域が以下に示されている（配列番号１１９）。

【化４１】

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
PSVFLFPPKP KDTL**M**I**S**R**T**P EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

【００４６】

太字および下線で示されている残基は、突然変異を導入してＦｃＲｎ結合を強め、よって血清半減期を長くすることができる残基を表す。

【００４７】

いくつかの実施形態では、抗ＦＸＩＩａ抗体は配列番号１１９の重鎖定常領域を含む。あるいは、本明細書に記載されている抗体の重鎖定常領域は、単一のドメイン（例えば、ＣＨ１、ＣＨ２またはＣＨ３）あるいは定常領域（例えば配列番号１１９）の単一のドメインのいずれかの組み合わせを含んでいてもよい。

【００４８】

必要に応じて、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体は修正された定常領域を含んでいてもよい。例えば、本抗体は、免疫学的に不活性であり、例えば補体媒介性溶解を引き起こさず、あるいは抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を刺激しない修正された定常領域を含んでいてもよい。ＡＤＣＣ活性は米国特許第５，５００，３６２号に開示されている方法を用いて評価することができる。他の実施形態では、定常領域は、Eur．J．Immunol．(1999) 29:2613-2624、ＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＧＢ９９／０１４４１号および／または英国特許出願第９８０９９５１．８号に記載されているように修正されている。

【００４９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体に使用される重鎖定常領域は、本抗体の所望の特性を高めるために突然変異（例えばアミノ酸残基の置換）を含んでいてもよく、例えば新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）への結合活性を増加させ、このようにして本抗体の血清半減期を長くする。ＦｃＲｎへの結合は抗体恒常性を維持し、かつ抗体の血清半減期を調節するために重要であるということが知られていた。１つ以上（例えば、１、２、３、４、５つまたはそれ以上）の突然変異（例えばアミノ酸残基の置換）を好適な位置（例えばＣＨ２領域内）において定常領域に導入してＦｃＲｎ結合を強めて、本抗体の半減期を長くしてもよい。そのような突然変異は、配列番号１１９の１４５、１４７および／または１４９に対応する位置（「Kabatら，1991，Sequences of Proteins of Immunological Interest（免疫学的関心のあるタンパク質の配列），米国公衆衛生局，国立衛生研究所，ワシントンＤＣ」において報告されている番号付システムに基づく２５２、２５４および２５６に対応する位置）であってもよい。「Dall’Acquaら，J.B.C.，2006，281:23514-23524」、「Robbieら，Antimicrob. Agents Chemother，2013，57(12):6147」および「Dall’Acquaら，J．Immunol．2002 169:5171-5180」も参照されたい。配列番号１１９以外の定常領域が使用される場合、定常領域のアミノ酸配列を配列番号１１９とアラインメントして目的の位置に対応する位置（例えば、配列番号１１９における位置１４５、１４７または１４９）を同定することによって突然変異を導入し得る位置を決定するか、あるいは上記カバット番号付システムなどの有名な番号付システムによってそのような位置を決定することができる。

【００５０】

いくつかの例では、重鎖定常領域の位置２５２（配列番号１１９の位置１４５）のアミノ酸残基（例えばメチオニン残基）に置換突然変異（例えばＭからＹへの置換）を導入する。いくつかの例では、重鎖定常領域の位置２５４（配列番号１１９の位置１４７）に置換突然変異（例えばＳからＴへの置換）を導入する。いくつかの例では、重鎖定常領域の位置２５６（配列番号１１９の位置１４９）に置換突然変異（例えばＴからＥ）を導入する。いくつかの例では、位置２５６のトレオニンをグルタミン酸残基に突然変異させる。所望であれば、複数の突然変異（例えばアミノ酸置換）を重鎖定常領域に導入してもよい（例えば、上記置換のあらゆる組み合わせ）。特定の例では、抗ＦＸＩＩａ抗体のいずれかに使用される修正された重鎖定常領域は、位置２５２、２５４および２５６にアミノ酸置換を含むことができる（例えば、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４ＴおよびＴ２５６Ｅ、ＹＴＥ変異体としても知られている）。例えば、「Dall’Acquaら，J.B.C.，2006，281:23514-23524」、「Robbieら，Antimicrob. Agents Chemother，2013，57(12):6147」および「Dall’Acquaら，Ｊ．Immunol．2002 169:5171-5180」を参照されたい。以下のアミノ酸配列（配列番号１２０）は向上したＦｃＲｎ結合活性を有し、従って長くなった血清半減期を有する例示的な修正された重鎖定常領域を表す。

ＹＴＥ変異体の例示的な重鎖定常領域配列（配列番号１２０）：

【化４２】

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
PSVFLFPPKP KDTL**Y**I**T**R**E**P EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

【００５１】

配列番号１１９と比較して配列番号１２０において突然変異したアミノ酸残基は太字で示されている。

【００５２】

本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体のいずれかは、軽鎖可変領域と任意に当該技術分野で知られているどのＣＬであってもよい軽鎖定常領域とを含む軽鎖をさらに含んでいてもよい。いくつかの例では、ＣＬはκ軽鎖である。他の例では、ＣＬはλ軽鎖である。抗体の重鎖および軽鎖定常領域、例えばＩＭＧＴデータベース（ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ）またはｗｗｗ．ｖｂａｓｅ２．ｏｒｇ／ｖｂｓｔａｔ．ｐｈｐ（これら両方が参照により本明細書に組み込まれる）に提供されているものは当該技術分野において周知である。

【００５３】

本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体は、配列番号１１６（表２を参照）として記載されている軽鎖ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、抗ＦＸＩＩａ抗体の軽鎖可変領域は、配列番号１１４（表２を参照）として記載されている軽鎖ＣＤＲ１領域および／または配列番号１１５（表２を参照）として記載されている軽鎖ＣＤＲ２領域をさらに含んでいてもよい。例えば、抗ＦＸＩＩａ抗体軽鎖可変領域は、配列番号１１４の軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１１５の軽鎖ＣＤＲ２および配列番号１１６の軽鎖ＣＤＲ３を含んでいてもよい。一例では、軽鎖可変領域は配列番号４０のアミノ酸配列を含む。あるいは、軽鎖可変領域は、対応する生殖系列配列に対して１つ以上のフレームワーク内に１つ以上の突然変異を含み得る配列番号４０の生殖系列変異体である。対応する生殖系列配列は、当該技術分野で知られている方法および本明細書に記載されている方法によって同定することができる。

【００５４】

抗ＦＸＩＩａ抗体の例示的な軽鎖可変領域が以下に示されている（ＣＤＲ領域は太字で示されている）。

抗ＦＸＩＩａ抗体の例示的な軽鎖可変領域（配列番号４０）：

【化４３】

DIQMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD**WYLQKPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPWT**FGQGTKVEIK

抗ＦＸＩＩａ抗体の例示的な軽鎖可変領域（配列番号１２６）

【化４４】

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD**WYLQKPGQSPQLLIY**LGSNRAS**
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPWT**FGQGTKVEIK

【表２】

抗ＦＸＩＩａ抗体の軽鎖ＣＤＲ配列

	CDR1	CDR2	CD3
例示的な抗体	RSSQSLLHSNGYNYLD (配列番号114)	LGSNRAS (配列番号115)	MQALQTPWT (配列番号116)

【００５５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体は、配列番号１～３９のいずれかのアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号４０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。他の実施形態では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体（例えばＸ２１１－Ａ０１、別名ＤＸ－４０１２）は、配列番号１２５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号１２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。

【００５６】

本明細書に開示されている例示的な抗ＦＸＩＩａ抗体のいずれかの機能的変異体（例えば、上記４４種の抗体クローン）も本開示の範囲内である。いくつかの例では、抗ＦＸＩＩａ抗体は、配列番号１～３９のいずれか１つによって提供される重鎖可変領域と配列番号４０によって提供される軽鎖可変領域とを含む抗体の機能的変異体である。機能的変異体は本抗体のＣＤＲ領域の１つ以上に最大５つ（例えば、４、３、２または１つ）のアミノ酸残基変異を含んでいてもよく、実質的に同様の親和性（例えば、同じオーダーのK_D値を有する）でＦＸＩＩａの同じエピトープに結合する。一例では、アミノ酸残基変異は保存的アミノ酸残基の置換である。本明細書で使用される「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸置換がなされているタンパク質の相対電荷またはサイズ特性を変化させないアミノ酸置換を指す。そのような方法を集めた参考文献、例えば「Molecular Cloning: A Laboratory Manual（分子クローニング：実験書），J. Sambrookら編，第２版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor，ニューヨーク，1989」または「Current Protocols in Molecular Biology（分子生物学における現在の手順），F.M. Ausubelら編，John Wiley & Sons, Inc.，ニューヨーク」に記載されているような当業者に知られているポリペプチド配列の変更方法に従って変異体を調製することができる。アミノ酸の保存的置換としては、（ａ）Ｍ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、（ｂ）Ｆ、Ｙ、Ｗ、（ｃ）Ｋ、Ｒ、Ｈ、（ｄ）Ａ、Ｇ、（ｅ）Ｓ、Ｔ、（ｆ）Ｑ、Ｎおよび（ｇ）Ｅ、Ｄの群内のアミノ酸間でなされる置換が挙げられる。

【００５７】

いくつかの実施形態では、抗ＦＸＩＩａ抗体は、配列番号４１～１１３、配列番号１２１～１２４および配列番号１２７によって与えられる重鎖ＣＤＲ配列のいずれか１つと少なくとも８０％（例えば、８５％、９０％、９５％または９８％）同一である重鎖ＣＤＲおよび／または配列番号１１４～１１６によって与えられる対応する軽鎖ＣＤＲの少なくとも１つと少なくとも８０％（例えば、８５％、９０％、９５％または９８％）同一である軽鎖ＣＤＲ配列を含む。いくつかの実施形態では、抗ＦＸＩＩａ抗体は、配列番号１～３９のいずれかの重鎖可変領域と少なくとも８０％（例えば、８５％、９０％、９５％ま

たは９８％）同一である重鎖可変領域および／または配列番号４０によって与えられる軽鎖可変領域と少なくとも８０％（例えば、８５％、９０％、９５％または９８％）同一である軽鎖可変領域を含む。

【００５８】

２つのアミノ酸配列の「同一性の割合（％）」は、「KarlinおよびAltschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993」において修正されている「KarlinおよびAltschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990」のアルゴリズムを用いて決定する。そのようなアルゴリズムは、「Altschulら J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990」のＮＢＬＡＳＴおよびＸＢＬＡＳＴプログラム（バージョン２．０）に組み込まれている。ＸＢＬＡＳＴプログラムを用いてＢＬＡＳＴタンパク質検索を行って（スコア＝５０、ワード長さ＝３）、目的のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。２つの配列間にギャップが存在する場合、「Altschulら, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997」に記載されているようにGapped BLASTを利用することができる。ＢＬＡＳＴおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、ＸＢＬＡＳＴおよびＮＢＬＡＳＴ）のデフォルトパラメーターを使用することができる。

【００５９】

さらに、抗ＦＸＩＩａ抗体は、ＦＸＩＩａのＣ鎖との相互作用に関与するものとして本明細書において実施例５で考察されている結晶構造に基づいて同定される１つ以上の他の残基を含んでいてもよい。これらの残基はＶＨ鎖またはＶＬ鎖に位置していてもよい。例としては、重鎖可変領域におけるＴ２８、Ｓ３０、Ｑ３１、Ｗ５２、Ｐ５３、Ｓ５４、Ｇ５５、Ｇ５６、Ｈ５７、Ｒ５９、Ｎ７４、Ｒ１００、Ｙ１０１、Ｒ１０２、Ｇ１０３、Ｐ１０４、Ｋ１０５、Ｙ１０６、Ｙ１０７およびＹ１０８ならびに軽鎖可変領域におけるＨ３１、Ｎ３３、Ｙ３５、Ｙ５４、Ｌ５５、Ｎ５８およびＴ９９が挙げられる。

【００６０】

ＦＸＩＩａ中の特異的な残基を標的にする抗体も本明細書において提供されている。本抗体はＦＸＩＩａに優先的に結合することができるがＦＸＩＩには結合することができない。いくつかの実施形態では、ＦＸＩＩａに特異的に結合する抗体は、Ｌ３９０、Ｙ３９１、Ｗ３９２、Ｇ３９３、Ｈ３９４、Ｓ３９５、Ｆ３９６、Ｃ３９７、Ｈ４１２、Ｃ４１３、Ｌ４１４、Ｑ４１５、Ｄ４１６、Ｒ４３２、Ｎ４３３、Ｖ４５６、Ｙ４５８、Ｈ５０７、Ｆ５０９、Ｅ５１０、Ｇ５１１、Ａ５１２、Ｅ５１３、Ｙ５１５、Ｄ５５７、Ａ５５８、Ｃ５５９、Ｑ５６０、Ｇ５６１、Ｄ５６２、Ｓ５６３、Ｉ５８４、Ｓ５８５、Ｗ５８６、Ｇ５８７、Ｓ５８８、Ｇ５８９、Ｃ５９０、Ｇ５９１、Ｄ５９２およびＧ５９７などのＦＸＩＩａのＣ鎖の残基の１つ以上（例えば、少なくとも３、５、８、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０または４５個）と相互作用する。これらの残基は、以下の実施例５に記載されている結晶構造に従って抗ＦＸＩＩａ抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域中の１つ以上の残基と相互作用するものとして同定される。

【００６１】

例示的なヒトＦＸＩＩａのアミノ酸配列（配列番号１２８）が以下に示されており、上記残基は太字で強調されている。

【化４５】

```
1   mrallllgfl lvslestlsi ppweapkehk ykaeehtvvl tvtgepchfp fqyhrqlyhk
61  cthkgrpgpq pwcattpnfd qdqrwgycle pkkvkdhcsk hspcqkggtc vnmpsgphcl
121 cpqhltgnhc qkekcfepql lrffhkneiw yrteqaavar cqckgpdahc qrlasqacrt
181 npclhggrcl eveghrlchc pvgytgafcd vdtkascydg rglsyrglar ttlsgapcqp
241 waseatyrnv taeqarnwgl gghafcrnpd ndirpwcfvl nrdrlsweyc dlaqcqtptq
301 aapptpvspr lhvplmpaqp appkpqpttr tppqsqtpga lpakreqpps ltrngplscg
361 qrlrkslssm trvvgglval rgahpyiaal ywghsfcags liapcwvlta ahclqdrpap
421 edltvvlgqe rrnhscepcq tlavrsyrlh eafspvsyqh dlallrlqed adgscallsp
481 yvqpvclpsg aarpsettlc qvagwghqfe gaeeyasflq eaqvpflsle rcsapdvhgs
541 silpgmlcag fleggtdacq gdsggplvce dqaaerrltl qgiiswgsgc gdrnkpgvyt
601 dvayylawir ehtvs
```

【００６２】

他の例示的なＦＸＩＩａ配列は、ヒト、マウスまたはラットのＦＸＩＩａ配列、これらの配列のうちの１つと８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である配列あるいはその断片を含むことができる。

【００６３】

相互作用とは、２つの結合パートナーによって形成される複合体における２つの残基間の距離が所定の値よりも短い、例えば＜６オングストローム、＜４オングストロームまたは＜２オングストロームであることを意味する。例えば、１つの結合パートナー内の相互作用している残基は、複合構造上の他の結合パートナーの残基からの少なくとも１つの原子の所与の閾値内（例えば、＜６オングストローム、＜４オングストロームまたは＜２オングストローム）に少なくとも１つの原子を有することができる。相互作用は実際の結合を必要としない。相互作用している残基は抗体認識に関与しているものと示唆される。

【００６４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗体は、上に列挙されている残基の１つ以上を含むエピトープにおいてヒトの活性なＦＸＩＩａに結合する。「エピトープ」は、Ｆａｂまたは完全長抗体などの抗体によって結合される標的化合物上の部位を指す。エピトープは、典型的に６～１５ａａの長さの直鎖であってもよい。あるいは、エピトープは立体構造であってもよい。

【００６５】

いくつかの例では、本明細書に記載されているＦＸＩＩａに特異的に結合する抗体は、配列番号１２８のセグメント、すなわち残基３９０～３９７、残基４１２～４１６、残基４３２～４３３、残基４５６～４５８、残基５０７～５１５、残基５５７～５６３および／または残基５８４～５９２を含むエピトープに結合する。

【００６６】

抗ＦＸＩＩａ抗体の調製

本明細書に記載されているＦＸＩＩａに結合することができる抗体は、当該技術分野で知られている任意の方法によって調製することができる。例えば、「HarlowおよびLane, (1998) Antibodies: A Laboratory Manual（抗体：実験書）, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク」を参照されたい。

【００６７】

いくつかの実施形態では、標的抗原（例えば、ＦＸＩＩａまたはその触媒ドメイン）に特異的な抗体は従来のハイブリドーマ技術によって調製することができる。任意にＫＬＨなどの担体タンパク質に結合した完全長標的抗原またはその断片を使用して、その抗原に結合する抗体を産生させるために宿主動物を免疫することができる。宿主動物の免疫の経路およびスケジュールは一般に、本明細書にさらに記載されているように、抗体刺激および産生のための確立されている従来の技術に従っている。マウス抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体の産生のための一般的な技術は当該技術分野で知られており、本明細書に記載されている。ヒトを含むあらゆる哺乳類対象またはそこからの抗体産生細胞を操作して、哺乳類（ヒトを含む）ハイブリドーマ細胞株の産生のための基盤として機能させることができるものと想定される。典型的には、宿主動物に本明細書に記載されている免疫原などの一定量の免疫原を腹膜内、筋肉内、経口、皮下、足底内（ｉｎｔｒａｐｌａｎｔａｒ）および／または皮内に接種する。

【００６８】

ハイブリドーマは、「Kohler, B.およびMilstein, C. (1975) Nature 256:495-497」または修正された「Buck, D. W.ら, In Vitro, 18:377-381 (1982)」の一般的な体細胞ハイブリダイゼーション技術を用いてリンパ球および不死化骨髄腫細胞から調製することができる。限定されるものではないが、Ｘ６３－Ａｇ８．６５３および米国カリフォルニア州サンディエゴのthe Salk Institute細胞配布センター（Cell Distribution Center）からのものなどの入手可能な骨髄腫株をハイブリダイゼーションに使用してもよい。一般に当該技術では、ポリエチレングリコールなどのフソゲンを用いて、あるいは当業者に周知の電気的手段によって骨髄腫細胞とリンパ球様細胞とを融合させる。融合後にこれらの細

胞を融合培地から分離し、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（ＨＡＴ）培地などの選択的増殖培地で増殖させてハイブリッド形成されていない親細胞を除去する。本明細書に記載されている培地のいずれか（血清が添加されているか否かは問わない）を、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを培養するために使用することができる。細胞融合技術の別の代替法として、ＥＢＶ不死化Ｂ細胞を使用して本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａモノクローナル抗体を産生してもよい。ハイブリドーマを増殖させてサブクローニングし、所望であれば上澄みを抗免疫原活性について従来の免疫学的試験法（例えば、放射免疫測定法、酵素免疫測定法または蛍光免疫測定法）によってアッセイする。

【００６９】

抗体源として使用することができるハイブリドーマは、ＦＸＩＩａ活性を妨げることができるモノクローナル抗体を産生する親ハイブリドーマの全ての誘導体および子孫細胞を包含する。そのような抗体を産生するハイブリドーマは公知の手順を用いて生体外または生体内で増殖させてもよい。所望であれば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲル電気泳動、透析、クロマトグラフィーおよび限外濾過などの従来の免疫グロブリン精製手順によってモノクローナル抗体を培地または体液から単離してもよい。望ましくない活性がもし存在すれば、例えば調製物を固相に付着させた免疫原で作られた吸着剤の上に流して所望の抗体を免疫原から溶離または放出させることによりその活性を除去することができる。二官能性物質または誘導体化剤、例えばマレイミドベンゾイル硫化コハク酸イミドエステル（システイン残基を介して結合）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（リジン残基を介する）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、ＳＯＣｌまたはＲ１Ｎ＝Ｃ＝ＮＲ（式中、ＲおよびＲ１は異なるアルキル基である）を用いて、免疫される生物種において免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシのサイログロブリンまたは大豆トリプシン阻害剤に結合させた標的抗原または標的アミノ酸配列を含む断片で宿主動物を免疫することにより抗体（例えばモノクローナル抗体）集団を得ることができる。

【００７０】

所望であれば、目的の抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）（例えば、ハイブリドーマによって産生したもの）を配列決定してもよく、次いで、このポリヌクレオチド配列を発現または増殖のためにベクターにクローン化してもよい。目的の抗体をコードする配列を宿主細胞内のベクター中に維持してもよく、次いでこの宿主細胞を後で使用するために増殖させて凍結することができる。代替法として、遺伝子操作のためにこのポリヌクレオチド配列を使用してこの抗体を「ヒト化する」か、この抗体の親和性（親和性成熟）または他の特性を改善してもよい。例えば、その定常領域をヒトの定常領域により酷似するように操作して、この抗体をヒトにおける臨床試験および治療において使用する場合に免疫応答を回避してもよい。ＦＸＩＩａの活性を阻害する際に標的抗原に対するより高い親和性およびより高い有効性を得るように、この抗体の配列を遺伝子操作することが望ましい場合がある。この抗体に対して１つ以上のポリヌクレオチドの変化を行うことができると共に標的抗原に対するその結合特異性をなお維持できることは当業者には明らかであろう。

【００７１】

他の実施形態では、特異的なヒト免疫グロブリンタンパク質を発現するように操作された市販のマウスを用いて完全ヒト抗体を得ることができる。ヒト化抗体またはヒト抗体の産生のために、より望ましい（例えば完全ヒト抗体）またはより強い免疫応答を生じるように設計されたトランスジェニック動物を使用してもよい。そのような技術の例は、Ａｍｇｅｎ社（カリフォルニア州フリーモント）のＸｅｎｏｍｏｕｓｅ（登録商標）およびＭｅｄａｒｅｘ社（ニュージャージー州プリンストン）のＨｕＭＡｂ－Ｍｏｕｓｅ（登録商標）およびTC Mouse（商標）である。別の代替法では、ファージディスプレイ法または酵母法による組換えにより抗体を調製してもよい。例えば、米国特許第５，５６５，３３２号、第５，５８０，７１７号、第５，７３３，７４３号および第６，２６５，１５０号ならびに「Winterら，(1994) Annu.Rev.Immunol.12:433-455」を参照されたい。あるいは、

ファージディスプレイ法(McCaffertyら，(1990) Nature 348:552-553)を使用して、未免疫のドナーから得た免疫グロブリン可変（Ｖ）領域遺伝子レパートリーからヒト抗体および抗体断片を生体外で産生することができる。

【００７２】

通常の方法によりそのままの抗体（完全長抗体）の抗原結合断片を調製することができる。例えば、抗体分子のペプシン消化によりＦ（ａｂ’）２断片を生成することができ、かつＦ（ａｂ’）２断片のジスルフィド架橋を還元することによりＦａｂ断片を生成することができる。

【００７３】

例えば従来の組換え技術により、ヒト化抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体および二重特異性抗体などの遺伝子操作された抗体を産生することができる。一例では、標的抗原に特異的なモノクローナル抗体をコードするＤＮＡを容易に単離し、従来の手順を用いて（例えば、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いて）配列決定することができる。ハイブリドーマ細胞はそのようなＤＮＡの好ましい供給源として機能する。単離したら、このＤＮＡを１つ以上の発現ベクターに挿入し、次いで、これを大腸菌細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞または骨髄腫細胞などの宿主細胞に移入し（そうしなければ免疫グロブリンタンパク質は産生されない）、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を得てもよい。例えば、ＰＣＴ出願の国際公開第８７／０４４６２号を参照されたい。次いで、例えば相同なマウスの配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常領域のコード配列を用いることにより（Morrisonら，(1984) Proc.Nat.Acad.Sci.81:6851）、あるいは非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全てまたは一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合的に結合させることにより、このＤＮＡを修飾することができる。このようにして、標的抗原の結合特異性を有する「キメラ」抗体または「ハイブリッド」抗体などの遺伝子操作された抗体を調製することができる。

【００７４】

「キメラ抗体」の産生のために開発された技術は当該技術分野において周知である。例えば、「Morrisonら (1984) Proc.Natl. Acad.Sci.USA 81, 6851」、「Neubergerら (1984) Nature 312, 604」および「Takedaら (1984) Nature 314:452」を参照されたい。

【００７５】

ヒト化抗体を構築するための方法も当該技術分野において周知である。例えば、「Queenら，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10033 (1989)」を参照されたい。一例では、親の非ヒト抗体のＶＨおよびＶＬの可変領域を当該技術分野で知られている方法に従って３次元分子モデリング解析に供する。次に、正確なＣＤＲ構造の形成にとって重要であると予想されるフレームワークアミノ酸残基を同じ分子モデリング解析を用いて同定する。並行して、親のＶＨおよびＶＬ配列を検索クエリとして用いて、親の非ヒト抗体のアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を有するヒトのＶＨおよびＶＬ鎖を任意の抗体遺伝子データベースから同定する。次いで、ヒトのＶＨおよびＶＬアクセプター遺伝子を選択する。

【００７６】

選択されたヒトのアクセプター遺伝子内のＣＤＲ領域を親の非ヒト抗体またはその機能的変異体からのＣＤＲ領域で置き換えることができる。必要に応じて、ＣＤＲ領域と相互作用する際に重要であると予想される親の鎖のフレームワーク領域内の残基（上の記載を参照）を使用してヒトのアクセプター遺伝子内の対応する残基を置き換えることができる。

【００７７】

一本鎖抗体は、重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列と軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列とを連結する組換え技術により調製することができる。柔軟なリンカーを２つの可変領域の間に組み込むことが好ましい。あるいは、一本鎖抗体の作製について記載されている技術（米国特許第４，９４６，７７８号および第４，７０４，６９２号）を改変してファージまたは酵母ｓｃＦｖライブラリーを構築することができ、通常の手

順に従い、そのライブラリーからＦＸＩＩａに特異的なｓｃＦｖクローンを同定することができる。陽性のクローンをさらにスクリーニングしてＦＸＩＩａ活性を阻害するものを同定することができる。

【００７８】

当該技術分野で知られており、かつ本明細書に記載されている方法に従って得られた抗体を当該技術分野において周知である方法を用いて特性評価することができる。例えば、１つの方法は、抗原が結合するエピトープを同定すること、すなわち「エピトープマッピング」である。例えば、「HarlowおよびLane, Using Antibodies（抗体の使用）, a Laboratory Manual（実験書）, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999」の第１１章に記載されているような、抗体－抗原複合体の結晶構造の解析、競合アッセイ、遺伝子断片発現アッセイおよび合成のペプチドを用いるアッセイなどのタンパク質上のエピトープの位置をマッピングおよび特徴づけるための当該技術分野で知られている多くの方法がある。さらなる例では、エピトープマッピングを使用して抗体が結合する配列を決定することができる。エピトープは直鎖エピトープであってもよい（すなわち一本鎖アミノ酸に含まれていてもよく）、あるいは必ずしも一本鎖（一次構造直鎖配列）に含まれていなくてもよいアミノ酸の３次元相互作用によって形成された立体構造的エピトープであってもよい。可変長さ（例えば、少なくとも４～６個のアミノ酸長）のペプチドを（例えば、組換えにより）単離または合成し、抗体との結合アッセイのために使用することができる。別の例では、標的抗原配列由来の重複ペプチドを用いて本抗体による結合を決定することにより、系統的スクリーニングにおいて本抗体が結合するエピトープを決定することができる。遺伝子断片発現アッセイに従って、標的抗原をコードするオープンリーディングフレームをランダムに、あるいは特異的な遺伝子構築によって断片化し、試験される抗体により発現された抗原の断片の反応性を決定する。遺伝子断片を例えばＰＣＲによって産生し、次いで放射性アミノ酸の存在下で生体外でタンパク質に転写および翻訳してもよい。次いで、放射活性標識した抗原断片への本抗体の結合を免疫沈降およびゲル電気泳動によって決定する。ファージ粒子の表面で表示されるランダムペプチド配列の大型ライブラリー（ファージライブラリー）を用いて特定のエピトープを同定することもできる。あるいは、単純な結合アッセイにおける試験抗体への結合のために重複ペプチド断片の定義されたライブラリーを試験することができる。さらなる例では、抗原結合ドメインの突然変異誘発、ドメイン交換実験およびアラニン走査突然変異誘発を行って、エピトープ結合に必須、十分かつ／または必要な残基を同定することができる。例えば、ＦＸＩＩａポリペプチドの各種断片が近縁であるが抗原的に異なるタンパク質（ニューロトロフィンタンパク質ファミリーの別のメンバーなど）からの配列と置換（交換）されている標的抗原の突然変異体を用いてドメイン交換実験を行うことができる。突然変異体ＦＸＩＩａへの本抗体の結合を評価することにより、抗体結合に対する特定の抗原断片の重要性を評価することができる。

【００７９】

あるいは、同じ抗原に結合することが知られている他の抗体を用いて競合アッセイを行って、抗体が他の抗体と同じエピトープに結合するか否かを決定することができる。競合アッセイは当業者に周知である。

【００８０】

いくつかの例では、以下に例示されているような組換え技術によって抗ＦＸＩＩａ抗体を調製する。

【００８１】

本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸を、各ヌクレオチド配列が好適なプロモーターに機能的に連結された状態で１種の発現ベクターにクローン化することができる。一例では、重鎖および軽鎖をコードする各ヌクレオチド配列が別々のプロモーターに機能的に連結されている。あるいは、重鎖および軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、重鎖および軽鎖の両方が同じプロモーターから発現されるように単一のプロモーターに機能的に連結されていてもよい。必要に応じて、内部リボソー

ム侵入部位（ＩＲＥＳ）を重鎖コード配列と軽鎖コード配列と間に挿入することができる。

【００８２】

いくつかの例では、本抗体のこの２種類の鎖をコードするヌクレオチド配列を２種類のベクターにクローン化し、これを同じまたは異なる細胞に導入することができる。この２種類の鎖が異なる細胞で発現される場合、それらの鎖のそれぞれをそれらを発現する宿主細胞から単離することができ、単離した重鎖および軽鎖を本抗体の形成を可能にする好適な条件下で混合およびインキュベートすることができる。

【００８３】

一般に、抗体の１つまたは全ての鎖をコードする核酸配列を当該技術分野で知られている方法を用いて好適なプロモーターに機能的に連結させた状態で好適な発現ベクターにクローン化することができる。例えば、ヌクレオチド配列およびベクターを好適な条件下で制限酵素と接触させ、互いに対をなしてリガーゼによって互いに結合することができる各分子に相補的な末端部を形成することができる。あるいは、合成の核酸リンカーを遺伝子の終端に連結することができる。これらの合成のリンカーはベクター内の特定の制限部位に対応する核酸配列を含む。発現ベクター／プロモーターの選択は、本抗体を産生するのに使用される宿主細胞の種類によって決まる。

【００８４】

本明細書に記載されている抗体の発現のために、限定されるものではないが、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスＬＴＲなどのウイルスＬＴＲ、ＨＩＶ－ＬＴＲ、ＨＴＬＶ－１ＬＴＲ、サルのウイルス４０（ＳＶ４０）初期プロモーター、大腸菌lac UV5プロモーターおよび単純ヘルペスｔｋウイルスプロモーターなどの様々なプロモーターを使用することができる。

【００８５】

調節可能なプロモーターも使用することができる。そのような調節可能なプロモーターとしては、転写調節因子として大腸菌からのｌａｃリプレッサーを使用してｌａｃオペレーターを有する哺乳類細胞プロモーターからの転写を調節するもの[Brown, M.ら, Cell, 49:603-612 (1987)]、テトラサイクリンリプレッサー（ｔｅｔＲ）を使用するもの[Gossen, M.およびBujard, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551 (1992)、Yao, F.ら, Human Gene Therapy, 9:1939-1950 (1998)、Shockelt, P.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:6522-6526 (1995)]が挙げられる。他の系としては、ＦＫ５０６二量体、アストラジオール（ａｓｔｒａｄｉｏｌ）を用いるＶＰ１６またはｐ６５、ＲＵ４８６、ジフェノールムリスレロン(diphenol murislerone)またはラパマイシンが挙げられる。誘導可能な系はＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社およびＡｒｉａｄ社から入手可能である。

【００８６】

オペロンと共にリプレッサーを含む調節可能なプロモーターを使用することができる。一実施形態では、大腸菌からのｌａｃリプレッサーは、ｌａｃオペレーターを有する哺乳類細胞プロモーターからの転写を調節するための転写調節因子として機能することができ[M. Brownら, Cell, 49:603-612 (1987)]、Gossen およびBujard (1992)、[M. Gossenら, Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)]、テトラサイクリンリプレッサー（ｔｅｔＲ）を転写活性化因子（ＶＰ１６）と組み合わせてｔｅｔＲ哺乳類細胞転写活性化因子融合タンパク質、すなわちｔＴａ（ｔｅｔＲ－ＶＰ１６）を形成し、ヒトのサイトメガロウイルス（ｈＣＭＶ）主要前初期プロモーター由来のｔｅｔＯを有する最小プロモーターと組み合わせてｔｅｔＲ－ｔｅｔオペレーター系を形成して、哺乳類細胞における遺伝子発現を制御する。一実施形態では、テトラサイクリン誘導性スイッチを使用する。ｔｅｔＲ哺乳類細胞転写因子融合誘導体よりもテトラサイクリンリプレッサー（ｔｅｔＲ）単独の方が、テトラサイクリンオペレーターがＣＭＶＩＥプロモーターのＴＡＴＡ要素の下流に適切に位置している場合に哺乳類細胞における遺伝子発現を調節するための強力なトランス調節因子として機能することができる（Yaoら, Human Gene Therapy）。このテトラ

サイクリン誘導性スイッチの１つの特定の利点は、それがその調節作用を達成するために、場合によっては細胞に有毒な場合があるテトラサイクリンリプレッサー－哺乳類細胞転写活性化因子またはリプレッサー融合タンパク質の使用を必要としない点である(Gossenら，Natl．Acad．Sci．USA，89:5547-5551（1992)、Shockettら，Proc．Natl．Acad．Sci．USA，92:6522-6526（1995))。

【００８７】

さらにベクターは、例えば、哺乳類細胞における安定または一過性の形質移入体の選択のためのネオマイシン遺伝子などの選択可能なマーカー遺伝子、高レベルの転写のためのヒトＣＭＶ前初期遺伝子からのエンハンサー／プロモーター配列、ｍＲＮＡ安定性のためのＳＶ４０からの転写終結およびＲＮＡプロセシングプロセシングシグナル、ＳＶ４０ポリオーマ複製起点および適切なエピソーム複製のためのＣｏｌＥ１、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、多用途の多重クローニング部位ならびにセンスおよびアンチセンスＲＮＡの生体外転写のためのT7 RNAおよびSP6 RNAプロモーターのいくつかまたは全てを含むことができる。導入遺伝子を含むベクターを作製するのに適したベクターおよび方法は当該技術分野において周知であり、かつ入手可能である。

【００８８】

本明細書に記載されている方法を実施するのに有用なポリアデニル化シグナルの例としては、限定されるものではないが、ヒトのコラーゲンＩポリアデニル化シグナル、ヒトのコラーゲンＩＩポリアデニル化シグナルおよびＳＶ４０ポリアデニル化シグナルが挙げられる。

【００８９】

本抗体を産生するために、本抗体のいずれかをコードする核酸を含む１種以上のベクター（例えば発現ベクター）を好適な宿主細胞に導入してもよい。この宿主細胞を本抗体またはその任意のポリペプチド鎖の発現に適した条件下で培養することができる。そのような抗体またはそのポリペプチド鎖は従来の方法、例えば親和性精製により培養細胞によって（例えば細胞または培養物上澄みから）回収することができる。必要であれば、本抗体の産生を可能にする好適な条件下および好適な期間で本抗体のポリペプチド鎖をインキュベートすることができる。

【００９０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗体の調製方法は、本明細書にも記載されているように、抗ＦＸＩＩａ抗体の重鎖および軽鎖の両方をコードする組換え型発現ベクターを必要とする。組換え型発現ベクターは、従来の方法、例えばリン酸カルシウムによって媒介される形質移入によって好適な宿主細胞（例えばｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞）に導入することができる。陽性の形質転換体宿主細胞を選択して、本抗体を形成する２種類のポリペプチド鎖の発現を可能にする好適な条件下で培養することができ、これを細胞または培地から回収することができる。必要に応じて、宿主細胞から回収した２種類の鎖を本抗体の形成を可能にする好適な条件下でインキュベートすることができる。

【００９１】

一例では、一方が抗ＦＸＩＩａ抗体の重鎖をコードし、他方が抗ＦＸＩＩａ抗体の軽鎖をコードする２種類の組換え型発現ベクターが提供される。２種類の組換え型発現ベクターの両方を、従来の方法、例えばリン酸カルシウムによって媒介される形質移入によって好適な宿主細胞（例えばｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞）に導入することができる。あるいは、発現ベクターのそれぞれを好適な宿主細胞に導入することができる。陽性の形質転換体を選択して本抗体のポリペプチド鎖の発現を可能にする好適な条件下で培養することができる。２種類の発現ベクターを同じ宿主細胞に導入した場合、そこで産生される抗体を宿主細胞または培地から回収することができる。必要であれば、ポリペプチド鎖を宿主細胞または培地から回収し、次いで本抗体の形成を可能にする好適な条件下でインキュベートすることができる。２種類の発現ベクターを異なる宿主細胞に導入する場合、それらのそれぞれを対応する宿主細胞または対応する培地から回収することができる。次いで、この２種類のポリペプチド鎖を本抗体の形成に適した条件下でインキュベートすることができる。

【００９２】
標準的な分子生物学技術を使用して組換え型発現ベクターを調製し、宿主細胞を形質移入し、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、かつ本抗体を培地から回収する。例えばタンパク質Ａまたはタンパク質Ｇ結合マトリックスを用いる親和性クロマトグラフィーによっていくつかの抗体を単離することができる。
【００９３】
本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体の重鎖、軽鎖またはその両方をコードする核酸、それを含むベクター（例えば発現ベクター）およびそのベクターを含む宿主細胞のいずれも本開示の範囲内である。
【００９４】
医薬組成物
本明細書に記載されている抗体ならびにそれをコードする核酸もしくは核酸セット、それを含むベクターまたはそのベクターを含む宿主細胞を薬学的に許容される担体（賦形剤）と混合して標的疾患を治療するのに使用される医薬組成物を形成することができる。「許容される」とは、その担体が当該組成物の有効成分と適合可能でなければならず（好ましくは有効成分を安定化することができ）、かつ治療される対象に有害でないことを意味する。薬学的に許容される賦形剤（担体）は当該技術分野において周知である緩衝液を含む。例えば、「Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed.（レミントン：薬学の科学および実践、第２０版）(2000) Lippincott Williams and Wilkins, K. E. Hoover編」を参照されたい。
【００９５】
当該方法に使用される医薬組成物は、凍結乾燥した製剤または水溶液の形態の薬学的に許容される担体、賦形剤または安定化剤を含むことができる(Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed.（レミントン：薬学の科学および実践、第２０版）(2000) Lippincott Williams and Wilkins, K. E. Hoover編)。許容される担体、賦形剤または安定化剤は、使用される投与量および濃度においてレシピエントに非毒性であり、リン酸、クエン酸および他の有機酸などの緩衝液、アスコルビン酸およびメチオニンなどの抗酸化剤、防腐剤（例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール、メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、３－ペンタノールおよびｍ－クレゾール）、低分子量（約１０個の残基未満の）ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジンなどのアミノ酸、グルコース、マンノースまたはデキストランなどの単糖、二糖および他の炭水化物、ＥＤＴＡなどのキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖類、ナトリウムなどの塩を形成する対イオン、金属複合体（例えばＺｎ－タンパク質複合体）および／またはＴＷＥＥＮ（商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（商標）またはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などの非イオン性界面活性剤を含んでいてもよい。
【００９６】
いくつかの例では、本明細書に記載されている医薬組成物は、「Epsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985)」、「Hwangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)」ならびに米国特許第４，４８５，０４５号および第４，５４４，５４５号に記載されているような当該技術分野で知られている方法によって調製することができる本抗体（またはそれをコードする核酸）を含有するリポソームを含む。向上した循環時間を有するリポソームは米国特許第５，０１３，５５６号に開示されている。特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびＰＥＧ誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）を含む脂質組成物を用いる逆相蒸発法によって生成することができる。所望の直径を有するリポソームを得るために規定の細孔径のフィルターを通してリポソームを押し出す。

【００９７】
また、本抗体またはそれをコードする核酸は、例えばコアセルベーション技術または界面重合によって調製されるマイクロカプセル（例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ（メタクリル酸メチル）マイクロカプセル）に、あるいはコロイド状の薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミン小球体、マイクロエマルション、ナノ粒子およびナノカプセル）またはマクロエマルションに封入されていてもよい。そのような技術は当該技術分野で知られており、例えば、「Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed.（レミントン：薬学の科学および実践、第２０版） Mack Publishing (2000)」を参照されたい。
【００９８】
他の例では、本明細書に記載されている医薬組成物を持続放出型として製剤化することができる。持続放出製剤の好適な例としては本抗体を含有する固体の疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは成形物品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸と７エチル－Ｌ－グルタミン酸とのコポリマー、非分解性エチレン－酢酸ビニル、LUPRON DEPOT（商標）（乳酸－グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドからなる注射可能な小球体）などの分解性乳酸－グリコール酸コポリマー、イソ酪酸酢酸スクロース、およびポリＤ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が挙げられる。
【００９９】
生体内投与のために使用される医薬組成物は無菌でなければならない。これは、例えば、無菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。治療用抗体組成物は一般に無菌アクセス口を有する容器、例えば皮下注射針によって穿刺可能な栓を有する静脈内溶液バッグまたはバイアルの中に入れられる。
【０１００】
本明細書に記載されている医薬組成物は経口、非経口または直腸内投与あるいは吸入または吹送による投与のための、錠剤、丸剤、カプセル、粉末、顆粒、溶液、懸濁液または坐薬などの単位剤形であってもよい。
【０１０１】
錠剤などの固体組成物を調製するために、主要な有効成分を医薬担体、例えばコーンスターチ、ラクトース、スクロース、ソルビトール、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、リン酸二カルシウムまたはガムなどの従来の錠剤化成分および他の医薬希釈液（例えば水）と混合して、本発明の化合物またはそれらの非毒性の薬学的に許容される塩の均質な混合物を含有する固体の予備処方組成物を形成することができる。これらの予備処方組成物を均質という場合、当該組成物を錠剤、丸剤およびカプセルなどの等しく有効な単位剤形に容易に細分することができるように、これらの有効成分が当該組成物全体に均一に分散されていることを意味する。次いで、この固体の予備処方組成物を０．１～約５００ｍｇの本発明の有効成分を含有する上記種類の単位剤形に細分する。この新規な組成物の錠剤または丸剤を被覆するかそれ以外の方法で配合して長期作用という利点を与える剤形を得ることができる。例えば、錠剤または丸剤は内部成分（inner dosage component）および外部成分（outer dosage component）を含むことができ、後者は前者を覆う外皮の形態である。２種類の成分は、胃での崩壊に抵抗するように機能し、かつ内部成分がそのまま十二指腸の中まで移動するか放出を遅らせることができる腸溶性層（enteric layer）によって分離することができる。そのような腸溶性層または被覆物のために様々な材料を使用することができ、そのような材料としては多くのポリマー酸およびポリマー酸とセラック、セチルアルコールおよび酢酸セルロースなどの材料との混合物が挙げられる。
【０１０２】
好適な界面活性剤としては、特にポリオキシエチレンソルビタン（例えば、Ｔｗｅｅｎ

（商標）２０、４０、６０、８０または８５）および他のソルビタン（例えば、Ｓｐａｎ（商標）２０、４０、６０、８０または８５）などの非イオン性薬剤が挙げられる。界面活性剤を含む組成物は０．０５～５％の界面活性剤を含むと有利であり、０．１～２．５％であってもよい。当然のことながら、必要であれば他の成分、例えばマンニトールまたは他の薬学的に許容される媒体を添加してもよい。

【０１０３】

Ｉｎｔｒａｌｉｐｉｄ（商標）、Ｌｉｐｏｓｙｎ（商標）、Ｉｎｆｏｎｕｔｒｏｌ（商標）、Ｌｉｐｏｆｕｎｄｉｎ（商標）およびＬｉｐｉｐｈｙｓａｎ（商標）などの市販されている脂肪乳剤を用いて、好適な乳剤を調製してもよい。有効成分は、予め混合された乳剤組成物に溶解してもよく、あるいは油（例えば、大豆油、サフラワー油、綿実油、胡麻油、トウモロコシ油または扁桃油）およびリン脂質（例えば、卵リン脂質、大豆リン脂質または大豆レシチン）および水と混合して形成された乳剤に溶解してもよい。当然のことながら他の成分、例えばグリセリンまたはグルコースを添加して乳剤の張度を調整してもよい。好適な乳剤は典型的に最大２０％、例えば５～２０％の油を含有している。脂肪乳剤は０．１～１．０．ｉｍ、特に０．１～０．５．ｉｍの脂肪滴を含み、かつ５．５～８．０の範囲のｐＨを有していてもよい。

【０１０４】

乳剤組成物は、抗体をＩｎｔｒａｌｉｐｉｄ（商標）またはその成分（大豆油、卵リン脂質、グリセリンおよび水）と混合することによって調製される組成物であってもよい。

【０１０５】

吸入または吹送のための医薬組成物は、溶液および懸濁液中の薬学的に許容される水性もしくは有機溶媒またはそれらの混合物と粉末とを含む。液体もしくは固体組成物は上に記載されている好適な薬学的に許容される賦形剤を含有していてもよい。いくつかの実施形態では、当該組成物は局所または全身作用のための経口または経鼻呼吸経路によって投与される。

【０１０６】

好ましくは無菌の薬学的に許容される溶媒に溶解した組成物をガスを使用して霧状にしてもよい。霧状にした溶液を噴霧装置から直接吸い込んでもよく、あるいは噴霧器をフェイステント型マスク（face mask tent）または間欠的陽圧呼吸器に取り付けてもよい。溶液、懸濁液または粉末組成物を適当な方法で製剤を送達する装置から好ましくは経口もしくは経鼻投与してもよい。

【０１０７】

治療方法

本明細書に記載されている抗体のいずれかならびにそれをコードする核酸もしくは核酸セット、それを含むベクターまたはそのベクターを含む宿主細胞は、接触系活性化に関連する疾患、接触系活性化異常に関連する疾患（例えばＨＡＥ）または眼疾患などの、接触系活性化異常に関連する疾患または障害を治療するのに有用である。

【０１０８】

本明細書に開示されている方法を実施するために、有効量の本明細書に記載されている医薬組成物をその治療を必要としている対象（例えばヒト）に静脈内投与（例えばボーラスとして、または一定期間にわたる持続注入によって）、あるいは筋肉内、腹膜内、脳脊髄内（ｉｎｔｒａｃｅｒｅｂｒｏｓｐｉｎａｌ）、皮下、関節内、滑液包内、クモ膜下腔内、経口、吸入または局所経路などの好適な経路によって投与することができる。ジェット噴霧器および超音波噴霧器などの液体製剤のための市販されている噴霧器は投与にとって有用である。液体製剤を直接霧状にすることができ、かつ凍結乾燥した粉末を再構成後に霧状にすることができる。あるいは、フルオロカーボン製剤および定量噴霧式吸入器を用いて本明細書に記載されている抗体をエアロゾル化するか、凍結乾燥および粉砕した粉末として吸入することができる。

【０１０９】

本明細書に記載されている方法によって治療される対象は、哺乳類、より好ましくはヒ

トであってもよい。哺乳類としては、限定されるものではないが、家畜、スポーツ動物、ペット、霊長類、ウマ、イヌ、ネコ、マウスおよびラットが挙げられる。治療を必要とするヒトの対象は、遺伝性血管浮腫（ＨＡＥ）、血栓症または眼疾患などの標的疾患／障害を有するかそのリスクがあるかそれを有することが疑われるヒトの患者であってもよい。標的疾患または障害を有する対象は通常の健康診断、例えば、臨床検査、臓器機能試験、ＣＴスキャンまたは超音波によって特定することができる。そのような標的疾患／障害のいずれかを有する疑いのある対象は、当該疾患／障害の１つ以上の症状を示す可能性がある。当該疾患／障害のリスクがある対象は、その疾患／障害の危険因子の１つ以上を有する対象であってもよい。

【０１１０】

本明細書に記載されている方法および組成物を使用して接触系活性化および／またはｐＫａｌシグナル伝達経路に関連するあらゆる疾患または障害を治療することができる。いくつかの実施形態では、標的疾患は、心房細動に関連する血栓症、ＤＶＴ、肺塞栓症、脳卒中または他の動脈もしくは静脈血栓塞栓イベントなどの血栓症である。血栓症（例えば、静脈血栓症または動脈血栓症）は、循環系を通る血液の流れを妨げ得る血管内部での血塊の形成を指す。血栓症を有するかそのリスクがある対象は通常の医療法によって特定することができる。

【０１１１】

他の実施形態では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体によって治療することができる疾患は、限定されるものではないが、黄斑浮腫、糖尿病性網膜症、高血圧性網膜症、加齢性黄斑変性症および網膜静脈閉塞症などのカリクレイン系（例えばｐＫａｌ系）に関連する疾患であってもよい。接触活性化系に関連する疾患または障害の例としては、限定されるものではないが、関節リウマチ、骨関節炎、乾癬性関節炎、乾癬、全身性エリテマトーデス、全身性エリテマトーデス腎炎、全身性肥満細胞症、痛風、腸疾患、口腔粘膜炎、神経因性疼痛、炎症性疼痛、脊柱管狭窄症－退行性脊椎疾患、動脈もしくは静脈血栓症、術後イレウス、大動脈瘤、脈管炎、浮腫、後天性血管浮腫、特発性血管浮腫、アナフィラキシー、特発性アナフィラキシー、脳浮腫、肺塞栓症、脳卒中、心室補助装置またはステント上での凝固、留置カテーテルまたは末梢挿入中心静脈カテーテルの使用に関連する凝固、膜型人工肺装置の使用に関連する凝固、透析のためのグラフトまたはシャントの使用に関連する凝固、頭部外傷または腫瘍周囲の脳浮腫、敗血症、急性中大脳動脈（ＭＣＡ）、虚血性イベント（脳卒中）、再狭窄（例えば血管形成後）または火傷が挙げられる。

【０１１２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体で治療することができる疾患は、限定されるものではないが、黄斑浮腫、糖尿病性網膜症、高血圧性網膜症、加齢性黄斑変性症および網膜静脈閉塞症などの接触活性化系に関連する眼疾患である。

【０１１３】

一例では、接触系活性化に関わる疾患または病気は遺伝性血管浮腫（ＨＡＥ）である。遺伝性血管浮腫（ＨＡＥ）は「クインケ浮腫」、Ｃ１エステラーゼインヒビター欠損、Ｃ１インヒビター欠損および遺伝性血管神経性浮腫（ＨＡＮＥ）としても知られている。ＨＡＥは、例えば、手足、顔、性器、消化管および気道を冒し得る重度の腫れ（血管浮腫）の再発性の症状発現を特徴とする。ＨＡＥの症状としては、例えば、腕、脚、唇、眼、舌および／または喉の腫れ、喉の腫れや突然の嗄声を伴うことがある気道閉塞、明らかな原因が不明の腹部痙攣の繰り返しの症状発現および／または腸の腫れが挙げられ、それらは重症になることがあり、腹部痙攣、嘔吐、脱水、下痢、疼痛および／またはショックを引き起こすことがある。このようなＨＡＥを有する個体の約３分の１が発作中に有縁性紅斑と呼ばれる痒みのない発疹を生じる。

【０１１４】

気道の腫れは生命を脅かす恐れがあり、患者の中には死に至るものもいる。死亡率は１

５～３３％と推定されている。ＨＡＥが原因で１年間に約１５，０００～３０，０００人が救急に来院する。

【０１１５】

外傷またはストレス、例えば、歯科的処置、病気（例えば、風邪やインフルエンザなどのウイルス性疾患）、月経および外科手術が血管浮腫の発作の誘因となることがある。ＨＡＥの急性発作を防ぐために、患者は以前に発作を引き起こしたことのある特定の刺激を回避することを試みることができる。しかし、発作は公知の誘因以外で生じることが多い。典型的には、ＨＡＥ症状は最初に幼児期に現れ、思春期の間に悪化する。平均すると未治療の個体は１～２週間ごとに発作を有し、大部分の症状発現は約３～４日間続く（ｇｈｒ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｃｏｎｄｉｔｉｏｎ／ｈｅｒｅｄｉｔａｒｙ－ａｎｇｉｏｅｄｅｍａ）。発作の頻度および持続期間は遺伝性血管浮腫を有する人々の中で大きく異なり、同じ家族の人々の間でさえも大きく異なる。

【０１１６】

Ｉ型、ＩＩ型およびＩＩＩ型として知られている３つの型のＨＡＥがある。ＨＡＥは５０，０００人に１人を冒し、Ｉ型は症例の約８５％を占め、ＩＩ型は症例の約１５％を占め、ＩＩＩ型は非常に稀であると推定されている。ＩＩＩ型は最も新しく登場した形態であり、当初は女性のみに生じると考えられていたが、罹患した男性がいる家族が確認されている。

【０１１７】

ＨＡＥは、罹患した人が１人の罹患した親から突然変異を受け継ぐ可能性があるような常染色体優性遺伝形式で受け継がれる。遺伝子における新しい突然変異も生じる可能性があり、従って、ＨＡＥは自身の家族の中にその疾患の既往歴がない人々においても生じる可能性がある。症例の２０～２５％は新しい自然発生的な突然変異に起因するものであると推定されている。

【０１１８】

ＳＥＲＰＩＮＧ１遺伝子の突然変異が、Ｉ型およびＩＩ型遺伝性血管浮腫を引き起こす。ＳＥＲＰＩＮＧ１遺伝子は炎症を制御するのに重要なＣ１インヒビタータンパク質を産生するための命令を与える。Ｃ１インヒビターは炎症を促進する特定のタンパク質の活性を阻止する。Ｉ型遺伝性血管浮腫を引き起こす突然変異により血中のＣ１インヒビターレベルの減少が生じる。対照的に、ＩＩ型を引き起こす突然変異により、異常に機能するＣ１インヒビターの産生が生じる。適切なレベルの機能的Ｃ１インヒビターが存在しないと、過剰な量のブラジキニンが産生される。ブラジキニンは、血管壁から体組織内への流体の漏れを増加させることにより炎症を促進する。体組織内の流体の過剰な蓄積は、Ｉ型およびＩＩ型遺伝性血管浮腫を有する個体に見られる腫れの症状発現を引き起こす。

【０１１９】

Ｆ１２遺伝子の突然変異は、正常なＣ１インヒビターを有するＨＡＥとしても知られているＩＩＩ型遺伝性血管浮腫のいくつかの症例に関連している。Ｆ１２遺伝子は第ＸＩＩ凝固因子を産生するための命令を与える。第ＸＩＩ因子は血液凝固（凝血）において重要な役割を担うだけでなく炎症の重要な刺激物質でもあり、ブラジキニンの産生に関与している。Ｆ１２遺伝子の特定の突然変異により、高い活性を有する第ＸＩＩ因子の産生が生じる。その結果、より多くのブラジキニンが産生され、血管壁はより漏れやすくなり、これにより腫れの症状発現が生じる。ＩＩＩ型遺伝性血管浮腫の他の症例の原因は未知なままである。１種以上の未だに同定されていない遺伝子の突然変異がこれらの症例における障害に関与しているかもしれない。

【０１２０】

ＨＡＥは、アレルギーまたは他の医学的状態から生じる他の形態の血管浮腫と同じように現れる場合があるが、原因および治療において有意に異なる。遺伝性血管浮腫がアレルギーと誤診された場合、最も一般的には、通常ＨＡＥには効果がない抗ヒスタミン薬、ステロイドおよび／またはエピネフリンで治療されるが、エピネフリンは生命を脅かす反応に対して使用することができる。誤診により腹部の腫れを有する患者に対して不必要な診

査手術も行われ、ＨＡＥ患者の中には腹痛が心因性のものとして誤診されたものもいる。
【０１２１】
ＨＡＥの症状は、例えば質問表（例えば、患者、臨床医または家族の一員が記入する質問表）を用いて評価することができる。そのような質問表は当該技術分野で知られており、例えば視覚的アナログスケールが挙げられる。例えば、「McMillan, C.V.ら Patient. 2012;5(2):113-26」を参照されたい。
【０１２２】
本明細書で使用される「有効量」は、単独または１種以上の他の活性薬剤と組み合わせた、対象に治療効果を与えるのに必要な各活性薬剤の量を指す。いくつかの実施形態では、治療効果は、ＦＸＩＩａ活性の低下、ｐＫａｌまたはブラジキニンの量の減少または血管拡張の減少である。ＦＸＩＩａに特異的に結合するがＦＸＩＩには結合しない抗体阻害剤は、ＦＸＩＩにも結合する抗体阻害剤よりも少ない有効量を必要とする場合もある。本抗体の量が治療効果を達成したか否かの決定方法は当業者には明らかである。当業者によって認識されているように有効量は、治療されている特定の病気、病気の重症度、年齢、健康状態、サイズ、性別および体重などの個々の患者パラメーター、治療の持続期間、併用療法の性質（もし存在すれば）、特定の投与経路および医療従事者の知識および専門知識の範囲内の同様の因子によって異なる。これらの因子は当業者に周知であり、通常の実験法のみで対処することができる。一般的には、個々の成分またはそれらの組み合わせの最大用量、すなわち適切な医学的判断による最も高い安全な用量を使用することが好ましい。
【０１２３】
半減期などの経験的考察は一般に投与量の決定に寄与する。例えば、ヒト化抗体または完全ヒト抗体などのヒトの免疫系に適合可能な抗体を使用して本抗体の半減期を長くし、かつ本抗体が宿主の免疫系によって攻撃されるのを防止してもよい。投与頻度は治療の過程で決定および調節してもよく、一般的には（但し必須ではない）、標的疾患／障害の治療および／または抑制および／または寛解および／または遅延に基づく。あるいは、抗体の持続的連続放出製剤が適当な場合もある。持続放出を達成するための各種製剤および装置が当該技術分野で知られている。
【０１２４】
一例では、本明細書に記載されている抗体の投与量は、本抗体の１回以上の投与が与えられた個体における経験に基づいて決定してもよい。個体に拮抗薬の漸増投与量を与える。拮抗薬の有効性を評価するために疾患／障害の指標を追跡することができる。
【０１２５】
一般に、本明細書に記載されている抗体のいずれかの投与のために、最初の候補投与量は約２ｍｇ／ｋｇであってもよい。本開示の目的のために、典型的な１日投与量は上記因子に応じて０．１μｇ／ｋｇ～３μｇ／ｋｇ～３０μｇ／ｋｇ～３００μｇ／ｋｇ～３ｍｇ／ｋｇのうちのいずれかから３０ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇまたはそれ以上の範囲であってもよい。条件に応じて数日間またはそれ以上にわたる繰り返し投与のために、症状の所望の抑制が生じるか十分な治療レベルが達成されて標的疾患もしくは障害またはそれらの症状を軽減するまで治療を持続する。例示的な投与計画は、約２ｍｇ／ｋｇの最初の用量と、その後の本抗体の週に１回の約１ｍｇ／ｋｇの維持用量または２週間に１回の約１ｍｇ／ｋｇの維持用量とを含む。但し、実施者が達成したい薬物動態学的減衰のパターンに応じて他の投与計画が有用な場合もある。例えば、週に１～４回の投薬が想定される。いくつかの実施形態では、約３μｇ／ｍｇ～約２ｍｇ／ｋｇ（約３μｇ／ｍｇ、約１０μｇ／ｍｇ、約３０μｇ／ｍｇ、約１００μｇ／ｍｇ、約３００μｇ／ｍｇ、約１ｍｇ／ｋｇおよび約２ｍｇ／ｋｇなど）の範囲の投薬を使用してもよい。いくつかの実施形態では、投薬頻度は週に１回、２週間に１回、４週間に１回、５週間に１回、６週間に１回、７週間に１回、８週間に１回、９週間に１回または１０週間に１回あるいは１ヶ月に１回、２ヶ月に１回または３ヶ月に１回またはそれ以上である。この治療の進行は従来の技術およびアッセイによって容易に監視される。投与計画（使用される抗体を含む）は時間

と共に変化してもよい。
【０１２６】
いくつかの実施形態では、正常な体重の成人患者のために、約０．３～５．００ｍｇ／ｋｇの範囲の用量を投与してもよい。いくつかの例では、本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩ抗体（例えばＤＸ－４０１２）の投与量は１０ｍｇ／ｋｇであってもよい。特定の投与計画すなわち用量、タイミングおよび反復は、特定の個体およびその個体の病歴ならびに個々の薬剤の特性（薬剤の半減期および当該技術分野において周知である他の考察など）によって決まる。
【０１２７】
本開示の目的のために、本明細書に記載されている抗体の適当な投与量は、用いられる特定の抗体、抗体および／または非抗体ペプチド（またはその組成物）、疾患／障害の種類および重症度、本抗体の投与が予防目的であるか治療目的であるか、過去の治療、患者の病歴および拮抗薬への反応および担当医の裁量によって決まる。典型的には、所望の結果を達成する投与量に達するまで臨床医は抗体を投与する。いくつかの実施形態では、所望の結果は血栓症の減少である。投与により所望の結果が得られたか否かの決定方法は当業者に明らかであろう。１種以上の抗体の投与は、例えばレシピエントの生理的状態、投与の目的が治療であるか予防であるか、および当業者に知られている他の因子に応じて連続的であっても間欠的であってもよい。抗体の投与は本質的に予め選択した期間にわたって連続的であってもよく、あるいは、例えば標的疾患または障害を発現する前、間または後のいずれかにおける一連の間隔を空けた投与であってもよい。
【０１２８】
本明細書で使用される「治療する」するという用語は、障害、疾患の症状あるいは疾患または障害に対する素因を治す、治癒させる、軽減する、緩和させる、変化させる、修復する、寛解させる、改善するかそれに影響を及ぼす目的で、当該標的疾患または障害、疾患／障害の症状あるいは疾患／障害に対する素因を有する対象に１種以上の活性薬剤を含む組成物を施用または投与することを指す。
【０１２９】
標的疾患／障害の軽減は、疾患の発現または進行を遅らせること、あるいは疾患の重症度を低下させることを含む。疾患の軽減は必ずしも治癒的結果を必要としない。本明細書で使用される標的疾患または障害の発現を「遅らせる」とは、疾患の進行を引き延ばす、妨げる、減速させる、遅延させる、安定化させる、および／または延期させることを意味する。この遅れは、病歴および／または治療されている個体に応じて変動する時間長さであってもよい。疾患の発現を「遅らせる」または軽減する方法あるいは疾患の発症を遅らせる方法は、当該方法を用いない場合と比較した場合に所与の時間枠において疾患の１つ以上の症状を発現する確率を低下させ、かつ／または所与の時間枠における症状の程度を減少させる方法である。そのような比較は、典型的には統計的に有意な結果を得るのに十分な多くの対象を用いた臨床試験に基づく。
【０１３０】
疾患の「発現」または「進行」は、疾患の最初の兆候および／または進行の確証を意味する。疾患の発現は当該技術分野において周知であるような標準的な臨床的技術を用いて検出可能であり、評価することができる。但し、発現は検出不可能であり得る進行も指す。本開示の目的のために、発現または進行は症状の生物学的経過を指す。「発現」は発生、再発および発症を含む。標的疾患または障害の本明細書で使用される「発症」または「発生」は最初の発症および／または再発を含む。
【０１３１】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗体をその治療を必要としている対象に、生体内での標的抗原の一方または両方の活性を少なくとも２０％（例えば、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％またはそれ以上）阻害するのに十分な量で投与する。他の実施形態では、本抗体を標的抗原の活性レベルを少なくとも２０％（例えば、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％またはそれ以上

）減少させるのに有効な量で投与する。
【０１３２】
医学の当業者に知られている従来の方法を使用して、治療される疾患の種類または疾患の部位に応じて医薬組成物を対象に使用することができる。この組成物を他の従来の経路により、例えば、経口、非経口、吸入スプレー、局所、直腸内、経鼻、口腔内、膣内投与するか、埋め込み型リザーバーを介して投与することもできる。本明細書で使用される「非経口」という用語は、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、滑液包内、胸骨内、クモ膜下腔内、病巣内および頭蓋内注射または注入技術を含む。さらに、当該組成物は、１、３もしくは６ヶ月間のデポ剤注射材料または生分解性材料および方法を用いるなど、デポ剤注射投与経路により対象に投与することができる。いくつかの例では、当該医薬組成物を眼内または硝子体内に投与する。
【０１３３】
注射可能な組成物は、植物油、ジメチルラクタミド、ジメチルホルムアミド、乳酸エチル、炭酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、エタノールおよびポリオール（グリセリン、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）などの各種担体を含有していてもよい。静脈内注射のために、水溶性抗体は点滴法によって投与することができ、これにより本抗体および生理学的に許容される賦形剤を含有する医薬製剤が注入される。生理学的に許容される賦形剤としては、例えば、５％デキストロース、０．９％生理食塩水、リンゲル液または他の好適な賦形剤が挙げられる。筋肉内製剤、例えば本抗体の好適な可溶性塩の形態の無菌製剤は、注射用水、０．９％生理食塩水または５％グルコース溶液などの医薬賦形剤に溶解して投与することができる。
【０１３４】
一実施形態では、部位特異的もしくは標的化局所送達法により抗体を投与する。部位特異的もしくは標的化局所送達法の例としては、本抗体の様々な埋め込み可能なデポ剤源または注入カテーテル、留置カテーテルまたは針カテーテルなどの局所送達カテーテル、合成グラフト、外膜ラップ（adventitial wrap）、シャントおよびステント、他の埋め込み可能な装置、部位特異的担体、直接注射または直接施用が挙げられる。例えば、ＰＣＴ出願の国際公開第００／５３２１１号および米国特許第５，９８１，５６８号を参照されたい。
【０１３５】
アンチセンスポリヌクレオチド、発現ベクターまたはサブゲノムのポリヌクレオチドを含有する治療用組成物の標的化送達も使用することができる。受容体によって媒介されるＤＮＡ送達法については、例えば、「Findeisら, Trends Biotechnol. (1993) 11:202」、「Chiouら, Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer（遺伝子治療：直接遺伝子導入の方法および用途）(J. A. Wolff編) (1994)」、「Wuら, J. Biol. Chem. (1988) 263:621」、「Wuら, J. Biol. Chem. (1994) 269:542」、「Zenkeら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:3655」、「Wuら, J. Biol. Chem. (1991) 266:338」に記載されている。
【０１３６】
ポリヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されている抗体をコードするポリヌクレオチド）を含有する治療用組成物は、遺伝子治療プロトコルにおける局所投与のために約１００ｎｇ～約２００ｍｇの範囲のＤＮＡで投与する。いくつかの実施形態では、遺伝子治療プロトコルの間に、約５００ｎｇ～約５０ｍｇ、約１μｇ～約２ｍｇ、約５μｇ～約５００μｇおよび約２０μｇ～約１００μｇのＤＮＡまたはそれ以上の濃度範囲も使用することができる。
【０１３７】
本明細書に記載されている治療用ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは遺伝子送達媒体を用いて送達することができる。遺伝子送達媒体はウイルスまたは非ウイルス由来のものであってもよい（一般に、「Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51」、「Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845」、「Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185」

および「Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148」を参照)。そのようなコード配列の発現は、内在性の哺乳類もしくは異種性プロモーターおよび／またはエンハンサーを用いて誘導することができる。コード配列の発現は構成的発現または調節発現のいずれであってもよい。

【０１３８】

所望のポリヌクレオチドの送達および所望の細胞における発現のためのウイルス系ベクターは当該技術分野において周知である。例示的なウイルス系媒体としては、限定されるものではないが、組換え型レトロウイルス（例えば、ＰＣＴ出願の国際公開第９０／０７９３６号、国際公開第９４／０３６２２号、国際公開第９３／２５６９８号、国際公開第９３／２５２３４号、国際公開第９３／１１２３０号、国際公開第９３／１０２１８号、国際公開第９１／０２８０５号、米国特許第５，２１９，７４０号および第４，７７７，１２７号、英国特許第２，２００，６５１号および欧州特許第０３４５２４２号を参照）、αウイルス系ベクター（例えば、シンドビスウイルスベクター、セムリキ森林ウイルス（ATCC VR-67、ATCC VR-1247）、ロスリバーウイルス（ATCC VR-373、ATCC VR-1246）およびベネズエラウマ脳炎ウイルス（ATCC VR-923、ATCC VR-1250、ATCC VR1249、ATCC VR-532））およびアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター（例えば、ＰＣＴ出願の国際公開第９４／１２６４９号、国際公開第９３／０３７６９号、国際公開第９３／１９１９１号、国際公開第９４／２８９３８号、国際公開第９５／１１９８４号および国際公開第９５／００６５５号を参照）が挙げられる。Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147に記載されている死滅したアデノウイルスに結合されたＤＮＡの投与も用いることができる。

【０１３９】

非ウイルス送達媒体および方法も用いることができ、限定されるものではないが、死滅したアデノウイルスに結合されたか結合されていないポリカチオン性凝縮ＤＮＡ単独（例えば、「Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147」を参照）、リガンドに結合されたＤＮＡ（例えば、「Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985」を参照）、真核細胞送達媒体細胞（例えば、米国特許第５，８１４，４８２号、ＰＣＴ出願の国際公開第９５／０７９９４号、国際公開第９６／１７０７２号、国際公開第９５／３０７６３号および国際公開第９７／４２３３８号を参照）および核酸電荷中和または細胞膜との融合が挙げられる。剥き出しのＤＮＡも用いることができる。例示的な剥き出しのＤＮＡ導入方法についてはＰＣＴ出願の国際公開第９０／１１０９２号および米国特許第５，５８０，８５９号に記載されている。遺伝子送達媒体として機能することができるリポソームについては、米国特許第５，４２２，１２０号、ＰＣＴ出願の国際公開第９５／１３７９６号、国際公開第９４／２３６９７号、国際公開第９１／１４４４５号および欧州特許第０５２４９６８号に記載されている。さらなる手法については、「Philip, Mol. Cell. Biol. (1994) 14:2411」および「Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581」に記載されている。

【０１４０】

本明細書に記載されている方法に使用される特定の投与計画すなわち用量、タイミングおよび反復は、特定の対象およびその対象の病歴によって決まる。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、２種以上の抗体または抗体と別の好適な治療薬との組み合わせをその治療を必要としている対象に投与してもよい。本抗体を当該薬剤の有効性を促進および／または補完するように機能する他の薬剤と併用することもできる。

【０１４２】

標的疾患／障害のための治療有効性を当該技術分野において周知である方法によって評価することができる。

【０１４３】

接触系活性化に関連する疾患を軽減するのに使用されるキット

本開示は、ＨＡＥなどの接触系活性化に関連する疾患／障害を軽減するのに使用されるキットも提供する。そのようなキットは、抗ＦＸＩＩａ抗体、例えば本明細書に記載されている抗体のいずれかを含む１つ以上の容器を含むことができる。

【０１４４】
いくつかの実施形態では、当該キットは本明細書に記載されている方法のいずれかによる使用のための説明書を含むことができる。含まれる説明書は、本明細書に記載されている標的疾患を治療するかその発症を遅らせるかそれを軽減するための抗ＦＸＩＩａ抗体の投与に関する説明を含むことができる。当該キットは、その個体が標的疾患を有するか否かの特定に基づく治療に適した個体の選択に関する説明をさらに含んでいてもよい。さらに他の実施形態では、当該説明書は標的疾患のリスクがある個体への抗体の投与に関する説明を含む。
【０１４５】
抗ＦＸＩＩａ抗体の使用に関する説明書は一般に、目的の治療のための投与量、投与スケジュールおよび投与経路に関する情報を含む。当該容器は、単位用量、大量包装（例えば、複数用量包装）またはサブ単位用量であってもよい。本発明のキットに入れて提供される説明書は、典型的にラベルまたは添付文書上の書面による説明書（例えば、当該キットに含まれている紙のシート）であるが、機械可読な説明書（例えば、磁気または光学記憶ディスク上に保存された説明書）も許容される。
【０１４６】
ラベルまたは添付文書は、当該組成物がＨＡＥなどのｐＫａｌシグナル伝達経路に関連する疾患または障害を治療するため、その発症を遅らせるため、および／またはそれを軽減するために使用されることを示している。説明書は本明細書に記載されている方法のいずれかを実施するために提供されていてもよい。
【０１４７】
本発明のキットは好適な包装の中にある。好適な包装としては、限定されるものではないが、バイアル、瓶、広口瓶、フレキシブル包装（例えば、シールドマイラーまたはプラスチック袋）などが挙げられる。吸入器、経鼻投与装置（例えばアトマイザー）またはミニポンプなどの輸液用器具などの特定の装置と組み合わせて使用される包装も想定される。キットは無菌のアクセス口を有していてもよい（例えば、当該容器は皮下注射針によって穿刺可能な栓を有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであってもよい）。また当該容器も無菌のアクセス口を有していてもよい（例えば、当該容器が皮下注射針によって穿刺可能な栓を有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであってもよい）。当該組成物中の少なくとも１種の活性薬剤は本明細書に記載されている抗ＦＸＩＩａ抗体である。
【０１４８】
キットは任意に緩衝液および説明情報などのさらなる構成要素を提供してもよい。通常、当該キットは、容器および容器の上またはそれに付随するラベルまたは添付文書を含む。いくつかの実施形態では、本発明は上記キットの内容物を含む製造物品を提供する。
【０１４９】
一般的な技術
本発明の実施では、特に明記しない限り、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来の技術を用い、それらは当業者の技量の範囲内である。そのような技術は、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual（分子クローニング：実験書），第２版（Sambrookら，1989）Cold Spring Harbor Press」、「Oligonucleotide Synthesis（オリゴヌクレオチドの合成）（M. J. Gait編，1984)」、「Methods in Molecular Biology（分子生物学における方法），Hum ana Press」、「Cell Biology: A Laboratory Notebook（細胞生物学：実験ノート）（J. E. Cellis編，1998）Academic Press」、「Animal Cell Culture（動物細胞培養）（R. I. Freshney編，1987)」、「Introduction to Cell and Tissue Culture（細胞および組織培養の入門書）（J. P. MatherおよびP. E. Roberts，1998）Plenum Press」、「Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures（細胞および組織培養：実験室法）（A. Doyle，J. B. GriffithsおよびD. G. Newell編，1993-8）J. Wiley and Sons」、「Methods in Enzymology（酵素学における方法）（Academic Press，Inc.)」、「Handbook of Experimental Immunology（実験免疫学のハンドブック）（D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編)」、「Gene Transfer Vect

ors for Mammalian Cells（哺乳類細胞のための遺伝子導入ベクター）(J. M. MillerおよびM. P. Calos編, 1987)」、「Current Protocols in Molecular Biology（分子生物学における現在の手順）(F. M. Ausubelら編, 1987)」、「PCR: The Polymerase Chain Reaction（ＰＣＲ：ポリメラーゼ連鎖反応）(Mullisら編, 1994)」、「Current Protocols in Immunology（免疫学における現在の手順）(J. E. Coliganら編, 1991)」、「Short Protocols in Molecular Biology（分子生物学における短いプロトコル）(Wiley and Sons, 1999)」、「Immunobiology（免疫生物学）(C. A. JanewayおよびP. Travers, 1997)」、「Antibodies（抗体）(P. Finch, 1997)」、「Antibodies: a practical approach（抗体：実践的なアプローチ）(D. Catty.編, IRL Press, 1988-1989)」、「Monoclonal antibodies: a practical approach（モノクローナル抗体：実践的なアプローチ）(P. ShepherdおよびC. Dean編, Oxford University Press, 2000)」、「Using antibodies: a laboratory manual（抗体の使用、実験書）(E. HarlowおよびD. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)」、「The Antibodies（抗体）(M. ZanettiおよびJ. D. Capra編, Harwood Academic Publishers, 1995)」などの文献に十分に説明されている。

【０１５０】

さらなる詳細がなくとも、当業者であれば上記説明に基づき本発明を最大限に利用することができるものと思われる。従って、以下の具体的な実施形態は単なる例示として解釈されるべきであり、いかなる場合であっても決して本開示の残りの部分を限定するものではない。本明細書で引用されている全ての刊行物は、本明細書で言及されている目的または主題のために参照により組み込まれる。

【実施例】

【０１５１】

実施例１：抗ＦＸＩＩａ抗体の産生

【０１５２】

ストレプトアビジンで被覆したビーズ上に固定化されたＦＸＩＩａのビオチン化β断片を用いて、Dyax’s FAB310ファージミドライブラリーを用いるファージディスプレイ選択を行った。固定化されたＦＸＩＩａに結合したＦａｂ分子を単離した。この選択により、８００ｐＭのK_{i}^{app}でＦＸＩＩａの触媒ドメインに特異的に結合する選択的Ｆａｂ阻害剤を作製した。単離したＦａｂは、１μＭの濃度で試験した以下のプロテアーゼ：ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子、肝細胞増殖因子活性化因子、活性化タンパク質Ｃ、カテプシンＧ、Ｃ１ｓ、エラスターゼ、第ＶＩＩａ因子、第Ｘａ因子、第ＸＩａ因子、プラスミン、トロンビンα、トリプシン、ウロキナーゼ、血漿カリクレイン、肝細胞増殖因子活性化因子およびウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子に対して交差反応性を示さなかった。

【０１５３】

重鎖ＣＤＲ１／２シャッフリング、軽鎖シャッフリング、重鎖ＣＤＲ３のゆらぎ、および重鎖ＣＤＲ３のゆらぎと重鎖ＣＤＲ１／２シャッフリングとの組み合わせを含む複数の戦略により、単離したＦａｂすなわちＭ７１－Ｆ０６を親和性成熟させた。Ｍ７１－Ｆ０６のＣＤＲ１／２領域を除去し、かつそれを十分なライブラリー多様性で置き換えて約10^{8}の多様性を有する親和性成熟ライブラリーを作製することにより、重鎖ＣＤＲ１／２シャッフリングライブラリーを構築した。重鎖ＣＤＲ３を各アミノ酸位置でＭ７１－Ｆ０６の親のＣＤＲ３配列から変化させて新しいライブラリーを作製し、その後にこれもHC CDR１／２シャッフリング多様性と組み合わせた。これらのライブラリーを用いて第２の選択を行った。そのままのライブラリー選択のために使用されるような固定化されたＦＸＩＩａを用いて行われる選択とは対照的に、親和性成熟ライブラリーを親のK_{i}^{app}よりも低い濃度でビオチン化された標的と共に溶液中でインキュベートした。その後に、ビオチン化されたＦＸＩＩａおよびライブラリーからのあらゆる結合したＦａｂをストレプトアビジンで被覆したビーズから外した。図２は抗ＦＸＩＩａ抗体の同定および産生のための選択戦略の概略図を示す。

【０１５４】

以下の実施例２に記載されている「生体外」活性アッセイによって決定されるヒトおよびマウスＦＸＩＩａに対するクローンＭ７１－Ｆ０６の阻害活性が図４に示されている。ＤＸ－２９３０と比較した際のクローンＭ７１－Ｆ０６のＡＰＴＴ値（以下の実施例２を参照）が図５に示されている。その結果は、クローンＭ７１－Ｆ０６が活性化タンパク質Ｃ、CCC 1s、カテプシンＧ、エラスターゼ、第ＶＩＩａ因子、第Ｘａ因子、第ＸＩａ因子、活性化血漿カリクレイン、プラスミン、トロンビンα、トリプシン、ウロキナーゼ、ＨＧＦＡおよびｕＰＡに対して阻害活性を有していないことも示し、これはその阻害活性がＦＸＩＩａに特異的であることを示している。

【０１５５】

選択から得られたあらゆる単離ＦａｂをＥＬＩＳＡによってスクリーニングし、３９種の独特な単離物が得られた。重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列は上に示されている。これらのクローンは、より高い結合親和性を有する親クローンと同じ抗原結合活性および特異性を有することが期待される。

【０１５６】

実施例２：抗ＦＸＩＩａ抗体の特性評価

【０１５７】

方法：

活性化部分トロンボプラスチン時間（ＡＰＴＴ）アッセイ

阻害剤（または対照希釈緩衝液＝２５ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）、１２５ｍＭのＮａＣｌ）を純血漿に添加して１：１の混合物にし、３７℃で５分間予め平衡化させた。２×５０μｌのこの混合物を２つの別個のＫＣ４デルタアッセイキュベット（金属球を有する）に分注した。６０秒後に、５０μｌのＡＰＴＴ試薬（活性化剤、Pacific Hemostasis APTT-XL）を回転キュベットに添加し、かつＡＰＴＴ添加（ｔ＝０秒）から１８０秒後に、５０μｌの$CaCl_2$を添加した。ＫＣ４デルタ機器で凝固時間（秒）を記録した。

【０１５８】

プロトロンビン時間（ＰＴ）アッセイ

阻害剤（または対照希釈緩衝液＝２５ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）、１２５ｍＭのＮａＣｌ）を純血漿に添加して１：１の混合物にし、３７℃で５分間予め平衡化させた。２×５０μｌのこの混合物を２つの別個のＫＣ４デルタアッセイキュベット（金属球を有する）に分注した。４分後、ＰＴ活性化剤（Pacific Hemostasis Thromboplastin D）を添加した（ｔ＝０秒）。凝固時間をＫＣ４デルタ機器で自動的に記録した。

【０１５９】

精製した成分の阻害アッセイ

精製した成分の阻害アッセイが図３に示されている（パネル１）。９６ウェルマイクロプレートにおいて２０ｐＭのＦＸＩＩａを様々な濃度の阻害剤と共に３０℃で１時間インキュベートした。１０ｎＭのプレカリクレインを３０℃で２０分間添加した後、１００ｎＭのコーントリプシン阻害剤（ＣＴＩ）と共に５分間インキュベートした。次いで、１０μＭの最終蛍光発生ペプチド基質（ＰＦＲ－ＡＭＣ）の添加によってタンパク質分解を経時的に評価し、その際、基質タンパク質分解の初速度（ｙ軸）を阻害剤濃度（ｘ軸）に対してプロットし、得られたデータを強結合阻害剤のために修正されたモリソン式（式１）に当てはめた。全ての試薬をアッセイ緩衝液（＝２０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、０．１％のＰＥＧ－８０００および０．１％のTriton X-100）で希釈した。

【０１６０】

血漿阻害アッセイ

血漿阻害アッセイが図３に示されている（パネル２）。貯蔵した正常なヒトの血漿をアッセイ緩衝液（上記）で１：４０に希釈し、阻害剤を様々な濃度で９６ウェルマイクロプレートに室温で添加した。次いで、２５％（２．５％の最終）エラグ酸を添加して接触活性化を開始させ、マイクロプレートを穏やかに振盪させて混合し、そのまま室温で２分間反応を進行させ、その後に１００ｎＭのＣＴＩを添加した。次いで、１０μｌのこの混合

物を取り出して、３０℃で予め平衡化させた８０μｌのアッセイ緩衝液を含む反復マイクロプレートに入れた。次いで、この希釈プレートを３０℃でさらに５分間インキュベートし、標準的なIC_{50}の式への曲線当てはめのためにＸ軸に阻害剤の逆算した濃度を使用したこと以外は（最終のアッセイ読み取りでは血漿を１：４００に希釈した）、ＰＦＲ－ＡＭＣのタンパク質分解を上記のとおり評価した。

【０１６１】

本明細書に開示されている１種以上の抗ＦＸＩＩａ抗体を非ヒト霊長類モデルにおいても２種類の異なる投与量で試験した。この研究を３０日間行い、その後、血液試料を取り出して薬物動態学、ＡＰＴＴに対する効果および血漿カリクレイン活性化に対する効果をウェスタンブロット分析によって評価した。

【０１６２】

結合優先アッセイ

抗ＦＸＩＩａ抗体の結合優先を決定するために、各抗体をＦＸＩＩ酵素前駆体（接触／凝固系の他の関連するプロテアーゼ）と共にインキュベートした。次いで、結合親和性をＢｉａｃｏｒｅバイオセンサーを用いて表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）分析によって評価した。図３のパネル３を参照されたい。

【０１６３】

流れモデル／毛管閉塞アッセイ

本抗体を生体外流れモデルで試験し、ここでは本抗体を添加したヒトの血液をコラーゲン被覆した毛細管に異なる流速で通す。蛍光によって血小板およびフィブリン沈着を評価する。この系では、酵素前駆体である第ＸＩ因子または第ＸＩＩ因子に結合する抗体によって血小板およびフィブリン沈着は阻害される。典型的な実験では、血液の流れを開始する前に本抗体をそれらの標的に結合させる。

【０１６４】

マウス血栓症モデル

塩化第二鉄によって誘発される頸動脈血栓症のマウスモデルにおいて本抗体を試験する。このモデルに、Ｃ５７Ｂｌ／６マウスにおいて一貫して血栓形成を誘発する最も低い濃度（３．５％）で開始する異なる$FeCl_3$濃度を組み入れる。本抗体が低い$FeCl_3$濃度で抗血栓効果を示す場合、本抗体の抗血栓効果が他の濃度を凌ぐまで徐々により高い濃度を試験する。

【０１６５】

結果：

３９種の抗ＦＸＩＩａ抗体単離物を各種生体外活性アッセイで試験して、以下の特性：見かけのK_i、IC_{50}、ＦＸＩＩ酵素前駆体への結合などの結合優先、接触／凝固系における他の関連するプロテアーゼとの交差反応性、近縁である配列相同体との交差反応性、血漿カリクレイン（ｐＫａｌ）産生に対する効果、ヒトの血漿における活性、部分トロンボプラスチン時間（ＰＴ）、活性化部分トロンボプラスチン時間（ＡＰＴＴ）およびトロンビン産生に対する遅れ時間を決定した。

【０１６６】

アッセイの結果を表３に示す。３９種の単離物全てがＰＴに対して影響を与えることなくＡＰＴＴを遅らせることが分かった。３９種の親和性成熟された全ての単離物がそれぞれ、親の単離物よりも１０～１００倍向上した$K_{i\,app}$を示した。本抗体は、２種類の独立した阻害アッセイ、すなわち精製した成分の阻害アッセイおよび血漿阻害アッセイで測定した場合にｐＫａｌ産生を減少させた。

【０１６７】

ＳＰＲ分析（Ｂｉａｃｏｒｅ）によれば、本抗体はＦＸＩＩ酵素前駆体には結合せず、全長ＦＸＩＩａに対して試験した場合に触媒ドメインに対して特異性を示した。本抗体はＦＸＩのＦＸＩａへの活性化も防止した。

【表３】

単離物	血漿K_{i}^{app}（ｎＭ）	ＡＰＴＴ（倍数遅れ）	Ki^{app} (pM)
M0191-E09	31	3.70	5
M0183-C03	33	3.17	6
M0184-F12	38	3.74	4
M0183-H08	76	3.36	5
M0182-D04	96	3.13	11
M0192-H11	101	3.33	6
M0292-D07	115	3.11	14
M0183-D08	118	2.08	11
M0192-F07	125	3.00	7
M0192-G03	125	3.14	18
M0310-C06	135	2.46	57
M0192-F01	174	3.18	8
M0191-A03	176	2.88	13
M0192-A01	198	3.11	17
M0191-H10	216	3.81	13
M0177-C12	217	3.86	18
M0184-B04	269	3.76	8
M0308-H03	275	3.38	18
M0192-D02	279	3.30	5
M0310-G07	295	4.48	22
M0192-F06	304	3.49	9
M0310-A04	316	3.48	15
M0310-F02	319	1.86	106
M0310-B09	331	3.73	12
M0310-G06	353	3.18	7
M0182-H01	359	N/A	N/A
M0178-A08	381	3.26	7
M0184-D01	435	3.32	4
M0177-A06	458	4.08	17
M0191-E04	460	3.59	7
M0191-H09	463	3.61	16
M0192-H04	485	3.51	9
M0192-A03	514	3.34	13
M0310-G08	796	2.76	24
M0192-G05	852	3.38	15
M0183-B12	1004	3.06	11
M0308-F04	1570	3.29	17
M0182-B04	N/A	N/A	N/A
M0310-F04	N/A	N/A	N/A

【０１６８】

ヒトＦＸＩＩａに対するクローンＭ０１９２－Ｈ１１の阻害活性が図２１に示されており、約４．７±０．６ｐＭであることが分かった。

【０１６９】

抗ＦＸＩＩａ抗体Ｍ１９２－Ｈ１１およびＭ１９２－Ｅ０９もラットの生体内薬物動態実験で試験した。ラットの群に２０ｍｇ／ｋｇの抗ＦＸＩＩａ抗体Ｍ１９１－Ｅ０９またはＭ１９２－Ｈ１１のいずれかを注射した。注射後の様々な日数後に、試料をラットから採取し、抗ＦＸＩＩａ抗体の濃度および薬物動態学的パラメーターを評価した（図６および表４）。

【表４】

抗体Ｍ１９２－Ｈ１１およびＭ１９１－Ｅ０９の薬物動態特性

例示的な抗体	Cmax (μg/mL)	AUClast (時間*μg/mL)	CI (ml/時間/kg)	Vss (mL/kg)	$t_{1/2}$ (時間)
M192-H11	360	18375	0.92	242	220
M191-E09	269	7612	2.28	489	218

【０１７０】

実施例３：抗ＦＸＩＩａ抗体５５９Ｃ－Ｘ２１１－Ａ０１の発現および特性評価

【０１７１】

５５９Ｃ－Ｘ２１１－Ａ０１は、先に記載した親抗体５５９Ｃ－Ｍ７１－Ｆ０６の親和性成熟された部分的に生殖系列の抗体である。この抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列を以下に示す。

５５９Ｃ－Ｘ２１１－Ａ０１＿ＨＶ（ＣＤＲは下線および太字で示されている）

【化４６】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **QYVMH** WVRQAPGKGLEWVS
SIWPSGGHTRYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR
QRYRGPKYYYYMDV WGKGTTVTVSS （配列番号１２５）

５５９Ｃ－Ｘ２１１－Ａ０１＿ＬＶ（ＣＤＲは下線および太字で示されている）

【化４７】

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC **RSSQSLLHSNGYNYLD** WYLQKPGQSPQLLIY
LGSNRAS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC **MQALQTPWT**
FGQGTKVEIK （配列番号１２６）

【０１７２】

各種生体外活性アッセイにおいて５５９Ｃ－Ｘ２１１－Ａ０１を試験して、以下の特性：見かけのK_i、IC_{50}、ＦＸＩＩ酵素前駆体への結合、接触／凝固系における他の関連するプロテアーゼとの交差反応性、近縁である配列相同体との交差反応性、血漿カリクレイン（ｐＫａｌ）産生に対する効果およびヒトの血漿における活性を決定した。マウスの血漿における部分トロンボプラスチン時間（ＰＴ）および活性化部分トロンボプラスチン時間（ＡＰＴＴ）も生体外で試験した。

【０１７３】

交差反応性アッセイ

５５９Ｃ－Ｘ２１１－Ａ０１は、１μＭで試験したプロテアーゼ、すなわちウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子、ヒト増殖因子活性化因子、活性化タンパク質Ｃ、カテプシンＧ、Ｃ１ｓ、エラスターゼ、第ＶＩＩａ因子、第Ｘａ因子、第ＸＩａ因子、プラスミン、トロンビンα、トリプシン、ウロキナーゼおよび血漿カリクレインに対して交差反応性を示さなかった。

【０１７４】
活性化部分トロンボプラスチン時間（ＡＰＴＴ）およびプロトロンビン時間アッセイ
阻害剤（または対照希釈緩衝液＝２５ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）、１２５ｍＭのＮａＣｌ）をマウスおよびヒトの純血漿の両方に添加して１：１の混合物にし、３７℃で５分間予め平衡化させた。２×５０μｌのこの混合物を２つの別個のＫＣ４デルタアッセイキュベット（金属球を有する）に分注した。６０秒後、５０μｌのＡＰＴＴ試薬（活性化剤、Pacific Hemostasis APTT-XL）を回転キュベットに添加し、この（ｔ＝０秒）１８０秒後に、５０μｌの$CaCl_2$を添加した。ＫＣ４デルタ機器で凝固時間（秒）を記録した。
【０１７５】
４分後でないこと以外は上記のとおり、２×５０μｌの阻害剤／血漿混合物を２つの別個のＫＣ４デルタアッセイキュベットに分注し、ｔ＝０秒においてＰＴ活性化剤（Pacific Hemostasis Thromboplastin D）を添加した。ＫＣ４デルタ機器で凝固時間を自動的に記録した。
【０１７６】
５５９Ｃ－Ｘ２１１－Ａ０１はマウス血漿においてＡＰＴＴを遅らせるが、ＰＴに対して影響は与えていない（図７）。このデータはマウスの第ＸＩＩ因子との種間交差反応を支持している。
【０１７７】
精製した成分の阻害アッセイ：
９６ウェルマイクロプレートにおいて、２０ｐＭのＦＸＩＩａを様々な濃度の阻害剤と共に３０℃で１時間インキュベートした。次いで、１０ｎＭのプレカリクレインを３０℃で２０分間添加し、その後、１００ｎＭのコーントリプシン阻害剤（ＣＴＩ）と共に５分間インキュベートした。次いで、１０μＭの最終蛍光発生ペプチド基質（ＰＦＲ－ＡＭＣ）を添加してタンパク質分解を経時的に評価し、その際、基質タンパク質分解（ｙ軸）の初速度を阻害剤濃度（ｘ軸）に対してプロットし、得られたデータを強結合阻害剤について修正されたモリソン式に当てはめた。全ての試薬をアッセイ緩衝液（＝２０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、０．１％のＰＥＧ－８０００および０．１％のTriton X-100）で希釈した。
【０１７８】
血漿阻害アッセイ：
貯蔵したヒトの正常血漿をアッセイ緩衝液（上記）で１：４０に希釈し、様々な濃度の阻害剤を９６ウェルマイクロプレートに室温で添加した。次いで、２５％（２．５％の最終）ＡＰＴＴ－ＸＬ試薬（希釈エラグ酸、Pacific Hemostasis）を添加して接触活性化を開始させ、マイクロプレートを穏やかに振盪させて混合し、そのまま室温で２分間反応を進行させ、その後に１００ｎＭのＣＴＩを添加した。次いで、１０μｌのこの混合物を取り出して、３０℃で予め平衡化させた８０μｌのアッセイ緩衝液を含む反復マイクロプレートに入れた。次いで、この希釈プレートを３０℃でさらに５分間インキュベートし、標準的なＩＣ５０の式および／または修正されたモリソン式への曲線当てはめのためにＸ軸に阻害剤の逆算した濃度を使用したこと以外は（最終のアッセイ読み取りでは血漿を１：４００に希釈した）、上記のとおりＰＦＲ－ＡＭＣのタンパク質分解を評価した。
【０１７９】
上記アッセイで観察された５５９Ｃ－Ｘ２１１－Ａ０１の活性を以下の表５にまとめる。

【表５】

５５９Ｃ－Ｘ２１１－Ａ０１の活性

単離物	血漿ＩＣ５０（ｎＭ）	ヒトの血漿中に１μＭのＸ２１１－Ａ０１を用いた場合のＡＰＴＴ（倍数遅れ）	マウスの血漿中に１μＭのＸ２１１－Ａ０１を用いた場合のＡＰＴＴ（倍数遅れ）	Ki^{app} (pM)
559C-X211-A01	289	3.4	2.8	5

【０１８０】
ＳＰＲ分析によれば、この抗体はＦＸＩＩａに結合し、かつＦＸＩＩ酵素前駆体には結合しない。ＦＸＩＩａ－βによる酵素阻害実験は触媒ドメインへの特異的標的化を示す。
【０１８１】
５５９Ｃ－Ｘ２１１－Ａ０１はフィブリンの生成および沈着を減少させ、流れモデル／毛管閉塞アッセイにおいて血液がコラーゲン被覆した毛細管を閉塞するのに要する時間を引き延ばし、かつ／または血小板凝集および動脈閉塞の発生を減少させることが期待される。５５９Ｃ－２１１－Ａ０１は、血栓症のマウスモデルおよび血栓症の非ヒト霊長類モデルの両方において血栓形成の発生を減少させることが期待される。
【０１８２】
実施例４：ＤＸ－４０１２を用いた生体内血栓症研究
【０１８３】
薬物動態研究
循環系中の本抗体の存在の薬力学的マーカーとして、健康なヒヒにおいて単回投与のＤＸ－４０１２の抗凝固効果を評価した。これらの動物を穏やかに鎮静させ、ベースライン凝固値のために肘前の静脈から血液を採取した。次いで、本抗体を飽和用量で投与した。単回投与の本抗体を静脈内に送達させ、ベースラインに対してＡＰＴＴアッセイで抗凝固を確認することができる限り各時点で血液試料を採取した。また、さらなる試験のために血漿試料を凍結した。
【０１８４】
ヒヒにおける薬物動態学的研究の完了および本抗体の有効な半減期の決定後に、薬力学的血栓症および止血研究を続行した。
【０１８５】
薬力学的血栓症研究
抗凝固の前および間に急性血栓症および止血実験を行って、陽性および陰性対照と比較して単回飽和用量における本抗体の有効性および安全性を決定した。血管グラフトセグメントを慢性の表在化大腿ＡＶシャントの中に展開させることで、訓練したヒヒにおいて血栓症実験を行った。研究の各日に、連続的な出血時間、体積測定および抗凝固アッセイのために、１ｍＬのクエン酸塩添加血液をシャントループから各時点で採取した。試料採取時間は、薬物前（動物がエノキサパリンまたはＤＸ－４０１２を接種する日であってエノキサパリンまたはＤＸ－４０１２の投与前）、研究前（研究開始の５分前）および研究後（シャントループを除去するときである研究終了の５分前）を含む。血栓症および止血実験の前に、ヒヒに^{111}Ｉｎで放射性標識した自己由来の血小板および^{125}Ｉで放射性標識したフィブリノーゲンを投与した。ＤＸ－４０１２の抗血栓活性をエノキサパリン（低分子ヘパリン）の活性と比較した。
【０１８６】
ベースライン血液試料を採取した後、血栓症実験を開始した。ケイ素管を用いて慢性ＡＶシャントを時間的に引き伸ばし（６０分間）、短いコラーゲンｅＰＴＦＥグラフトセグメントまたは組織因子被覆したｅＰＴＦＥ血管グラフトセグメント（２０ｍｍ）を外部ＡＶループ内に展開させた（図１０）。血栓がグラフト（血栓頭部）内に形成され、遠位側（血栓尾部）に拡大していた。グラフト内の放射性標識した血小板の蓄積をガンマカメラでの画像化を用いてリアルタイムで６０分間監視し、５分間隔でグラフト内に存在する血

小板の数として計算した。グラフト潅流の６０分後にグラフトを除去し、シャントを再接続し、^{111}Ｉｎの減衰後（３０＋日－約１０半減期後）に、６０分（エンドポイント）でグラフト内に沈着したフィブリンの量を測定した。フィブリンおよび血小板数は血栓のサイズを表す。

【０１８７】

結果

実施例２および３に記載されているようにＡＰＴＴおよびＰＴアッセイを行った。ＡＰＴＴはクエン酸塩添加血漿、SynthA Sil（登録商標）（Instrumentation Laboratories）試薬およびＫＣ－４凝固計を用いて測定した。ＰＴはクエン酸塩添加血漿、Ｄａｄｅ（登録商標）Ｉｎｎｏｖｉｎ（登録商標）試薬（Ｓｉｅｍｅｎｓ社）およびＫＣ－４凝固計を用いて測定した。血液採取および血小板の少ない血漿を生成するための血液試料の遠心分離の直後に、ＡＰＴＴおよびＰＴの両方を測定した。ＤＸ－４０１２の投与の１時間後に測定したＡＰＴＴの倍数変化は２．２倍（＞２．２倍と予測）であった。２４～４８時間後に測定したＡＰＴＴの倍数変化は１．８倍（１．８～２．０倍と予測）であり、１週間後に測定したＡＰＴＴの倍数変化は１．３倍（１．３～１．５倍と予測）であった。ＰＴについては変化が全く観察されなかった。

【０１８８】

コラーゲングラフト

血栓症研究のために、動物に１０ｍｇ／ｋｇの抗体ＤＸ－４０１２を投与し、抗体投与から１時間、２４時間、４８時間、１６８時間および１９２時間後に本研究を行った。分析のために、２４時間および４８時間の時点からのデータを１つにまとめ、１６８時間および１９２時間の時点からのデータを１つにまとめた。予期したとおりに、対照動物はコラーゲンで惹起されたベースラインの血栓頭部を形成した。エノキサパリンを摂取した動物では血栓頭部は有意に減少した。抗体投与から最大４８時間の時点で、対照動物に対して血栓頭部のサイズは減少し、エノキサパリンを摂取した動物のサイズに匹敵していた。抗体投与から１週間（１６８～１９２時間）後に、血栓頭部のサイズは対照動物のサイズに匹敵していた（図１１Ａ）。抗体投与から最大４８時間の時点で、血栓尾部はほぼ消失しており、エノキサパリンを摂取した動物の状態に匹敵していた。抗体投与から１週間（１６８～１９２時間）後に、血栓尾部は減少したままであったがエノキサパリン治療後よりも少ない程度の減少であった（図１１Ｂ）。

【０１８９】

別の実験では、抗体投与から最大４８時間後の時点で、血栓頭部のサイズは対照動物に対して減少し、エノキサパリンを摂取した動物のサイズに匹敵していた。抗体投与から１週間（１６８～１９２時間）後に、血栓頭部のサイズは減少したままであったがエノキサパリン治療後よりも少ない程度の減少であった（図１２）。図１３は血栓形成（総血栓）を示し、血栓形成が抗体投与から１時間、２４時間および４８時間後に同等であったことを示している。血栓増加率（５分間隔での血小板沈着）が図１４に示されている。対照血栓はプラトーに達する前の最初の３０分で増加率の上昇を示した。エノキサパリン治療後の増加率は２０分でより低いプラトーに達し、４０分後に減少し始め、６０分後に溶解した（マイナスの増加率）。ＤＸ－４０１２投与後の最初の４８時間以内に、増加率は１５～２０分でプラトーに達し、低い増加率を示した。抗体投与から１週間後に、血栓の量は早期の時点（１時間および２４～４８時間）と対照との間の量であった。

【０１９０】

全体として、１０ｍｇ／ｋｇのＤＸ－４０１２の投与によりコラーゲン惹起によって形成される血栓のサイズが減少し、その効果が血栓頭部のサイズおよび血栓尾部の両方で認められた。血栓サイズの減少が抗体投与から最大４８時間後に観察され、エノキサパリン治療（１ｍｇ／ｋｇ）に匹敵していた。１週間後に、血栓頭部は本抗体を摂取した動物においてベースラインに戻ったが、血栓尾部のサイズは低い状態のままであった。

【０１９１】

組織因子グラフト

一般に血栓サイズは、コラーゲン被覆したシャントと比較して組織因子被覆したシャントにおいて非常に大きく変化しやすい。記載されている実験では大きなばらつきが観察された（７．４、１４．０および２．３億個の血小板）。予期したとおりに、対照動物は組織因子で惹起されたベースラインの血栓頭部を形成した。エノキサパリンを摂取した動物において血栓頭部は有意に減少した。抗体投与から最大４８時間後の時点で、血栓頭部のサイズは対照動物のサイズに匹敵していた（図１５Ａ）。抗体投与から１週間（１６８～１９２時間）後に、血栓頭部のサイズは大きく変化した。エノキサパリン治療により組織因子で惹起された血栓尾部の形成はほぼ消失した。抗体治療を受けた動物において有意な血栓尾部の減少は認められなかったが、そのデータは血栓尾部の僅かな減少傾向が認められることを示唆した（図１５Ｂ）。

【０１９２】

別の実験では、エノキサパリン治療により、主として血栓尾部がほぼ消失したために血栓サイズの５０％超の減少が生じた。抗体治療を受けた動物において有意な血栓尾部の減少は認められなかったが、そのデータは血栓尾部の僅かな減少傾向が認められることを示唆した（図１６）。図１７は血栓形成（総血栓）を示す。そのデータのRM ANOVA分析を行って、対照と比較した場合に抗体治療から１時間後に総血栓サイズの減少が認められることが分かった。血栓増加率（５分間隔での血小板沈着）は図１８に示されている。対照血栓はプラトーに達する前の最初の３０分で増加率の上昇を示した。エノキサパリン治療後の増加率は２０分でプラトーに達し、４０分後に減少し始め、６０分後に溶解した（マイナスの増加率）。ＤＸ－４０１２投与後の最初の４８時間以内に、血栓増加率は対照動物において観察された増加率と同様であった（図１８）。

【０１９３】

全体として、１０ｍｇ／ｋｇのＤＸ－４０１２の投与は、組織因子で惹起された血栓形成において血栓頭部のサイズに影響を与えず、血栓尾部のサイズに対する影響も僅かであった。

【０１９４】

末端フィブリン含有量および血小板沈着

実験の終了時に、シャントを生理食塩水で洗い流し、画像を取得して最終血小板数を評価した。血栓頭部および尾部のフィブリン含有量分析のためにループも保存した。

【０１９５】

エノキサパリンを摂取した動物において末端の血栓サイズは減少した。ＤＸ－４０１２を摂取した動物でもコラーゲン被覆したシャントにおける血小板沈着およびフィブリン含有量の両方を測定した場合に血栓サイズが有意に減少したが、組織因子被覆したシャントでは減少しなかった（図１９Ａおよび図１９Ｂ）。

【０１９６】

止血研究

ＦＤＡによって認可されているＳｕｒｇｉｃｕｔｔ（商標）出血時間装置およびプロトコルを用いて止血を測定した。血液体積も測定した。研究日ごとに１回の出血時間および出血体積測定を行った。図２２Ａおよび図２２Ｂに示すように、ＤＸ－４０１２は、エノキサパリンと比較した場合に出血時間および出血体積の減少において有効であった。

【０１９７】

実施例５：ＤＸ－４０１２－ＦＸＩＩａ複合体の結晶構造に基づくＦＸＩＩａの触媒ドメインにおける必須残基の同定

【０１９８】

大腸菌における通常の組換え技術によりＤＸ－４０１２の組換え型Ｆａｂ断片を調製して精製した。通常の方法によりＦＸＩＩａを産生および精製した。

【０１９９】

ＤＸ－４０１２のＦａｂ断片およびＦＸＩＩａを好適な条件下で各種濃度で混合し、Ｆａｂ－ＦＸＩＩａ複合体を形成した。ＳＥＣを用いて複合体を精製し、図２０に示すトレースで可視化した。

【０２００】
Ｆａｂ－ＦＸＩＩａ複合体を各種条件下に維持して結晶化させた。結晶化した複合体に対して回折分析を行った。回折統計に基づき結晶構造（２．６オングストロームおよび２．２５オングストローム）を決定した。
【０２０１】
結晶構造に従って、ＤＸ－４０１２のＦａｂ断片との相互作用に関与するＦＸＩＩａのＣ鎖における残基、すなわちＬ３９０、Ｙ３９１、Ｗ３９２、Ｇ３９３、Ｈ３９４、Ｓ３９５、Ｆ３９６、Ｃ３９７、Ｈ４１２、Ｃ４１３、Ｌ４１４、Ｑ４１５、Ｄ４１６、Ｒ４３２、Ｎ４３３、Ｖ４５６、Ｙ４５８、Ｈ５０７、Ｆ５０９、Ｅ５１０、Ｇ５１１、Ａ５１２、Ｅ５１３、Ｙ５１５、Ｄ５５７、Ａ５５８、Ｃ５５９、Ｑ５６０、Ｇ５６１、Ｄ５６２、Ｓ５６３、Ｉ５８４、Ｓ５８５、Ｗ５８６、Ｇ５８７、Ｓ５８８、Ｇ５８９、Ｃ５９０、Ｇ５９１、Ｄ５９２、Ｇ５９７を同定した。
【０２０２】
さらに、重鎖可変領域中のＴ２８、Ｓ３０、Ｑ３１、Ｗ５２、Ｐ５３、Ｓ５４、Ｇ５５、Ｇ５６、Ｈ５７、Ｒ５９、Ｎ７４、Ｒ１００、Ｙ１０１、Ｒ１０２、Ｇ１０３、Ｐ１０４、Ｋ１０５、Ｙ１０６、Ｙ１０７およびＹ１０８ならびに軽鎖可変領域中のＨ３１、Ｎ３３、Ｙ３５、Ｙ５４、Ｌ５５、Ｎ５８およびＴ９９を含む結晶構造に基づき、ＦＸＩＩａと相互作用するＤＸ－４０１２のＦａｂ中の残基も同定した。
【０２０３】
これらの結果は、ＤＸ－４０１２の重鎖はＦＸＩＩａと相互作用する主な領域であることを示し、LC CDR1中の２～３個の残基がその相互作用に寄与することが分かった。
【０２０４】
結晶構造により、抗ＦＸＩＩａのＦａｂ断片の残基Ｒ１０２がＦＸＩＩａのＳ１ポケットに結合し、かつ水によって媒介される相互作用により残基Ｄ５５７と相互作用することも明らかになった。これにより、Ｆａｂ残基Ｒ１０２－Ｇ１０３－Ｐ１０４の骨格がＦＸＩＩａの触媒三残基の近くであるが触媒が機能しない向きに位置づけられる。Ｐ１０４はこの向きを強固に保持することに寄与し、それによりＦＸＩＩａの活性を阻害することができる。
【０２０５】
さらなる結晶構造を決定するために、他の抗ＦＸＩＩａ抗体およびそのＦａｂ断片とＦＸＩＩａとの複合体も形成して共精製する。
【０２０６】
他の実施形態
本明細書に開示されている全ての特徴をあらゆる組み合わせで組み合わせてもよい。本明細書に開示されている各特徴を同じ、同等または同様の目的を果たす他の特徴で置き換えてもよい。従って、明示的に別段の定めをした場合を除き、開示されている各特徴は一般的な一連の同等または同様の特徴の単なる例である。
【０２０７】
当業者であれば、上記説明から本発明の必須の特性を容易に確認することができ、その趣旨および範囲から逸脱することなく本発明の各種変形および修正を行い、それを各種用法および条件に適合させることができる。従って、他の実施形態も特許請求の範囲に含まれる。
【０２０８】
均等物
本発明のいくつかの実施形態について本明細書に説明および図示してきたが、当業者であれば、当該機能を実施し、かつ／または本明細書に記載されている結果および／または１つ以上の利点を得るための様々な他の手段および／または構造を容易に思い付き、そのような変形および／または修正はそれぞれ、本明細書に記載されている本発明の実施形態の範囲内であるとみなされる。より一般には、当業者であれば、本明細書に記載されている全てのパラメーター、寸法、材料および構成が例示的なものであり、実際のパラメータ

ー、寸法、材料および／または構成は本発明の教示が使用される具体的な用途によって決まることを容易に理解するであろう。当業者であれば、本明細書に記載されている本発明の具体的な実施形態の多くの均等物を認識しているか、通常の実験法のみを用いて確かめることができる。従って、当然のことながら、上記実施形態は例としてのみ提供されており、添付の特許請求の範囲およびそれらの均等物の範囲内で、具体的に記載および特許請求されているもの以外の方法で本発明の実施形態を実施することができる。本開示の本発明の実施形態は、本明細書に記載されている各個々の特徴、システム、物品、材料、キットおよび／または方法に関する。２つ以上のそのような特徴、システム、物品、材料、キットおよび／または方法のあらゆる組み合わせも、そのような特徴、システム、物品、材料、キットおよび／または方法が互いに相反しなければ、本開示の本発明の範囲に含まれる。

【０２０９】

本明細書で定義および使用されている全ての定義は、辞書の定義、参照により組み込まれる文献内での定義および／または定義されている用語の通常の意味よりも優先されるものと理解されるべきである。

【０２１０】

本明細書に開示されている全ての参考文献、特許および特許出願は、それぞれが引用される目的である主題に関して参照により組み込まれ、それらは場合によっては文献の全体を包含することができる。

【０２１１】

本明細書および特許請求の範囲においてここで使用される不定冠詞の「１つの（ａ）」および「１つの（ａｎ）」は、特に明らかな矛盾がない限り、「少なくとも１つ」を意味するものとして理解されるべきである。

【０２１２】

本明細書および特許請求の範囲においてここで使用される「および／または」という語句は、そのように結合された要素、すなわち場合によっては合接的に存在し、かつそれ以外の場合には離接的に存在する要素の「いずれか一方または両方」を意味するものとして理解されるべきである。「および／または」と共に列挙されている複数の要素は同様に解釈されるべきであり、すなわち、そのように結合された要素の「１つ以上」と解釈されるべきである。具体的に特定されているそれらの要素に関連しているか否かに関わらず、「および／または」の句によって具体的に特定されている要素以外の他の要素が任意で存在してもよい。従って、非限定的な例として、「Ａおよび／またはＢ」という言及は、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などのオープンエンドの言語と共に使用されている場合、例えば、一実施形態ではＡのみ（任意でＢ以外の要素を含む）を指すことができ、別の実施形態ではＢのみ（任意でＡ以外の要素を含む）を指すことができ、さらに別の実施形態ではＡおよびＢの両方（任意で他の要素を含む）を指すことができる。

【０２１３】

本明細書および特許請求の範囲においてここで使用される「または」は、上に定義した「および／または」と同じ意味を有するものとして理解されるべきである。

例えば列挙されている項目を区切る場合の「または」あるいは「および／または」は包括的なもの、すなわち複数または列挙されている要素の少なくとも１つを包含するが２つ以上も含み、かつ任意でさらなる列挙されていない項目も含むものとして解釈されるべきである。「～のうちの１つのみ」または「～のうちの厳密に１つ」あるいは特許請求の範囲において使用されている場合の「～からなる（consisting of）」などの明らかに矛盾していることを示す用語のみが、複数または列挙されている要素の厳密に１つの要素の包含を指す。一般に、本明細書で使用される「または」という用語は、「～のうちのいずれか一方」、「～のうちの１つ」、「～のうちの１つのみ」または「～のうちの厳密に１つ」などの排他性の用語が付随している場合にのみ、排他的な二者択一（すなわち「一方または他方であるが両方ではない」）を示すものとして解釈されるべきである。特許請求の範囲で使用されている場合の「本質的に～からなる（consisting essentially of）」は、

特許法の分野で使用されるその通常の意味を有するものとする。

【０２１４】

本明細書および特許請求の範囲においてここで使用される「少なくとも１つ」という語句は、列挙されている１つ以上の要素について言及する場合、その列挙されている要素の中の任意の１つ以上の要素から選択される少なくとも１つの要素を意味するものとして理解されるべきであるが、必ずしもその列挙されている要素の中のありとあらゆる具体的に列挙されている要素の少なくとも１つを含むものではなく、その列挙されている要素の中の要素のどんな組み合わせも排除するものではない。この定義は、具体的に特定されているそれらの要素に関連しているか否かに関わらず、「少なくとも１つ」という語句が指すその列挙されている要素の中の具体的に特定されている要素以外の要素が任意で存在してもよいことも認める。従って、非限定的な例として、「ＡおよびＢのうちの少なくとも１つ」（または、同等に「ＡまたはＢのうちの少なくとも１つ」、あるいは同等に「Ａおよび／またはＢのうちの少なくとも１つ」）は、例えば、一実施形態ではＢが存在しない少なくとも１つの（任意で２つ以上を含む）Ａ（および任意でＢ以外の要素を含む）を指すことができ、別の実施形態では、Ａが存在しない少なくとも１つの（任意で２つ以上を含む）Ｂ（および任意でＡ以外の要素を含む）を指すことができ、さらに別の実施形態では、少なくとも１つの（任意で２つ以上を含む）Ａおよび少なくとも１つの（任意で２つ以上を含む）Ｂ（および任意で他の要素を含む）を指すことができる。

【０２１５】

また当然のことながら、特に明らかな矛盾がない限り、２つ以上の工程または行為を含む本明細書において特許請求されているあらゆる方法において、当該方法の工程または行為の順序は必ずしも当該方法の工程または行為が列挙されている順序に限定されない。