



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2012-0128126  
 (43) 공개일자 2012년11월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/44 (2006.01)  
 A61P 1/02 (2006.01) A61P 7/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7019086
- (22) 출원일자(국제) 2011년01월20일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2012년07월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2011/050749
- (87) 국제공개번호 WO 2011/089183  
 국제공개일자 2011년07월28일
- (30) 우선권주장  
 10151239.0 2010년01월20일  
 유럽특허청(EPO)(EP)  
 61/383,914 2010년09월17일 미국(US)

- (71) 출원인  
 베링거 인겔하임 인터내셔널 게엠베하  
 독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎬 173
- (72) 발명자  
 판 린 요안네  
 독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎬 173  
 베링거 인겔하임 게엠베하 코르포라테 파텐츠  
 박 존 에드워드  
 독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎬 173  
 베링거 인겔하임 게엠베하 코르포라테 파텐츠  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 장훈

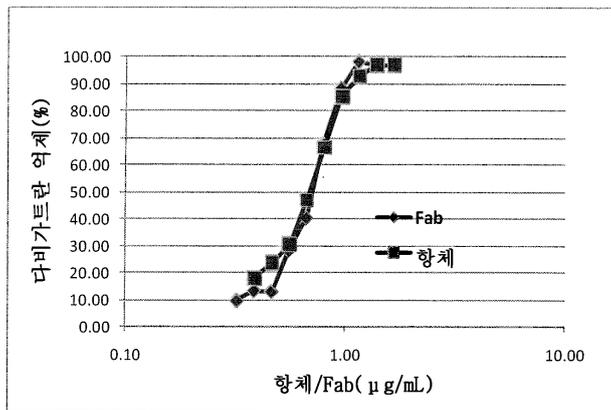
전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 **항응고제 해독제**

**(57) 요약**

본 발명은 항응고제, 특히 다비가트란에 대한 항체 분자 및 그러한 항응고제의 해독제로 사용되는 항체 분자의 용도에 관한 것이다.

**대표도** - 도8



(72) 발명자

**호웰 노르베르트**

독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎬 173  
베링거 인겔하임 게엠베하 코르포라테 파텐츠

**쿤츠 울리히**

독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎬 173  
베링거 인겔하임 게엠베하 코르포라테 파텐츠

**리첸부르거 토비아스**

독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎬 173  
베링거 인겔하임 게엠베하 코르포라테 파텐츠

**캐나다 키이스**

미국 코네티컷주 06877 리지필드 리지베리 로드  
900 베링거 인겔하임 파마슈티칼즈 인코포레이티드

**싱 산자야**

미국 코네티컷주 06877 리지필드 리지베리 로드  
900 베링거 인겔하임 파마슈티칼즈 인코포레이티드

**워터먼 알리사**

미국 코네티컷주 06877 리지필드 리지베리 로드  
900 베링거 인겔하임 파마슈티칼즈 인코포레이티드

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

항응고제의 활성을 중화시킬 수 있는 항체 분자.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 항체 분자가 항응고제에 대해 결합 특이성을 갖는, 항체 분자.

**청구항 3**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항응고제가 직접 트롬빈 억제제, 인자 Xa 억제제 또는 비타민 K 길항제인, 항체 분자.

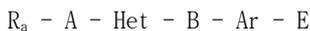
**청구항 4**

제1항 내지 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항응고제가 다비가트란, 아르가트로반, 벨라가트란, 지멜라가트란, 히루딘, 비발리루딘, 레피루딘, 데시루딘, 아픽사반, 오타믹사반, 리바록사반, 데피프로타이드, 라마트로반, 안티트롬빈 III 또는 드로트레코진 알파인, 항체 분자.

**청구항 5**

제1항 내지 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항응고제가 하기 화학식 I의 이치환된 바이사이클릭 헤테로사이클, 이의 호변이성체, 입체이성체 및 염인 항체 분자:

화학식 I



상기 화학식 I에서,

A는 그룹 Het의 벤조, 피리도 또는 티에노 모이어티(moiety)에 결합된 카르보닐 또는 설포닐 그룹을 나타내고;

B는 그룹 Ar에 결합된 메틸렌 그룹이 산소 또는 황 원자에 의해 또는 -NR<sub>1</sub>- 그룹(여기서, R<sub>1</sub>은 수소 원자 또는 C<sub>1-4</sub>-알킬 그룹을 나타낸다)에 의해 대체될 수 있는 에틸렌 그룹을 나타내며;

E는 R<sub>b</sub>NH-C(=NH)- 그룹(여기서, R<sub>b</sub>는 수소 원자, 하이드록시, C<sub>1-9</sub>-알콕시카르보닐(여기서, C<sub>1-9</sub>-알콕시카르보닐의 2번 위치의 에톡시 모이어티는 C<sub>1-3</sub>-알킬설포닐 또는 2-(C<sub>1-3</sub>-알콕시)-에틸 그룹에 의해 추가로 치환될 수 있다), 사이클로헥실옥시카르보닐, 페닐-C<sub>1-3</sub>-알콕시카르보닐, 벤조일, p-C<sub>1-3</sub>-알킬벤조일 또는 피리디노일 그룹을 나타낸다)을 나타내고;

Ar은 염소 원자 또는 메틸, 에틸 또는 메톡시 그룹에 의해 임의로 치환되는 1,4-페닐렌 그룹을 나타내거나 2,5-티에닐렌 그룹을 나타내며;

Het는 1-(C<sub>1-3</sub>-알킬)-2,5-벤즈이미다졸릴렌, 1-사이클로프로필-2,5-벤즈이미다졸릴렌, 2,5-벤조티아졸릴렌, 1-(C<sub>1-3</sub>-알킬)-2,5-인돌릴렌, 1-(C<sub>1-3</sub>-알킬)-2,5-이미다조[4,5-b]피리디닐렌, 3-(C<sub>1-3</sub>-알킬)-2,7-이미다조[1,2-a]피리디닐렌 또는 1-(C<sub>1-3</sub>-알킬)-2,5-티에노[2,3-d]이미다졸릴렌 그룹을 나타내고;

R<sub>a</sub>는 R<sub>2</sub>NR<sub>3</sub>- 그룹을 나타낸다(여기서,

R<sub>2</sub>는 카르복시, C<sub>1-6</sub>-알킬옥시카르보닐, 벤질옥시카르보닐, C<sub>1-3</sub>-알킬설포닐아미노카르보닐 또는 1H-테트라졸-5-일 그룹에 의해 치환될 수 있는 C<sub>1-4</sub> 알킬 그룹;

하이드록시, 벤질옥시, 카르복시-C<sub>1-3</sub>-알킬아미노, C<sub>1-3</sub>-알콕시카르보닐-C<sub>1-3</sub>-알킬아미노, N-(C<sub>1-3</sub>-알킬)-카르복시-C<sub>1-3</sub>-알킬아미노 또는 N-(C<sub>1-3</sub>-알킬)-C<sub>1-3</sub>-알콕시카르보닐-C<sub>1-3</sub>-알킬아미노 그룹에 의해 치환되는 C<sub>2-4</sub>-알킬 그룹(여

기서, 상기 그룹들에서 인접한 질소 원자에 대해  $\alpha$ -위치에 있는 탄소 원자는 치환될 수 없다)이고;

$R_3$ 은  $C_{3-7}$ -사이클로알킬 그룹, 프로파르길 그룹(여기서, 불포화 부분은  $R_2NR_3$  그룹의 질소 원자에 직접적으로 결합될 수 없다), 불소 또는 염소 원자에 의해, 또는 메틸 또는 메톡시 그룹에 의해 임의로 치환되는 페닐 그룹, 메틸 그룹에 의해 임의로 치환되는 피라졸릴, 피리다졸릴 또는 피리디닐 그룹을 나타내거나;

$R_2$ 와  $R_3$ 은 이들 사이의 질소 원자와 함께, 카르복시 또는  $C_{1-4}$ -알콕시카르보닐 그룹에 의해 임의로 치환되고, 페닐 환이 추가로 융합될 수 있는 5- 내지 7-원 사이클로알킬렌이미노 그룹을 나타낸다).

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 항응고제가

- (a) 2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈티아졸-5-카르복실산-N-페닐-N-(2-카르복시에틸)-아미드,
- (b) 2-[N-(4-아미디노페닐)-N-메틸-아미노메틸]-벤즈티아졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-카르복시카르보닐에틸)-아미드,
- (c) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- (d) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(3-하이드록시카르보닐프로필)-아미드,
- (e) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(하이드록시카르보닐메틸)-아미드,
- (f) 1-메틸-2-[2-(2-아미디노티오펜-5-일)에틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- (g) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- (h) 1-메틸-2-[2-(4-아미디노페닐)에틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- (i) 1-메틸-2-[2-(4-아미디노페닐)에틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- (j) 1-메틸-2-[2-(4-아미디노페닐)에틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-[2-(1H-테트라졸-5-일)에틸]-아미드,
- (k) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-[2-(1H-테트라졸-5-일)에틸]-아미드,
- (l) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-N-메틸-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- (m) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-N-메틸-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(3-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- (n) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-N-메틸-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- (o) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-[(N-하이드록시카르보닐에틸-N-메틸)-2-아미노에틸]-아미드,
- (p) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(3-플루오로페닐)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- (q) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(4-플루오로페닐)-N-(2-하이드

록시카르보닐에틸)-아미드,

(r) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노-2-메톡시-페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,

(s) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노-2-메톡시-페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,

(t)

1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-인돌-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-메톡시카르보닐에틸)-아미드, 및

(u) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-티에노[2,3-d]이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,

(v) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,

(w) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,

(x) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노-2-메톡시-페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,

(y) 1-메틸-2-[N-[4-(N-n-헥실옥시카르보닐아미디노)페닐]-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-메톡시카르보닐에틸)-아미드,

이들의 호변이성체, 입체이성체 및 염중에서 선택되는 화합물인, 항체 분자.

#### 청구항 7

제2항에 있어서, 상기 항응고제가 다비가트란인, 항체 분자.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 다비가트란 및 다비가트란의 1-O-아실글루쿠로나이드의 활성을 중화시킬 수 있는, 항체 분자.

#### 청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 그룹에서 선택되는 CDR1, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 그룹에서 선택되는 CDR2 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 이루어진 그룹에서 선택되는 CDR3을 갖는 중쇄 가변 도메인과 서열번호 11, 서열번호 12 및 서열번호 13으로 이루어진 그룹에서 선택되는 CDR1, 서열번호 14의 CDR2 및 서열번호 15의 CDR3을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 항체 분자.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 서열번호 1의 CDR1, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 그룹에서 선택되는 CDR2 및 서열번호 10의 CDR3을 갖는 중쇄 가변 도메인과 서열번호 13의 CDR1, 서열번호 14의 CDR2 및 서열번호 15의 CDR3을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 항체 분자.

#### 청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 서열번호 16, 18, 20, 22, 24 및 26으로 이루어진 그룹에서 선택되는 중쇄 가변 도메인과 서열번호 17, 19, 21, 23, 25 및 27로 이루어진 그룹에서 선택되는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 항체 분자.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 서열번호 16의 중쇄 가변 도메인과 서열번호 17의 경쇄 가변 도메인을, 또는 서열번호 18의 중쇄 가변 도메인과 서열번호 19의 경쇄 가변 도메인을, 또는 서열번호 20의 중쇄 가변 도메인과 서열번호 21의 경쇄 가변 도메인을, 또는 서열번호 22의 중쇄 가변 도메인과 서열번호 23의 경쇄 가변 도메인을, 또는 서열번호

호 24의 중쇄 가변 도메인과 서열번호 25의 경쇄 가변 도메인을, 또는 서열번호 24의 중쇄 가변 도메인과 서열번호 27의 경쇄 가변 도메인을, 또는 서열번호 26의 중쇄 가변 도메인과 서열번호 27의 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 항체 분자.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 다클론 항체, 단클론 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 항체의 단편, 특히 Fab, Fab' 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편, 단일쇄 항체, 특히 단일쇄 가변 단편(scFv), 소형 모듈 면역약제(SMIP : Small Modular Immunopharmaceutical), 도메인 항체, 나노바디, 디아바디(diabody) 또는 설계된 안키린 반복 단백질(DARPin)인, 항체 분자.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 중쇄 가변 도메인과 경쇄 가변 도메인이 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30 및 서열번호 31로 이루어진 그룹에서 선택되는 링커 펩타이드를 통해 서로 결합되어 있는 scFv인, 항체 분자.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 서열번호 32 또는 서열번호 33을 포함하는, 항체 분자.

**청구항 16**

제13항에 있어서, 서열번호 34 또는 서열번호 40을 포함하는 중쇄와 서열번호 35를 포함하는 경쇄를 갖거나, 서열번호 42를 포함하는 중쇄와 서열번호 43을 포함하는 경쇄를 갖는 항체 분자.

**청구항 17**

제13항에 있어서, 서열번호 36, 서열번호 38 또는 서열번호 41을 포함하는 Fd 단편 및 서열번호 37 또는 서열번호 39를 포함하는 경쇄를 갖는 Fab 분자인, 항체 분자.

**청구항 18**

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 의약으로 사용하기 위한 항체 분자.

**청구항 19**

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 항응고제 치료요법의 부작용의 치료요법 또는 예방에 사용하고/하거나 항응고제의 과다복용을 반전시키기 위한 항체 분자.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 상기 부작용이 출혈인, 항체 분자.

**청구항 21**

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체 분자의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하여, 항응고제 치료요법의 부작용 또는 항응고제 치료요법에서의 과다복용 사건을 치료 또는 예방하는 방법.

**청구항 22**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 항체 분자의 제조 방법으로서,

- (a) 발현 조절 서열과 기능적으로 연계되어 있는 상기 항체 분자를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공하고,
- (b) 상기 숙주 세포를 배양하고,
- (c) 상기 세포 배양물로부터 상기 항체 분자를 회수함을 포함하는,

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 항체 분자의 제조 방법.

**청구항 23**

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 약제학적 조성물을 포함하는 키트.

**청구항 24**

- (a) 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 약제학적 조성물,
- (b) 용기 및
- (c) 라벨(label)을 포함하는, 키트.

**청구항 25**

제7항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체, 및 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 키트.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 상기 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염의 형태가 고체, 액체 또는 겔의 형태인, 키트.

**청구항 27**

제25항에 있어서, 상기 다비가트란 에텍실레이트의 약제학적으로 허용되는 염이 메실레이트 염인, 키트.

**청구항 28**

제25항 또는 제27항에 있어서, 상기 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염의 용량 단위 당 함량이 일일 1회(QD) 또는 일일 2회(BID)로 75 mg 내지 300 mg인, 키트.

**청구항 29**

- (a) 제7항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 약제학적 조성물;
- (b) 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염의 약제학적 조성물;
- (c) 용기; 및
- (d) 라벨을 포함하는, 키트.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 상기 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염의 형태가 고체, 액체 또는 겔의 형태인, 키트.

**청구항 31**

제29항에 있어서, 상기 다비가트란 에텍실레이트의 약제학적으로 허용되는 염이 메실레이트 염인, 키트.

**청구항 32**

제29항 또는 제31항에 있어서, 상기 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염의 용량 단위 당 함량이 일일 1회(QD) 또는 일일 2회(BID)로 75 mg 내지 300 mg인, 키트.

**청구항 33**

키트로서,

상기 키트는

- (a) 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을

포함하는 제1 약제학적 조성물;

(b) 제7항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체를 포함하는 제2 약제학적 조성물;

(c) 상기 제1 및 제2 약제학적 조성물을 환자에게 별도로 투여하기 위한 지침서

를 포함하고;

상기 제1 및 제2 약제학적 조성물은 별개의 용기들에 함유되며 상기된 제2 약제학적 조성물이 다비가트란 또는 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로나이드의 중화 또는 부분 중화를 필요로 하는 환자에게 투여되는, 키트.

#### 청구항 34

다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로 치료를 받고 있는 환자에서 다비가트란 또는 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로나이드를 중화 또는 부분 중화시키는 방법으로서, 제7항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 약제학적 조성물을 투여함을 포함하는 방법.

#### 청구항 35

환자에서 다비가트란 또는 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로나이드를 중화 또는 부분 중화시키는 방법으로서,

(a) 환자가 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로 치료를 받았었는 지와 환자가 복용한 양을 확인하고;

(b) 다비가트란 또는 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로나이드가 응혈 또는 응고 시험 또는 검사 결과의 정밀 판독을 방해하는 응혈 또는 응고 시험 또는 검사를 수행하기 이전에, 다비가트란 또는 1-0-아실글루쿠로나이드를 제7항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체로 중화시키며;

(c) 상기 환자로부터 채취한 시료에 대해 상기 응혈 또는 응고 시험 또는 검사를 수행하여 다비가트란 또는 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로나이드 존재없이 응혈의 형성 수준을 측정하고;

(d) 환자에서 응혈 형성과 분해사이의 적절한 균형을 달성하기 위해, 상기 환자에게 투여된 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염의 양을 조정함을 포함하는,

환자에서 다비가트란 또는 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로나이드를 중화 또는 부분 중화시키는 방법.

#### 청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 다비가트란 또는 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로나이드에 대한 항체의 양이 0.1 내지 100의 몰비인, 방법.

#### 청구항 37

제36항에 있어서, 다비가트란 또는 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로나이드에 대한 항체의 양이 0.1 내지 10의 몰비인, 방법.

#### 청구항 38

제35항에 있어서, 상기 시험 또는 검사 결과의 정밀 판독이, 피브리노겐 수준, 활성화된 단백질 C 내성 또는 관련된 시험들의 정밀 판독인, 방법.

### 명세서

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 의학 분야에 관한 것이며, 특히 항응고제 치료요법 분야에 관한 것이다.

#### 배경기술

[0002] 항응고제는 응혈을 방지하는 물질이다. 즉, 항응고제는 혈액이 응고되는 것을 정지시킨다. 항응고제는 사람의

혈전 장애를 위한 투약으로서의 치료요법에, 예를 들어 심부정맥 혈전증, 폐색전증, 심근경색 및 뇌졸중의 성향을 보이는 자들의 일차 및 이차 예방에 널리 사용되고 있다.

[0003] 경구용 항응고제의 중요한 부류는 비타민 K의 효과를 길항시킴으로써 작용하며 예로는 와파린을 포함한 쿠마린을 들 수 있다. 두 번째 부류의 화합물은 안티트롬빈 III 또는 헤파린 보조인자 II와 같은 보조인자를 통해 간접적으로 응고를 억제한다. 이러한 화합물은 안티트롬빈 III을 통해 주로 인자 Xa(및 적은 정도로 트롬빈)의 억제를 촉매하는 몇 가지 저분자량 헤파린 생성물(베미파린, 세르토파린, 달테파린, 에녹사파린, 나드로파린, 파르나파린, 레비파린, 틴자파린)을 포함한다. 좀더 작은 쇠의 올리고당(폰다파리누스, 이드라파리누스)은 안티트롬빈 III을 통해 단지 인자 Xa만을 억제한다. 헤파리노이드(다나파로이드, 설로텍사이드, 더마탄 설페이트)는 두 보조인자 모두를 통해 작용하며 인자 Xa와 트롬빈 둘 다를 억제한다. 세 번째 부류는 응고의 직접 억제제를 나타낸다. 직접 인자 Xa 억제제는 아픽사반, 에독사반, 오타믹사반 및 리바룩사반을 포함하며 직접 트롬빈 억제제는 이가 히루딘(비발리루딘, 레피루딘, 데시루딘) 및 일가 화합물 아르가트로반 및 다비가트란을 포함한다.

[0004] 혈액 응고는 출혈을 정지시키는 생물학적 기전이기 때문에 항응고제 치료요법의 부작용은 달갑지 않은 출혈이 발생하는 것일 수 있다. 따라서, 이와 같은 항응고제-연관된 출혈이 발생할 경우 이를 정지시킬 수 있는 해독제를 제공하는 것이 필요하다[참조: Zikria and Ansell, Current Opinion in Hematology 2009, 16(5): 347-356]. 이를 달성하는 한 가지 방법은 투여 후 환자의 체내에 존재하는 항응고 화합물의 활성을 중화시키는 것이다.

[0005] 현재 이용되고 있는 항응고제 해독제는 헤파린의 중화용 프로타민 및 와파린과 같은 비타민 K 길항제의 중화용 비타민 K이다. 또한, 신선동결혈장 및 재조합 인자 VIIa가 환자 저분자량 헤파린 치료를 받고 있는 중증의 외상 또는 출혈 환자에게 비특정 해독제로 사용되어 왔다[참조: Lauritzen, B. et al., Blood, 2005, 607A-608A.]. 또한, 헤파린 또는 저분자량 헤파린 해독제로서 프로타민 단편(참조: 미국특허 제6,624,141호) 및 작은 합성 펩타이드(참조: 미국특허 제6,200,955호); 및 트롬빈 억제제에 대한 해독제로서 트롬빈 뮤테인(mutein)(참조: 미국특허 제6,060,300호)이 공개되었다. 히루딘 및 합성 트롬빈 억제제의 해독제로서 프로트롬빈 중간체 및 유도체가 공개되었다(참조: 미국특허 제5,817,309호 및 제6,086,871호). 직접 인자 Xa 억제제의 해독제로서 불활성 인자 Xa 유사체가 공개되었다(참조: 국제 특허 출원 공보 제W02009042962호). 또한, 폰다파리누스 및 이드라파리누스와 같은 간접 안티트롬빈 III 의존성 인자 Xa 억제제의 효과를 해독시키는 것으로서 재조합 인자 VIIa가 사용되었다[참조: Bijsterveld, NR et al., Circulation, 2002, 106: 2550-2554; Bijsterveld, NR et al., British J. of Haematology, 2004(124): 653-658]. 항응고제 해독 방법들에 대한 논평이 문헌[참조: Schulman and Bijsterveld, Transfusion Medicine Reviews 2007, 21(1): 37-48]에 기술되어 있다.

[0006] 항응고제 치료요법에 대한 개량된 해독제를 제공할 필요가 있으며, 특히 지금까지 특정한 해독제가 제시된 바 없는 다비가트란과 같은 직접 트롬빈 억제제에 대한 해독제를 제공할 필요가 있다.

**발명의 내용**

[0007] 발명의 개요

[0008] 한 가지 관점에서, 본 발명은 항응고제의 활성을 중화시킬 수 있는 항체 분자에 관한 것이다.

[0009] 추가의 관점에서, 상기 항체 분자는 상기 항응고제에 대해 결합 특이성을 갖는다.

[0010] 추가의 관점에서, 상기 항응고제는 직접 트롬빈 억제제, 인자 Xa 억제제 또는 비타민 K 길항제이다.

[0011] 추가의 관점에서, 상기 항응고제는 다비가트란, 아르가트로반, 멜라가트란, 지멜라가트란, 히루딘, 비발리루딘, 레피루딘, 데시루딘, 아픽사반, 오타믹사반, 에독사반, 리바룩사반, 데피브로타이드, 라마트로반, 안티트롬빈 III 또는 드로트레코진 알파이다.

[0012] 추가의 양태로서, 상기 항응고제는 아래 화학식 I의 이치환된 바이사이클릭 헤테로사이클 또는 이의 호변이성체, 입체이성체 및 염이다:

[0013] [화학식 I]

[0014] R<sub>a</sub> - A - Het - B - Ar - E

- [0015] 상기 화학식 I에서,
- [0016] A는 그룹 Het의 벤조, 피리도 또는 티에노 모이어티(moiety)에 결합된 카르보닐 또는 설포닐 그룹을 나타내고;
- [0017] B는 그룹 Ar에 결합된 메틸렌 그룹이 산소 또는 황 원자에 의해 또는 -NR<sub>1</sub>- 그룹(여기서, R<sub>1</sub>은 수소 원자 또는 C<sub>1-4</sub>-알킬 그룹을 나타낸다)에 의해 대체될 수 있는 에틸렌 그룹을 나타내며;
- [0018] E는 R<sub>b</sub>NH-C(=NH)- 그룹(여기서, R<sub>b</sub>는 수소 원자, 하이드록시, C<sub>1-9</sub>-알콕시카르보닐(여기서, C<sub>1-9</sub>-알콕시카르보닐 그룹의 2번 위치의 에톡시 모이어티는 C<sub>1-3</sub>-알킬설포닐 또는 2-(C<sub>1-3</sub>-알콕시)-에틸 그룹에 의해 추가로 치환될 수 있다), 사이클로헥실옥시카르보닐, 페닐-C<sub>1-3</sub>-알콕시카르보닐, 벤조일, p-C<sub>1-3</sub>-알킬-벤조일 또는 피리디노일 그룹을 나타낸다)을 나타내고;
- [0019] Ar은 염소 원자, 또는 메틸, 에틸 또는 메톡시 그룹에 의해 임의로 치환되는 1,4-페닐렌 그룹을 나타내거나 2,5-티에닐렌 그룹을 나타내며;
- [0020] Het는 1-(C<sub>1-3</sub>-알킬)-2,5-벤즈이미다졸릴렌, 1-사이클로프로필-2,5-벤즈이미다졸릴렌, 2,5-벤조티아졸릴렌, 1-(C<sub>1-3</sub>-알킬)-2,5-인돌릴렌, 1-(C<sub>1-3</sub>-알킬)-2,5-이미다조[4,5-b]피리디닐렌, 3-(C<sub>1-3</sub>-알킬)-2,7-이미다조[1,2-a]피리디닐렌 또는 1-(C<sub>1-3</sub>-알킬)-2,5-티에노[2,3-d]이미다졸릴렌 그룹을 나타내고;
- [0021] R<sub>a</sub>는 R<sub>2</sub>NR<sub>3</sub>- 그룹을 나타낸다(여기서,
- [0022] R<sub>2</sub>는 카르복시, C<sub>1-6</sub>-알킬옥시카르보닐, 벤질옥시카르보닐, C<sub>1-3</sub>-알킬설포닐아미노카르보닐 또는 1H-테트라졸-5-일 그룹에 의해 치환될 수 있는 C<sub>1-4</sub> 알킬 그룹;
- [0023] 하이드록시, 벤질옥시, 카르복시-C<sub>1-3</sub>-알킬아미노, C<sub>1-3</sub>-알콕시카르보닐-C<sub>1-3</sub>-알킬아미노, N-(C<sub>1-3</sub>-알킬)-카르복시-C<sub>1-3</sub>-알킬아미노 또는 N-(C<sub>1-3</sub>-알킬)-C<sub>1-3</sub>-알콕시카르보닐-C<sub>1-3</sub>-알킬아미노 그룹에 의해 치환되는 C<sub>2-4</sub>-알킬 그룹(여기서, 상기 그룹들에서 인접한 질소 원자에 대해 α-위치에 있는 탄소 원자는 치환될 수 없다)이고;
- [0024] R<sub>3</sub>은 C<sub>3-7</sub>-사이클로알킬 그룹, 프로파르길 그룹(여기서, 불포화 부분은 R<sub>2</sub>NR<sub>3</sub> 그룹의 질소 원자에 직접적으로 결합될 수 없다), 불소 또는 염소 원자에 의해, 또는 메틸 또는 메톡시 그룹에 의해 임의로 치환되는 페닐 그룹, 메틸 그룹에 의해 임의로 치환되는 피라졸릴, 피리다졸릴 또는 피리디닐 그룹을 나타내거나;
- [0025] R<sub>2</sub>와 R<sub>3</sub>은 이들 사이의 질소 원자와 함께 카르복시 또는 C<sub>1-4</sub>-알콕시카르보닐 그룹에 의해 임의로 치환되고, 페닐 환이 추가로 융합될 수 있는 5- 내지 7-원 사이클로알킬렌이미노 그룹을 나타낸다).
- [0026] 추가의 양태로서, 항응고제는(a) 2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈티아졸-5-카르복실산-N-페닐-N-(2-카르복시에틸)-아미드,
- [0027] (b) 2-[N-(4-아미디노페닐)-N-메틸-아미노메틸]-벤즈티아졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-카르복시카르보닐에틸)-아미드,
- [0028] (c) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0029] (d) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(3-하이드록시카르보닐프로필)-아미드,
- [0030] (e) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(하이드록시카르보닐메틸)-아미드,
- [0031] (f) 1-메틸-2-[2-(2-아미디노티오펜-5-일)에틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0032] (g) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,

- [0033] (h) 1-메틸-2-[2-(4-아미디노페닐)에틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0034] (i) 1-메틸-2-[2-(4-아미디노페닐)에틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0035] (j) 1-메틸-2-[2-(4-아미디노페닐)에틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-[2-(1H-테트라졸-5-일)에틸]-아미드,
- [0036] (k) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-[2-(1H-테트라졸-5-일)에틸]-아미드,
- [0037] (l) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-N-메틸-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0038] (m) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-N-메틸-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(3-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0039] (n) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-N-메틸-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0040] (o) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-[(N-하이드록시카르보닐에틸)-N-메틸]-2-아미노에틸]-아미드,
- [0041] (p) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(3-플루오로페닐)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0042] (q) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(4-플루오로페닐)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0043] (r) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노-2-메톡시-페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0044] (s) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노-2-메톡시-페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0045] (t) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-인돌-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-메톡시카르보닐에틸)-아미드,
- [0046] (u) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-티에노[2,3-d]이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0047] (v) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0048] (w) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0049] (x) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노-2-메톡시-페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0050] (y) 1-메틸-2-[N-[4-(N-n-헥실옥시카르보닐아미디노)페닐]-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-에톡시카르보닐에틸)-아미드,
- [0051] 이의 호변이성체, 입체이성체 및 염중에서 선택된 화합물이다.
- [0052] 다른 관점에서, 본 발명은 다비가트란, 다비가트란 액세틸레이트 및/또는 다비가트란의 0-아실글루쿠로나이드에 대한 항체 분자에 관한 것이다.
- [0053] 추가의 관점에서, 항체 분자는 다클론 항체, 단클론 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 항체의 단편, 특히 Fab, Fab' 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편, 단일쇄 항체, 특히 단일쇄 가변 단편(scFv), 도메인 항체, 나노바디, 디아바디 또는 DARPin이다.

- [0054] 추가의 관점에서, 본 발명은 의약에 사용하기 위한 상기된 항체 분자에 관한 것이다.
- [0055] 추가의 관점에서, 본 발명은 항응고제 치료요법의 부작용을 치료 또는 예방하기 위한 상기된 항체 분자에 관한 것이다.
- [0056] 추가의 관점에서, 상기 부작용은 출혈이다.
- [0057] 추가의 관점에서, 본 발명은 상기된 항체 분자의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하여, 항응고제 치료요법의 부작용을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0058] 다른 관점에서, 본 발명은 상기된 항체 분자를 용기 및 라벨(label)과 함께 포함하는 키트에 관한 것이다.

**도면의 간단한 설명**

- [0059] 도 1: 트롬빈 응고 시간 검사에 의해 다비가트란의 농도 증가와 함께 나타나는 응고 시간의 증가. 200 nM 농도는 기준치에 비해 약 5배의 응고시간을 증가시켰으며 일차 및 이차 실험 세트에서 사용되었다. 500 nM 농도(과다치료 용량)가 최종 실험 세트에서 사용되었다.
- 도 2: 다비가트란에 대한 4 가지 상이한 항체들(A-D)은 모두 사람 혈장중의 다비가트란을 연장된 응고 시간으로 중화시켰다. 사람 혈장의 기준 응고는 10.9초였으며, 200 nM 다비가트란이 혈장과 함께 예비항온처리된 경우 응고는 51초로 연장되었다. 200 nM 다비가트란과 예비항온처리된 혈장에 각 항체를 첨가하고 추가로 5분간 항온처리하였다. 그런 다음 트롬빈을 첨가하여 트롬빈 응고 시간이 개시되었다. 각 항체는 다비가트란의 응고 시간을 상이한 정도로 감소시킬 수 있었다. 농도가 가장 높은 용액이 항응고제 활성을 가장 크게 감소시켰다.
- 도 3: 200 nM 다비가트란과 예비항온처리된 사람 혈장에 첨가되는 다클론 항체(항체 D)의 농도 증가에 따른 효과를 측정하였다. 기준 응고 시간은 11초였으며 다비가트란의 첨가시 응고는 63.7초로 연장되었다. 그런 다음, 다비가트란에 의해 연장된 트롬빈 응고 시간을 감소시키는 작용에 대한 항체 희석도의 증가에 따른 효과를 시험하였다. 가장 낮은 농도는 트롬빈 응고 시간을 43.9초로 감소시켰다. 보다 높은 농도들은 트롬빈 응고 시간을 기준치 수준으로 완전히 감소시켰고 다비가트란의 항응고 효과를 완전히 중화시켰다. 비특이적 토끼 다클론 항체의 첨가(정사각형)는 다비가트란의 항응고 효과를 감소시키는 효과를 전혀 나타내지 않았다.
- 도 4: 500 nM 다비가트란과 예비항온처리된 사람 혈장에 첨가되는 다클론 항체(항체 D)의 농도 증가에 따른 효과를 측정하였다. 기준 응고 시간은 10.9초였으며 이와 같은 좀더 고 농도의 다비가트란 첨가시 응고는 111.7초로 연장되었다(~10배 증가). 원액 또는 항체의 1:2 희석의 효과는 다비가트란에 의해 연장된 트롬빈 응고 시간을 농도 의존적 방식으로 감소시켰다. 최고의 농도는 또한 트롬빈 응고 시간을 기준치 수준으로 완전히 감소시켰고 다비가트란의 과다치료 농도의 항응고 효과를 완전히 중화시켰다.
- 도 5: 항-다비가트란 항체 분자 중쇄의 가변 영역의 서열.
- 도 6: 항-다비가트란 항체 분자 경쇄의 가변 영역의 서열.
- 도 7: 마우스 단클론 항체(클론 22)는 사람 혈장 및 사람 전혈중에서의 다비가트란의 항응고 효과를 감소시킨다. 30 nM 다비가트란과 예비항온처리된 사람 혈장 또는 전혈에 농도가 점증된 마우스 항체를 첨가하였다. 이 검사는 트롬빈 1.5 내지 2 U/mL의 첨가로 시작하여 응고 시간을 측정하였다. 100% 다비가트란 활성은 이 화합물의 유무에 따른 응고 시간의 차이로서 규정되었다. 다비가트란-매개된 응고 시간 연장이 항체 용량에 의존적으로 억제되었다.
- 도 8: 클론 22 항체로부터 생성된 마우스 Fab는 사람 혈장중에서 다비가트란의 항응고 효과를 감소시킨다. 7 nM 다비가트란과 예비항온처리된 사람 혈장에 농도가 점증된 마우스 Fab를 첨가하였다. 이 검사는 트롬빈 0.4 U/mL의 첨가로 시작하여 응고 시간을 측정하였다. 100% 억제는 다비가트란-매개된 응고 시간 증가의 완전한 차단으로서 규정되었다. 사람 혈장에서의 다비가트란-유도된 응고 시간 연장이 Fab 용량에 의존적으로 억제되었다.
- 도 9: 마우스 단클론 항체(클론 22)는 사람 혈장중에서 다비가트란 아실글루쿠로나이드의 항응고 효과를 감소시킨다. 7 nM 다비가트란 아실글루쿠로나이드 또는 다비가트란과 예비항온처리된 사람 혈장에 농도가 점증된 마우스 항체를 첨가하였다. 이 검사는 트롬빈 0.4 U/mL의 첨가로 시작하여 응고 시간을 측정하였다. 100% 억제는 해당 화합물-매개된 응고 시간 증가의 완전한 차단으로서 규정되었다. 사람 혈장에서의 다비가트란 아실글루쿠로나이드-유도된 응고 시간 연장이 항체 용량에 의존적으로 억제되었다.

도 10: 인간화 Fab(Fab 18/15)는 사람 혈장중에서 다비가트란의 항응고 효과를 감소시킨다. 7 nM 다비가트란과 예비항온처리된 사람 혈장에 농도가 점증된 Fab 18/15를 첨가하였다. 이 검사는 트롬빈 0.4 U/mL의 첨가로 시작하여 응고 시간을 측정하였다. 100% 억제는 해당 다비가트란-매개된 응고 시간 증가의 완전한 차단으로서 규정되었다. 사람 혈장에서의 다비가트란-유도된 응고 시간 연장이 Fab 용량에 의존적으로 억제되었다.

도 11: t=0에서 등물 Fab의 일시 투여와 함께 연속 주입으로서 다비가트란이 투여된 랫트에서의 생체외 전혈 트롬빈 응고 시간(3.0 U/mL 트롬빈). 원형 라인은 약물없이 비히클로 처리된 것을 나타낸다. 정사각형 라인은 Fab 투여가 없는 다비가트란 항응고 활성을 나타낸다. 삼각형 라인은 Fab의 투여 후 항응고제 활성을 나타낸다. 데이터는 처리군 당 네마리 동물(n=4)의 평균 ± SE로 표시되었다.

도 12: t=0에서 등물 Fab의 일시 투여와 함께 연속 주입으로서 다비가트란이 투여된 랫트에서의 생체외 전혈 aPTT. 원형 라인은 약물없이 비히클로 처리된 것을 나타낸다. 정사각형 라인은 Fab 투여가 없는 다비가트란 항응고 활성을 나타낸다. 삼각형 라인은 Fab의 투여 후 항응고제 활성을 나타낸다. 데이터는 처리군 당 네마리 동물(n=4)의 평균 ± SE로 표시되었다.

도 13: t=0에서 점증된 용량의 Fab의 일시 투여와 함께 연속 주입으로서 다비가트란이 투여된 랫트에서의 생체외 전혈 트롬빈 응고 시간(3.0 U/mL 트롬빈). 원형 라인은 약물없이 비히클로 처리된 것을 나타낸다. 정사각형 라인은 Fab 투여가 없는 다비가트란 항응고 활성을 나타낸다. 삼각형 라인은 Fab의 등물 투여 후 항응고제 활성을 나타내고 파선은 등물 용량의 50%를 나타낸다. 데이터는 처리군 당 네마리 동물(n=4)의 평균 ± SE로 표시되었다.

도 14: t=0에서 등물 Fab의 일시 투여와 함께 연속 주입으로서 다비가트란이 투여된 랫트에서의 생체외 전혈 aPTT. 원형 라인은 약물없이 비히클로 처리된 것을 나타낸다. 정사각형 라인은 Fab 투여가 없는 다비가트란 항응고 활성을 나타낸다. 삼각형 라인은 등물 Fab의 투여 후 항응고제 활성을 나타내고 파선은 등물 용량의 50%를 나타낸다. 데이터는 처리군 당 네마리 동물(n=4)의 평균 ± SE로 표시되었다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0060] 한 가지 관점에서, 본 발명은 항응고제의 활성을 중화시킬 수 있는 항체 분자에 관한 것이다.
- [0061] 항체(또한 면역글로불린으로도 알려져 있으며 Ig로 약칭된다)는 척추동물의 혈액 또는 기타 체액에서 발견될 수 있는 감마 글로불린 단백질이며, 면역계에 의해 사용되어 세균 및 바이러스와 같은 외래 물체를 식별하고 중화시킨다. 이들 항체는 전형적으로는 기본 구조 단위(각 단위는 2개의 대형 중쇄와 2개의 소형 경쇄를 갖는다)로 구성되어 예를 들면 한 개의 단위를 갖는 단량체, 두 개의 단위를 갖는 이량체 또는 다섯 개의 단위를 갖는 오량체를 형성한다. 항체는 비공유 상호작용에 의해 항원으로 알려진 다른 분자 또는 구조와 결합할 수 있다. 이 결합은 항체가 특정 구조에만 고 친화성으로 결합한다는 의미에서 특이적이다. 항체에 의해 인식되는 항원의 특정 부위를 에피토프 또는 항원결정기라고 한다. 에피토프에 결합하는 항체의 부위는 때때로 파라토프라고 칭하며 소위 항체의 가변 도메인 또는 가변 영역(Fv)에 존재한다. 가변 도메인은 골격영역(FR)에 의해 공간을 두고 떨어져 있는 3개의 소위 상보성결정영역(CDR)을 포함한다.
- [0062] 본 발명과 관련하여 언급되는 CDR은 초티아[참조:Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 1987, 196: 901-917] 및 캐뻬[참조:E.A. Kabat, T.T. Wu, H. Bilofsky, M. Reid-Miller and H. Perry, Sequence of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda(1983)]의 정의를 기초로 한다.
- [0063] 본 분야에서 항체들이 개발되었고 이들 항체는 의약 및 기술에서 다양한 도구로 사용되었다. 따라서, 본 발명과 관련하여 용어 "항체 분자" 또는 "항체"(본원에서 동의어로 사용된다)는 자연계에서 발견될 수 있는 항체, 예를 들어 2개의 경쇄와 2개의 중쇄를 포함하는 항체 또는 카멜리드 종에서와 같이 단지 2개의 중쇄를 포함하는 항체만을 포함하는 것은 아니며, 추가로 항원에 대한 결합 특이성 및 면역글로불린의 가변 도메인과 구조적 유사성을 갖는 파라토프를 적어도 하나 포함하는 모든 분자를 포함한다.
- [0064] 따라서, 본 발명에 따른 항체 분자는 다클론 항체, 단클론 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 항체의 단편, 특히 Fv, Fab, Fab' 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편, 단일쇄 항체, 특히 단일쇄 가변 단편(scFv), 소형 모듈 면역약제(SMIP), 도메인 항체, 나노바디 또는 디아바디일 수 있다.
- [0065] 다클론 항체는 상이한 아미노산 서열을 갖는 항체 분자의 집합이며 본 분야에 잘 알려진 방법에 의해 척추동물을 항원으로 면역화한 후 척추동물의 혈액으로부터 획득할 수 있다.

- [0066] 단클론 항체(mAb 또는 moAb)는 아미노산 서열이 동일한 일특이적 항체이다. 이들 항체는 골수종(B 세포 암) 세포와 특이 항체-생성 B 세포의 융합의 클론인 잡종 세포주(하이브리도마라고 한다)로부터 하이브리도마 기술에 의해 제조할 수 있다[참조:Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256:495-7]. 다른 방법으로서, 단클론 항체는 숙주 세포에서 재조합 발현에 의해 제조될 수 있다[참조:Norderhaug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I.(May 1997). "Versatile Vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells." J Immunol Methods 204(1): 77-87; 또한 하기 참조].
- [0067] 사람에게 적용하는 경우 마우스와 같은 다른 종에서 최초 유도된 항체의 면역원성을 감소시키는 것이 종종 필요하다. 이것은 키메라 항체의 작제 또는 "인간화"라고 하는 과정에 의해 달성될 수 있다. 본원에서 "키메라 항체"는 한 종(예를 들어, 마우스)으로부터 유도된 서열 부분(예를 들어, 가변 도메인)과 이에 융합된 상이한 종(예를 들어, 사람)으로부터 유도된 서열 부분(예를 들어, 불변 도메인)을 포함하는 항체로 이해된다. "인간화 항체"는 비인간 종에서 최초 유도된 가변 도메인을 포함하고 특정 아미노산들이 돌연변이화되어 비인간 가변 도메인의 전체 서열이 인간 가변 도메인의 서열과 더 가깝게 유사한 항체이다. 항체를 키메라화 및 인간화하는 방법은 본 분야에 잘 알려져 있다[참조:Billetta R, Lobuglio AF. "Chimeric antibodies". Int Rev Immunol. 1993; 10(2-3): 165-76; Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G(1988). "Reshaping human antibodies for therapy". Nature: 332:323].
- [0068] 또한, 인간 유전체로부터 유도된 서열을 기초로 항체를 제조하는 기술이 개발되었고, 예로는 파아지 디스플레이 또는 트랜스제닉 동물의 사용을 들 수 있다[참조:국제 특허 출원 공보 제WO 90/05144호; D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths and G. Winter(1991) "By-passing immunisation. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." J.Mol.Biol., 222, 581-597; Knappik et al., J.Mol.Biol. 296: 57-86, 2000; S. Carmen and L. Jermutus, "Concepts in antibody phage display". Briefings in Functional Genomics and Proteomics 2002 1(2): 189-203; Lonberg N, Huszar D. "Human antibodies from transgenic mice". Int Rev Immunol. 1995; 13(1):65-93.; Bruggemann M, Taussig MJ. "Production of human antibody repertoires in transgenic mice". Curr Opin Biotechnol. 1997 Aug;8(4):455-8.]. 이러한 항체는 본 발명과 관련하여 "인간 항체"이다.
- [0069] 본 발명에 따른 항체 분자는 또한 항원 결합 성질을 보유하는 면역글로불린의 단편, 예를 들어 Fab, Fab' 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 포함한다. 이와 같은 단편은 면역글로불린을 예를 들어 단백질분해에 의해 절편화하거나 이러한 단편의 재조합 발현에 의해 수득할 수 있다. 예를 들면, 면역글로불린 분해는 통상적인 기술의 수단에 의해, 예를 들어 파파인 또는 펩신(참조: 국제 특허 출원 공보 제WO 94/29348호)을 사용하거나 엔도프로테이나제 Lys-C[참조:Kleemann, et al., Anal. Chem. 80, 2001-2009, 2008]를 사용하여 달성할 수 있다. 항체의 파파인 또는 Lys-C 분해는 전형적으로 소위 Fab 단편이라고 하고 각각이 단일 항원 결합 부위를 갖는 두 개의 동일한 항원 결합 단편과 나머지 Fc 단편을 생성한다. 펩신 처리는 F(ab')<sub>2</sub>를 생성한다. 숙주 세포에서 재조합 발현에 의해 Fab 분자를 제조하는 방법은 하기에 보다 자세하게 기술된다.
- [0070] 면역글로불린의 가변 도메인 또는 이러한 가변 도메인으로부터 유도된 분자를 상이한 분자에 도입하는 기술이 많이 개발되었다. 이러한 것들도 또한 본 발명에 따른 "항체 분자"로 고려되어야 한다. 일반적으로 이들 항체 분자들은 면역글로불린에 비하여 크기가 작으며 단일 아미노산 쇠를 포함하거나 몇 개의 아미노산 쇠로 구성될 수 있다. 예를 들면, 단일쇄 가변 단편(scFv)는 면역글로불린의 중쇄와 경쇄의 가변 영역들이 짧은 링커, 보통 세린(S) 또는 글리신(G)과 함께 결합된 융합체이다[참조: 국제 특허 출원 공보 제WO 88/01649호; 제WO 91/17271호; Huston et al; International Reviews of Immunology, Volume 10, 1993, 195-217]. "단일쇄 항체" 또는 "나노바디"는 단일 Ig-유사 도메인에서 항원-결합 부위를 갖는다[참조: 국제 특허 출원 공보 제WO 94/04678호; 제WO 03/050531호, Ward et al., Nature. 1989 Oct 12;341(6242):544-6; Revets et al., Expert Opin Bio Ther. 5(1): 111-24, 2005]. 동일하거나 상이한 항원에 대해 결합 특이성을 갖는 한 가지 이상의 단일 도메인 항체는 함께 결합될 수 있다. 디아바디는 2개의 가변 도메인을 포함한 2개의 아미노산 쇠로 구성된 이가 항체 분자이다[참조: 국제 특허 출원 공보 제WO 94/13804호, Holliger et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1993 Jul 15;90(14):6444-8]. 항체-유사 분자의 다른 예는 면역글로불린 상위계열 항체이다[IgSF; 참조(Srinivasan and Roeske, Current Protein Pept. Sci. 2005, 6(2): 185-96)]. 상이한 개념에 의해 소위 소형 모듈 면역억제(SMIP)가 제공되었고, 이것은 단일쇄 힌지(hinge)에 결합된 Fv 도메인과, 불변 도메인 CH1이 결합된 이펙터 도메인을 포함한다[참조: 국제 특허 출원 공보 제WO 02/056910호].

- [0071] 추가의 관점에서, 본 발명의 항체 분자는 면역글로불린 가변 도메인과 비슷한 결합 특이성 및 친화성을 갖는 한 면역글로불린 가변 도메인과 구조적으로 먼 관련성만을 갖거나 전혀 관련성이 없을 수도 있다. 이와 같은 비면역글로불린 "항체 모사체"는 때때로 "스캐폴드 단백질"이라고 하는데 단백질 A, 리포칼린, 피브로넥틴 도메인, 안키린 공통 반복 도메인 및 티오레독신의 유전자를 기반으로 할 수 있다[참조:Skerra, *Current Opinion in Biotechnology* 2007, 18(4): 295-304]. 본 발명과 관련하여 바람직한 양태는 설계 안키린 반복 단백질이다 (DARPin's; Steiner et al., *J Mol Biol.* 2008 Oct 24;382(5): 1211-27; Stumpp MT, Amstutz P. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2007 Mar; 10(2): 153-9).
- [0072] 항체 분자는 이의 특성에 목적하는 영향을 미치는 다른 분자에 융합되거나(융합 단백질로서) 결합될 수 있다(공유 또는 비공유 결합에 의해). 예를 들면, 혈액과 같은 체액에서의 항체 분자의 약력학적 성질인 안정성을 향상시키는 것이 필요할 수 있으며, 특히 단일쇄 항체 또는 도메인 항체의 경우 그러하다. 이러한 관점에서 많은 기술이 개발되었고, 특히 순환하는 항체 분자들의 반감기를 연장하는 기술이 개발되었으며, 이러한 기술의 예로는 폐질화[참조: 국제 특허 출원 공보 제WO 98/25971호; 제WO 98/48837호; 제WO 2004081026호], 항체 분자를 알부민과 같은 혈청 단백질에 친화성을 갖는 다른 항체 분자와 융합 또는 공유 결합[참조: 국제 특허 출원 공보 제WO 2004041865호; 제WO 2004003019호] 또는 항체 분자를 알부민 또는 트랜스페린과 같은 혈청 단백질을 전부 또는 일부와의 융합 단백질로서 발현[참조: 국제 특허 출원 공보 제WO 01/79258호]하는 것이 포함된다.
- [0073] 추가의 관점에서, 항체 분자는 항응고제에 대해 결합 특이성을 갖는다. "결합 특이성"은 항체 분자가 구조적으로 무관한 분자에 대해서 보다 항응고제에 대해서 상당히 더 높은 결합 친화성을 갖는다는 것을 의미한다.
- [0074] 친화성은 항체 분자상의 단일 항원-결합 부위와 단일 에피토프사이의 상호작용이다. 이것은 결합상수  $K_A = k_{ass}/k_{diss}$  또는 해리상수  $K_D = k_{diss}/k_{ass}$ 로 표시된다.
- [0075] 본 발명의 한 가지 관점에서, 항체는 항응고제와 예를 들어 표면 플라즈몬 공명 분석[참조:Malmqvist M., "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics.", *Curr Opin Immunol.* 1993 Apr;5(2):282-6]에 의해 결정된 친화성으로 결합하며,  $K_D$  값의 범위는 0.1 pM 내지 100  $\mu$ M, 바람직하게는 1 pM 내지 100  $\mu$ M, 바람직하게는 1 pM 내지 1  $\mu$ M이다. 또한, 항체 친화성은 역학 배제 검사(KinExA) 기술을 이용하여 측정할 수 있다[참조:Darling, R.J., and Braut P-A., "Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions." *ASSAY and Drug Development Technologies.* 2004, Dec 2(6): 647-657].
- [0076] 항체 분자의 결합 친화성은 친화성 성숙으로 알려진 방법[참조:Marks et al., 1992, *Biotechnology* 10:779-783; Barbas, et al., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 91 :3809-3813; Shier et al., 1995, *Gene* 169:147-155]에 의해 증가시킬 수 있다. 따라서, 친화성 성숙된 항체 또한 본 발명에 포함된다.
- [0077] 본 발명의 추가 관점에서, 항체 분자는 항응고제의 활성을 중화시킬 수 있다. 즉, 항체 분자와 결합했을 때 항응고제는 항응고 활성을 더 이상 발휘할 수 없거나 상당히 감소된 크기로 항응고 활성을 나타낸다. 바람직하게는, 해당 항응고제에 적절한 활성 검사로 결정했을 때, 특히 트롬빈에 민감한 응고 검사, 예를 들면 에카린 응고 시간 또는 트롬빈 응고 시간[참조:H. Bounameaux, Marbet GA, Lammle B, et al. "Monitoring of heparin treatment. Comparison of thrombin time, activated partial thromboplastin time, and plasma heparin concentration, and analysis of the behaviour of antithrombin III". *American Journal of Clinical Pathology* 1980 74(1): 68-72]으로 결정했을 때 항응고제 활성이 항체 결합시 적어도 2배, 5배, 10배 또는 100배 감소한다.
- [0078] 본 발명의 항체 분자를 제조하는 경우 당업자는 본 분야에 잘 알려진 다양한 방법중에서 선택할 수 있다[참조:Norderhaug et al, *J Immunol Methods* 1997,204(1): 77-87; Kipriyanow and Le Gall, *Molecular Biotechnology* 26: 39- 60,2004; Shukla et al, 2007, *J. Chromatography B*, 848(1): 28-39].
- [0079] 항응고제는 위에서 개략적으로 기술된 바와 같이 본 분야에 잘 알려져 있다. 본 발명의 추가의 관점에서 항응고제는 직접 트롬빈 억제제, 인자 Xa 억제제 또는 비타민 K 길항제이다. 비타민 K 길항제의 예로는 와파린을 포함한 쿠마린을 들 수 있다. 간접 주 인자 Xa 억제제의 예는 안티트롬빈 III의 활성화를 통해 작용하는 헤파린 물질의 그룹(베미파린, 세르토파린, 달테파린, 에녹사파린, 나드로파린, 파르나파린, 레비파린, 틴자파린과 같은 저 분자량 헤파린 생체물을 포함한다), 특정 올리고당류(폰다파리누스, 이드라파리누스), 헤파리노이드(다나파로이드, 설로텍사이드, 더마탄 설페이트) 및 직접 인자 Xa 억제제(아픽사반, 오타믹사반, 리바록사반)를 포

함한다. 트롬빈 억제제의 예는 이가 히루딘(비발리루딘, 레피루딘, 데시루딘) 및 일가 화합물 아르가트로반 및 다비가트란을 포함한다.

- [0080] 따라서, 추가의 관점에서, 항응고제는 다비가트란, 아르가트로반, 멜라가트란, 지멜라가트란, 히루딘, 비발리루딘, 레피루딘, 데시루딘, 아픽사반, 에독사반, 오타믹사반, 리바록사반, 데피브로타이드, 라마트로반, 안티트롬빈 III 또는 드로트레코진 알파이다.
- [0081] 추가의 양태로서, 항응고제는 아래 화학식 I의 이치환된 바이사이클릭 헤테로사이클 또는 이의 호변이성체, 입체이성체 및 염이다:
- [0082] 화학식 I
- [0083]  $R_a - A - Het - B - Ar - E$
- [0084] 상기 화학식 I에서,
- [0085] A는 그룹 Het의 벤조, 피리도 또는 티에노 모이어티에 결합된 카르보닐 또는 설포닐 그룹을 나타내고;
- [0086] B는 그룹 Ar에 결합된 메틸렌 그룹이 산소 또는 황 원자에 의해 또는  $-NR_1-$  그룹(여기서,  $R_1$ 은 수소 원자 또는  $C_{1-4}$ -알킬 기를 나타낸다)에 의해 대체될 수 있는 에틸렌 그룹을 나타내며;
- [0087] E는  $R_bNH-C(=NH)-$  그룹(여기서,  $R_b$ 는 수소 원자, 하이드록시,  $C_{1-9}$ -알콕시카르보닐(여기서,  $C_{1-9}$ -알콕시카르보닐의 2번 위치의 에톡시 모이어티는  $C_{1-3}$ -알킬설포닐 또는 2-( $C_{1-3}$ -알콕시)-에틸 그룹에 의해 추가로 치환될 수 있다), 사이클로헥실옥시카르보닐, 페닐- $C_{1-3}$ -알콕시카르보닐, 벤조일, p- $C_{1-3}$ -알킬벤조일 또는 피리디노일 그룹을 나타낸다)을 나타내고;
- [0088] Ar은 염소 원자, 메틸, 에틸 또는 메톡시 그룹에 의해 임의로 치환되는 1,4-페닐렌 그룹을 나타내거나 2,5-티에닐렌 그룹을 나타내며;
- [0089] Het는 1-( $C_{1-3}$ -알킬)-2,5-벤즈이미다졸릴렌, 1-사이클로프로필-2,5-벤즈이미다졸릴렌, 2,5-벤조티아졸릴렌, 1-( $C_{1-3}$ -알킬)-2,5-인돌릴렌, 1-( $C_{1-3}$ -알킬)-2,5-이미다조[4,5-b]피리디닐렌, 3-( $C_{1-3}$ -알킬)-2,7-이미다조[1,2-a]피리디닐렌 또는 1-( $C_{1-3}$ -알킬)-2,5-티에노[2,3-d]이미다졸릴렌 그룹을 나타내고;
- [0090]  $R_a$ 는  $R_2NR_3-$  그룹을 나타내고, (여기서,  $R_2$ 는 카르복시,  $C_{1-6}$ -알킬옥시카르보닐, 벤질옥시카르보닐,  $C_{1-3}$ -알킬설포닐아미노카르보닐 또는 1H-테트라졸-5-일 그룹에 의해 치환될 수 있는  $C_{1-4}$  알킬 그룹; 하이드록시, 벤질옥시, 카르복시- $C_{1-3}$ -알킬아미노,  $C_{1-3}$ -알콕시카르보닐- $C_{1-3}$ -알킬아미노, N-( $C_{1-3}$ -알킬)-카르복시- $C_{1-3}$ -알킬아미노 또는 N-( $C_{1-3}$ -알킬)- $C_{1-3}$ -알콕시카르보닐- $C_{1-3}$ -알킬아미노 그룹에 의해 치환되는  $C_{2-4}$ -알킬 그룹(여기서, 상기 그룹들에서 인접한 질소 원자에 대해  $\alpha$ -위치에 있는 탄소 원자는 치환될 수 없다);  $R_3$ 은  $C_{3-7}$ -사이클로알킬 그룹, 프로파르길 그룹(여기서, 불포화 부분은  $R_2NR_3$  그룹의 질소 원자에 직접적으로 결합될 수 없다), 불소 또는 염소 원자에 의해, 또는 메틸 또는 메톡시 그룹에 의해 임의로 치환되는 페닐 그룹, 메틸 그룹에 의해 임의로 치환되는 피라졸릴, 피리다졸릴 또는 피리디닐 그룹을 나타내거나;  $R_2$ 와  $R_3$ 은 이들 사이의 질소 원자와 함께, 카르복시 또는  $C_{1-4}$ -알콕시카르보닐 그룹에 의해 임의로 치환되고, 페닐 환이 추가로 융합될 수 있는 5- 내지 7-원 사이클로알킬렌이미노 그룹을 나타낸다. 일반식(I)의 화합물, 이들 화합물의 제법 및 이들의 항응고제로서의 용도는 국제 특허 출원 공보 제W0 98/37075호에 기술되어 있다.
- [0091] 추가의 양태로서, 항응고제는(a) 2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈티아졸-5-카르복실산-N-페닐-N-(2-카르복시에틸)-아미드,
- [0092] (b) 2-[N-(4-아미디노페닐)-N-메틸-아미노메틸]-벤즈티아졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-카르복시카르보닐에틸)-아미드,
- [0093] (c) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,

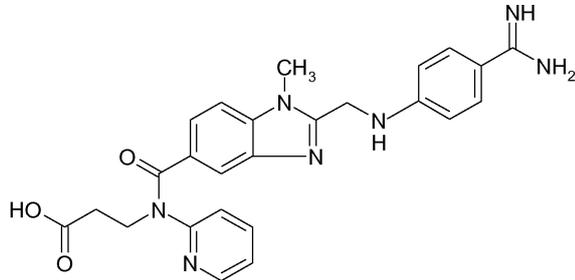
- [0094] (d) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(3-하이드록시카르보닐프로필)-아미드,
- [0095] (e) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(하이드록시카르보닐메틸)-아미드,
- [0096] (f) 1-메틸-2-[2-(2-아미디노티오펜-5-일)에틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0097] (g) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0098] (h) 1-메틸-2-[2-(4-아미디노페닐)에틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0099] (i) 1-메틸-2-[2-(4-아미디노페닐)에틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0100] (j) 1-메틸-2-[2-(4-아미디노페닐)에틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-[2-(1H-테트라졸-5-일)에틸]-아미드,
- [0101] (k) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-[2-(1H-테트라졸-5-일)에틸]-아미드,
- [0102] (l) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-N-메틸-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0103] (m) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-N-메틸-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(3-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0104] (n) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-N-메틸-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0105] (o) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-[(N-하이드록시카르보닐에틸)-N-메틸]-2-아미노에틸]-아미드,
- [0106] (p) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(3-플루오로페닐)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0107] (q) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(4-플루오로페닐)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0108] (r) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노-2-메톡시-페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0109] (s) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노-2-메톡시-페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0110] (t) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-인돌-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-메톡시카르보닐에틸)-아미드,
- [0111] (u) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-티에노[2,3-d]이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0112] (v) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-페닐-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0113] (w) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,
- [0114] (x) 1-메틸-2-[N-(4-아미디노-2-메톡시-페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드,

[0115] (y) 1-메틸-2-[N-[4-(N-n-헥실옥시카르보닐아미디노)페닐]-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-에톡시카르보닐에틸)-아미드, 및

[0116] 이의 호변이성체, 입체이성체 및 염중에서 선택되는 화합물이며, 이들 화합물 모두는 국제 특허 출원 공보 제WO 98/37075호에 기술되어 있다.

[0117] 본 발명과 관련하여 바람직한 항응고제는 아래 화학식 II의 다비가트란(CAS 211914-51-1, N-[2-(4-아미디노페닐)아미노메틸]-1-메틸-1H-벤즈이미다졸-5-일카르보닐]-N-(2-피리딜)-베타-알라닌)이다:

[0118] [화학식 II]

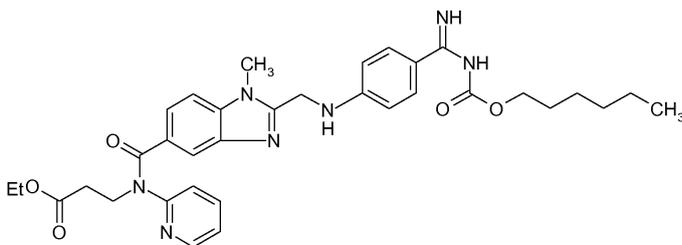


[0119]

[0120] 다비가트란은 국제 특허 출원 공보 제WO 98/37075호를 통해 1-메틸-2-[N-(4-아미디노페닐)-아미노메틸]-벤즈이미다졸-5-일-카르복실산-N-(2-피리딜)-N-(2-하이드록시카르보닐에틸)-아미드의 명명하에 트롬빈-억제 효과 및 트롬빈 시간의 지연 효과를 갖는 화합물로 공개되었다. 또한 문헌[Huel et al., J Med Chem 2002, 45(9): 1757-66]을 참조.

[0121] 다비가트란은 아래 화학식 III의 프로드러그로서 응용된다:

[0122] [화학식 III]



[0123]

[0124] 화학식 III의 화합물(다비가트란 에텍실레이트로 명명, CAS 211915-06-9; 에틸 3-[(2-([4-(헥실옥시카르보닐아미노-이미노-메틸)-페닐아미노]-메틸)-1-메틸-1H-벤즈이미다졸-5-일카르보닐]-피리딘-2-일-아미노]-프로피오네이트)은 체내로 유입된 후 화학식 II의 활성 화합물로 전환된다. 다비가트란 에텍실레이트의 바람직한 다형체는 다비가트란 에텍실레이트 메실레이트이다.

[0125] 다비가트란의 주된 용도는 수술 후 심부정맥혈전증 예방, 고도 심부정맥혈전증의 치료 및 심방세동 환자의 뇌졸중 예방이다[참조:Eriksson et al., Lancet 2007, 370(9591): 949-56; Schulman S et al, N Engl J Med 2009,361(24): 2342-52; Connolly S et al, N Engl J Med 2009, 361(12): 1139-51; Wallentin et al, Lancet 2010, 376(9745): 975-983].

[0126] 사람의 체내에서 카르복실레이트 모이어티의 글루쿠로니드화는 다비가트란의 사람의 주대사경로이다[참조:Ebner et al., Drug Metab. Dispos. 2010, 38(9): 1567-75]. 이 결과 1-O-아실글루쿠로니드(베타 아노머)가 형성된다. 1-O-아실글루쿠로니드는 소량이 아글리콘으로 가수분해되는 것 이외에 수용액에서 비효소적 아실 이동이 진행될 수 있고 그 결과 2-O-, 3-O- 및 4-O-아실글루쿠로니드가 형성된다. 정제된 1-O-아실글루쿠로니드 및 이의 이성체 재배열 생성물로 실험한 결과 다비가트란과 비교하여 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간의 연장에 있어서 동등한 효능을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

[0127] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 다비가트란 및 다비가트란 에텍실레이트 둘 다와 결합한다.

- [0128] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 다비가트란 및 다비가트란의 0-아실글루쿠로니드(특히 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로니드) 둘 다와 결합한다.
- [0129] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 또한 다비가트란의 2-0-, 3-0- 및 4-0-아실글루쿠로니드와 결합한다.
- [0130] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 다비가트란 및 다비가트란의 0-아실글루쿠로니드(특히 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로니드)의 활성을 중화시킬 수 있다.
- [0131] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 다비가트란에 대해 결합 특이성을 나타내고 도 5 및 도 6에 도시된 CDR 서열을 포함한다.
- [0132] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 도 5에 도시된 중쇄 CDR 서열 및 도 6에 도시된 경쇄 CDR 서열을 포함한다.
- [0133] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 도 5에 도시된 중쇄 가변 도메인 서열 및 도 6에 도시된 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.
- [0134] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 도 5에서 DBG 13 VH로 지정된 중쇄 가변 도메인 서열 및 도 6에서 DBG 13 VK로 지정된 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.
- [0135] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 도 5에서 DBG 14 VH로 지정된 중쇄 가변 도메인 서열 및 도 6에서 DBG 14 VK로 지정된 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.
- [0136] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 도 5에서 DBG 22 VH로 지정된 중쇄 가변 도메인 서열 및 도 6에서 DBG 22 VK로 지정된 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.
- [0137] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 도 5에서 Eng VH# 14로 지정된 중쇄 가변 도메인 서열 및 도 6에서 Eng VK# 11로 지정된 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.
- [0138] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 도 5에서 Eng VH# 15로 지정된 중쇄 가변 도메인 서열 및 도 6에서 Eng VK# 17로 지정된 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.
- [0139] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 도 5에서 Eng VH# 15로 지정된 중쇄 가변 도메인 서열 및 도 6에서 Eng VK# 18로 지정된 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.
- [0140] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 도 5에서 Eng VH# 31로 지정된 중쇄 가변 도메인 서열 및 도 6에서 Eng VK# 18로 지정된 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.
- [0141] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 다비가트란에 대해 결합 특이성을 나타내고 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 그룹에서 선택되는 CDR1, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 그룹에서 선택되는 CDR2 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 이루어진 그룹에서 선택되는 CDR3을 갖는 중쇄 가변 도메인과 서열번호 11, 서열번호 12 및 서열번호 13으로 이루어진 그룹에서 선택되는 CDR1, 서열번호 14의 CDR2 및 서열번호 15의 CDR3을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0142] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 1의 CDR1, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 그룹에서 선택되는 CDR2 및 서열번호 10의 CDR3을 갖는 중쇄 가변 도메인과 서열번호 13의 CDR1, 서열번호 14의 CDR2 및 서열번호 15의 CDR3을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0143] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 1의 CDR1, 서열번호 7의 CDR2 및 서열번호 10의 CDR3을 갖는 중쇄 가변 도메인과 서열번호 13의 CDR1, 서열번호 14의 CDR2 및 서열번호 15의 CDR3을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0144] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 1의 CDR1, 서열번호 5의 CDR2 및 서열번호 10의 CDR3을 갖는 중쇄 가변 도메인과 서열번호 11의 CDR1, 서열번호 14의 CDR2 및 서열번호 15의 CDR3을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0145] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 16, 18, 20, 22, 24 및 26으로 이루어진 그룹에서 선택되는 중쇄 가변 도메인과 서열번호 17, 19, 21, 23, 25 및 27로 이루어진 그룹에서 선택되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0146] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 16의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 17의 경쇄 가변 도메인

을 포함한다.

- [0147] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 18의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 19의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0148] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 20의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 21의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0149] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 22의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 23의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0150] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 24의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 25의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0151] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 24의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 27의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0152] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 26의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 27의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0153] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 scFv 분자이다. 이 형태에서, 본원에 기술된 가변 도메인은 예를 들어 서열번호 28, 29, 30 또는 31로 이루어진 그룹에서 선택되는 적합한 링커 펩타이드와 서로 융합될 수 있다. 이 작제물은 이들 구성 요소를, N 말단으로부터 C 말단으로, (중쇄 가변 도메인)-(링커 펩타이드)-(경쇄 가변 도메인) 또는 (경쇄 가변 도메인)-(링커 펩타이드)-(중쇄 가변 도메인)의 순서로 포함할 수 있다.
- [0154] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 32 또는 서열번호 33을 포함하는 scFv 분자이다. 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 32 또는 서열번호 33으로 이루어진 scFv 분자이다.
- [0155] scFv 작제물을 암호화하는 핵산을 숙주 세포(예를 들어, 이. 콜라이, 피키아 파스토리스 또는 포유 동물 세포주(예를 들어, CHO 또는 NS0))에서 재조합 발현시켜 기능성 scFv 분자를 생성하는 방법들은 본 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 참조: Rippmann et al., Applied and Environmental Microbiology 1998, 64(12): 4862-4869; Yamawaki et al., J. Biosci. Bioeng. 2007, 104(5): 403-407; Sonoda et al., Protein Expr. Purif. 2010, 70(2): 248-253).
- [0156] 특히 본 발명의 scFv 항체 분자는 다음과 같이 제조할 수 있다. 작제물은 유도성 프로모터의 조절하에 W3110, TG1, BL21, BL21(DE3), HMS174, HMS174(DE3), MM294와 같은 상이한 이. 콜라이 균주에서 발현시킬 수 있다. 상기 프로모터는 lacUV5, tac, T7, trp, T5, araB중에서 선택할 수 있다. 배양 배지는 바람직하게는 Wilms 등 2001(Wilms et al., Biotechnology and Bioengineering 2001, 73(2): 95-103), DeLisa 등 1999(DeLisa et al., Biotechnology and Bioengineering 1999, 65(1): 54-64)에 따라 완전히 규명된 배지 또는 이의 균등물이다. 그러나, 회분 배지 및/또는 유기 배지에 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트레오닌, 트립토판 및 발린과 같은 아미노산 또는 대두 펩톤 또는 효모 추출물과 같은 복합 배지 성분을 보충하는 것이 유익할 수 있다. 발효 공정은 유가식으로 실시한다. 조건: 온도는 20 내지 40°C, pH는 5.5 내지 7.5, DO는 20% 이상으로 유지한다. 초기 탄소원의 고갈 후 배양물에 상기된 유기 배지 또는 균등물을 공급한다. 발효조에 40 내지 100 g/L의 건조균체량이 도달하면, 사용된 프로모터 시스템에 상응하는 적절한 유도제(예를 들어, IPTG, 락토즈, 아라비노즈)로 배양액을 유도한다. 유도는 연장된 시간에 걸쳐 발효조내로 개개의 유도제를 공급하거나 유도제의 배합물을 공급함으로써 펄스 완전 유도로서 또는 부분 유도로서 수행할 수 있다. 생산 단계는 적어도 4시간을 지속해야 한다. 세포는 원심분리에 의해 보울 원심분리기(bowl centrifuge), 원통형 보울 원심분리기 또는 원판 기동 원심분리기(disc stack centrifuge)에 회수하고 배양 상청액은 버린다.
- [0157] 이. 콜라이 세포 덩어리를 4 내지 8배량의 용해 완충액(인산염 또는 트리스 완충액, pH 7 내지 8.5)에 재현탁시킨다. 세포 용해는 바람직하게는 고압 균질화에 의해 수행하고, 이어서 원심분리하여 보울, 원통형 보울 또는 원판 기동 원심분리기로 펠렛을 회수한다. scFv 봉입체를 함유하는 펠렛을 pH8.0에서 20mM 트리스, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 2M 요소, 0.5% 트리톤 X-100으로 2 내지 3회 세척하고, pH8.0에서 20mM 트리스, 150mM NaCl, 5mM EDTA를 사용하여 2회 세척단계로 세척한다. scFv 봉입체를 최종적으로 보울, 원통형 보울 또는 원판 기동 원심분리인 원심분리기로 회수한다. scFv 봉입체의 가용화는 6 M 구아니딘-HCl 또는 8 내지 10 mM 요소와 같은 무질서유발제를 함유하는 100 mM 글리신/NaOH, 5 mM EDTA, 20 mM 디티오프레이트, pH 9.5 내지 10.5에서 실시할 수 있다. 30분 내지 60분 동안 배양 후 용액을 원심분리하고 표적 단백질을 함유한 상청액을 후속적 재폴딩

을 위해 회수한다. 재폴딩은 바람직하게는 유가식으로 단백질 용액을 재폴딩 완충액중에 1:10-1:50으로 희석하여 0.1 내지 0.5 mg/ml의 최종 단백질 농도를 조성한다. 재폴딩 완충액은 50 내지 100 mM 트리스 및/또는 50 내지 100 mM 글리신, 50 내지 150 mM NaCl, 1 내지 3 M 요소, 0.5 내지 1 M 아르기닌, 2 내지 6 mM의 산화환원계(예를 들어, 시스테인/시스틴 또는 산화/환원 글루타티온), pH 9.5 내지 10.5를 함유할 수 있다. 4°C에서 24 내지 72 시간 배양 후 재폴딩 용액을 임의로 0.22 μm 필터로 여과하고, 희석한 다음, pH를 7.0 내지 8.0으로 조절한다. 단백질을 pH 7.0 내지 8.5에서 결합 방식의 양이온 교환 크로마토그래피(예를 들어, Toyopearl GigaCap S-650M, SP Sepharose FF 또는 S HyperCel™)로 분리한다. 용출은 선형 증가 NaCl 구배로 수행한다. 표적 단백질을 함유한 분획을 수집한 후 비결합 방식의 음이온 교환 컬럼(예를 들어, Toyopearl GigaCap Q-650M, Q-Sepharose FF, Q HyperCel™)에 이어서 양이온 교환 연마 단계(예를 들어, SP Sepharose HP)로 분리한다. 최소 90%의 순도 수준을 갖는 표적 단백질을 함유한 분획을 모아 PBS에서 정용여과 또는 크기별배제 크로마토그래피로 제형화한다. 환원 SDS-PAGE에 의해 생성된 scFv 분자의 실체 및 생성물 품질을 분석하며, 여기서, scFv 분자는 약 26 kDa의 주 밴드 한개로 검출될 수 있다. scFv의 특성분석을 위한 추가의 검사는 질량분석, RP-HPLC 및 SE-HPLC를 포함한다.

- [0158] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 면역 글로불린, 바람직하게는 IgG1 형 또는 이의 이펙터 기능 녹아웃 또는 IgG4 형의 면역글로불린이다. 본 발명의 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 34, 서열번호 40 또는 서열번호 42를 포함한 중쇄와 서열번호 35 또는 서열번호 43을 포함한 경쇄를 갖는 면역글로불린이다.
- [0159] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 34를 포함한 중쇄와 서열번호 35를 포함한 경쇄를 갖거나 서열번호 40을 포함한 중쇄와 서열번호 35를 포함한 경쇄를 갖는 면역글로불린이다. 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 42를 포함한 중쇄와 서열번호 43을 포함한 경쇄를 갖는 면역글로불린이다.
- [0160] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 34로 이루어진 중쇄와 서열번호 35로 이루어진 경쇄를 갖거나 서열번호 40으로 이루어진 중쇄와 서열번호 35로 이루어진 경쇄를 갖는 면역글로불린이다. 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 42로 이루어진 중쇄와 서열번호 43로 이루어진 경쇄를 갖는 면역글로불린이다.
- [0161] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 Fab 분자이다. 이 형태에서, 상기 기재된 가변 도메인은 바람직하게는 사람 기원의 면역글로불린 불변 도메인에 각각 융합될 수 있다. 따라서, 중쇄 가변 도메인은 CH<sub>1</sub> 도메인(소위 Fd 단편이라고 한다)에 융합될 수 있고, 경쇄 가변 도메인은 CL 도메인에 융합될 수 있다.
- [0162] 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 36 또는 서열번호 38을 포함한 Fd 단편과 서열번호 37 또는 서열번호 39를 포함한 경쇄를 갖는 Fab 분자이다. 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 36을 포함한 Fd 단편과 서열번호 37을 포함한 경쇄를 갖는 Fab 분자이다. 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 38을 포함한 Fd 단편과 서열번호 39를 포함한 경쇄를 갖는 Fab 분자이다. 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 41을 포함한 Fd 단편과 서열번호 37을 포함한 경쇄를 갖는 Fab 분자이다. 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 36으로 이루어진 Fd 단편과 서열번호 37로 이루어진 경쇄를 갖는 Fab 분자이다. 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 38로 이루어진 Fd 단편과 서열번호 39로 이루어진 경쇄를 갖는 Fab 분자이다. 본 발명의 또 다른 관점에서, 항체 분자는 서열번호 41로 이루어진 Fd 단편과 서열번호 37로 이루어진 경쇄를 갖는 Fab 분자이다.
- [0163] Fab 작제물을 암호화하는 핵산은 이. 콜라이, 피키아 파스토리스 또는 포유 동물 세포주(예를 들어, CHO 또는 NS0)와 같은 숙주 세포에서 상기 중쇄 및 경쇄를 발현하는데 사용될 수 있다. Fd 단편과 경쇄를 포함하는 기능성 Fab 분자로 상기 쇄의 적절한 폴딩, 결합 및 디설파이드 결합을 제공하는 방법들이 본 분야에 공지되어 있다 [참조:Burtet et al., J. Biochem. 2007,142(6),665-669; Ning et al., Biochem. Mol. Biol. 2005, 38: 204-299; Quintero-Hernandez et al., Mol. Immunol. 2007, 44: 1307-1315; Willems et al. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2003;786:161-176.].
- [0164] 특히, 본 발명의 Fab 분자는 CHO 세포에서 다음과 같이 제조할 수 있다. 무혈청 배지 현탁액에서 성장하는 CHO-DG44 세포[참조:Urlaub, G., Kas, E., Carothers, A.M., and Chasin, L.A.(1983). Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. Cell 33, 405-412]를 Lipofectamine™ 및 Plus™ 시약(Invitrogen)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 Fab 분자의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 발현 작제물로 형질감염시킨다. 48시간 후, 세포를 200 μg/ml의 항생제 G418이 함유되고 하이포크산틴과 티미딘이 없는 배지에서 선별하여 안정하게 형질감염된 세포 군체를 생성한다. 이어서, 안정한 형질감염체

를 배양 배지에 메토티렉세이트(MTX)를 농도를 높이면서(100 또는 400 nM 까지) 첨가함으로써 유전자 증폭시킨다. 일단 세포들이 적응하면 10 내지 11일에 걸쳐 유가발효시켜 Fab 단백질 물질을 생성한다.

- [0165] CHO-DG44 세포 및 안정한 형질감염체의 현탁 배양액을 화학적 한정 무혈청 배양 배지에서 항온배양한다. 식종 원배양물을 매 2 내지 3일 마다 각각  $3 \times 10^5$ 개 내지  $2 \times 10^5$ 개의 세포/mL의 식종밀도로 계대배양한다. 세포를 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 및 120 rpm의 멀티트론 HT 항온배양기(Infors)로 진탕 플라스크에서 성장시킨다. 유가식 실험시, 항생제 또는 MTX가 없는 BI-소유 생산배지를 함유한 진탕 플라스크에 세포를  $3 \times 10^5$ 개 세포/mL로 식종한다. 배양액을 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 120 rpm으로 교반시키며, 이후 세포 수가 증가함에 따라 CO<sub>2</sub>는 2%로 감소한다. 세포계수, 생존력, pH, 글루코즈와 락토즈 농도를 포함한 배양 변수를 매일 결정하고 pH는 필요한 경우 카르보네이트를 사용하여 pH 7.0으로 조절한다. BI-소유 유가용액을 24시간 마다 첨가한다. 상청액으로부터 시간별로 시료를 채취하여 ELISA에 의해 Fab 생성물 농도를 결정한다. 10 내지 11일 후, 세포배양액을 원심분리하여 수집하고 정제실험실로 옮긴다.
- [0166] 크로마토그래피 및 여과에 의해 유가식 배양물의 상청액으로부터 Fab 분자를 정제한다. 일차 포획 단계로서 친화성 크로마토그래피(예를 들어, 단백질 G 또는 단백질 L)를 사용한다. 또는, 저 결합 친화성 및 용량의 경우 Fab는 분자의 pI를 사용하는 양이온 교환 크로마토그래피(CEX)로 포획한다. 숙주 세포 단백질 및 오염물(예를 들어, DNA 또는 바이러스)은 추가의 관련 정제 단계로 제거한다.
- [0167] 생성된 Fab 분자의 실제 및 생성물 품질은 전기영동법(예를 들어, SDS-PAGE)로 분석하며, 이 분석에서 Fab는 약 50 kDa의 주 밴드 한개로서 검출될 수 있다. Fab 생성물의 특성분석을 위한 추가의 검사는 질량분석, 등전점 전기영동 및 크기별배제 크로마토그래피를 포함한다. 결합 활성은 BIAcore 분석에 의해 실시된다.
- [0168] 세포 배양물의 상청액중 Fab 또는 전장(full-length) IgG 분자의 정량은 샌드위치 효소결합면역흡착검사(ELISA)에 의해 수행한다. 전장 IgG는 사람-Fc 단편에 대해 상승한 항체(제조사: Jackson Immuno Research Laboratories) 및 사람 카파 경쇄(피옥시다제-결합된 것, 제조사: Sigma)를 사용하여 검출할 수 있다. Fab 단편은 염소 다클론 항-사람 IgG(H 및 L, Novus)에 의해 고정되고 사람 IgG에 대해 상승한 양 다클론 항체(피옥시다제-결합된 것, The Binding Site)에 의해 검출된다.
- [0169] 또한, Fab 분자는 전장 항체 분자로부터 효소 절단에 의해 생성할 수 있다. 이 방법의 장점은 강력하고 효율적인 발효 및 정제를 위한 고정적인 방법이 적용가능하다는데 있으며 이러한 방법은 목적하는 생성물을 품질을 유지하면서 대량 및 고수율로 제공하는 것이 용이하다. 정제를 위해 제조함 단백질 A 수지를 사용한 친화성 크로마토그래피를 일차 포획 단계로 사용할 수 있으며 그 결과 고 순도로 보통 획득된다.
- [0170] 이러한 목적을 위해 Fab 서열을 암호화하는 중쇄가 사람 IgG 항체 분자의 Fc-영역에 융합된다. 이어서 생성된 발현 작제물로 무혈청 배지 현탁액에서 성장하는 CHO-DG44 세포를 리포펙션에 의해 형질감염시킨다. 48시간 후, 세포를 200 µg/mL의 항생제 G418이 함유되고 하이포크산틴과 티미딘이 없는 배지에서 선별하여 안정하게 형질감염된 세포 군체를 생성한다. 그런 후, 안정한 형질감염체를 배양 배지에 메토티렉세이트(MTX)를 농도를 높이면서(100 또는 400 nM 까지) 첨가함으로써 유전자 증폭시킨다. 일단 세포들이 적응하면 10 내지 11일에 걸쳐 유가발효시켜 IgG 단백질 물질을 생성한다. 제조함 단백질 A-친화성 크로마토그래피를 사용하여 배양 상청액으로부터 IgG 단백질을 정제한다. 그런 다음 목적하는 중화 Fab 단편을 수득하기 위해 전장 IgG를 파파인의 존재 하에 항온배양하며, 그 결과 힌지 영역내에서 IgG를 절단시켜 두개의 Fab 단편과 Fc-모이어티가 형성된다. 서열번호 41의 Fd 쇄를 포함한 Fab 분자는 전장 IgG 단백질의 파파인 분해에 의해 수득된 Fab 분자의 실체이다.
- [0171] Fab 분자는 친화성 크로마토그래피(예를 들어, 단백질 G 또는 단백질 L)에 의해 분리한다. 또는, 저 결합 친화성 및 용량의 경우 Fab는 분자의 pI를 사용하는 양이온 교환 크로마토그래피(CEX)로 포획한다. 숙주 세포 단백질 및 오염물(예를 들어, DNA 또는 바이러스)은 추가의 오르소고날(orthogonal) 정제 단계로 제거한다.
- [0172] 본 발명의 또 다른 관점으로서, 항체 분자는 본원에 기술된 항체 분자의 아미노산 서열 변이체이다.
- [0173] 항체의 아미노산 서열 변이체는 적절한 뉴클레오타이드 변화를 항체 DNA내로 도입함으로써 또는 펩타이드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변이는 예를 들어 본원에 예시된 항체의 아미노산 서열내의 잔기로부터 결실 및/또는 잔기내로 삽입 및/또는 잔기의 치환을 포함한다. 최종 작제물이 목적하는 특징을 보유하는 한, 최종 작제물의 완성을 위해 결실, 삽입 및 치환의 어떠한 조합도 가능하다. 또한, 아미노산 변화는 인간화 또는 변이 항체의 해독 후 과정에 변형을 일으킬 수 있으며, 예를 들어 당화 부위의 수 또는 위치에 변화가 발생된다.

[0174] 돌연변이유도를 위해 바람직한 위치가 되는 항체의 특정 잔기 또는 영역을 동정하기 위해 유용한 방법을 "알라닌 스캐닝 돌연변이유도"라고 하며 문헌(Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085(1989))에 기술되어 있다. 이에 따라, 표적 잔기들의 잔기 또는 그룹(예를 들어, arg, asp, his, lys 및 glu와 같이 전하를 띠는 잔기)이 동정되고 중성 또는 음전하 아미노산(전형적으로 알라닌)으로 치환되어 항원과 아미노산들의 상호작용에 영향을 미친다. 그런 다음, 치환 부위에, 또는 치환 부위에 대해 추가 변이 또는 다른 변이를 도입함으로써 치환에 대한 기능적 민감성을 증명하는 아미노산 위치들을 걸러낸다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 예정되는 한편, 돌연변이의 성질 자체는 예정될 필요가 없다. 예를 들어, 해당 부위의 돌연변이 성질을 분석하기 위해 알라닌 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유도를 표적 코돈 또는 영역에서 실행하고 발현된 항체 변이를 목적하는 활성에 대해 스크리닝한다.

[0175] 아미노산 서열 삽입은 1개 잔기에서 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩타이드까지의 길이의 범위이고, 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합뿐만 아니라 1개 또는 복수개의 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 에피토프 태그에 융합된 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 N- 또는 C-말단에 항체의 혈중 반감기를 감소시키는 효소 또는 폴리펩타이드의 융합을 포함한다.

[0176] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이들 변이체는 항체 분자의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 제거되고 이 자리에 상이한 잔기가 삽입된 것이다. 치환 돌연변이유도를 위해 가장 관심있는 부위는 초가변 영역을 포함하지만 FR 변이도 또한 고려된다. 보존 치환이 하기 표에 기술되어 있으며, 여기에 "바람직한 치환"이 제목으로 설정되어 있다. 만일 이러한 치환이 생물학적 활성에 변화를 일으키는 경우, 하기 표에 "예시적인 치환"으로 명명되어 있거나, 아미노산 부류와 관련하여 하기에 좀 더 기술되어 있는 보다 더 실질적인 변화를 도입하고 그 생성물을 스크리닝할 수 있다.

[0177]	고유 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
[0178]	Ala(A)	val; leu; ile	val
[0179]	Arg(R)	lys; gln; asn	lys
[0180]	Asn(N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
[0181]	Asp(D)	glu; asn	glu
[0182]	Cys(C)	ser; ala	ser
[0183]	Gln(Q)	asn; glu	asn
[0184]	Glu(E)	asp; gln	asp
[0185]	Gly(G)	ala	ala
[0186]	His(H)	arg; asn; gln; lys	arg
[0187]	Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
[0188]	Leu(L)	ile; norleucine; val; met; ala; phe	ile
[0189]	Lys(K)	arg; gln; asn	arg
[0190]	Met(M)	leu; phe; ile	leu
[0191]	Phe(F)	tyr; leu; val; ile; ala	tyr
[0192]	Pro(P)	ala	ala
[0193]	Ser(S)	thr	thr
[0194]	Thr(T)	ser	ser
[0195]	Trp(W)	tyr; phe	tyr
[0196]	Tyr(Y)	phe; trp; thr; ser	phe

[0197] Val(V) leu; ile; met; phe; ala; norleucine leu

[0198] 단백질 화학에서, 항체의 생물학적 특성이 (a) 치환 구역에서의 폴리펩타이드 골격의 구조(예를 들어, 시트 또는 나선 형태로서), (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피를 유지하는데 미치는 영향에서 상당히 상이한 치환을 선택함으로써 달성될 수 있다는 것은 일반적으로 수용되는 사실이다. 천연 잔기는 공통적인 측쇄 특성을 기초로 하여 몇 가지 그룹으로 나뉜다:

[0199] (1) 소수성: norleucine(노르류신), met, ala, val, leu, ile;

[0200] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

[0201] (3) 산성: asp, glu;

[0202] (4) 염기성: asn, gin, his, lys, arg;

[0203] (5) 쇠 배향에 영향을 주는 잔기: gly, pro; 및

[0204] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0205] 비보존 치환에는 이들 부류중 한 부류의 일원이 다른 부류의 일원으로 교체되는 것이 수반될 것이다.

[0206] 인간화 또는 변이 항체의 적절한 형태를 유지하는데 관련이 없는 어떠한 시스테인 잔기도 일반적으로 세린으로 치환되어 분자의 산화 안정성을 향상시키거나, 비정상적인 가교를 방지하거나 세포독성 또는 세포정지 화합물과의 특정 결합점을 제공할 수 있다. 반대로, 시스테인 결합(들)을 항체에 부가하여 항체의 안정성을 향상시킬 수 있으며, 특히 항체가 항체 단편(예를 들어, Fv 단편)인 경우 그러하다.

[0207] 치환 변이의 유형은 모 항체(parent antibody)(예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기의 치환을 포함한다. 일반적으로, 추가의 개발을 위해 선별된 변이체(들) 생성물은 이의 제조를 위해 사용된 모 항체와 비교하여 향상된 생물학적 성질을 가질 것이다. 이와 같은 치환 변이체를 제조하는 간편한 방법은 과거 디스플레이를 사용한 친화성 성숙이다. 간단히 설명하면, 몇 개의 추가변 영역 부위(예를 들어, 6 내지 7개 부위)를 돌연변이시켜 각 부위에서 모든 가능한 아미노산 치환을 생성한다. 이렇게 생성된 항체 변이체는 사상과아지 입자로부터 각 입자내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물과의 융합체로서 일가 형태로 디스플레이된다. 그런 후 과거-디스플레이된 변이체는 이들의 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화성)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 추가변 영역을 동정하기 위해, 알려진 스캐닝 돌연변이유도를 수행하여 항원 결합에 상당히 기여하는 추가변 영역 잔기를 동정할 수 있다. 다른 방법으로서 또는 추가적인 방법으로서, 항체와 사람 다비가트란사이의 접점을 동정하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 이와 같은 인접 잔기 및 이웃 잔기가 본원에 상술된 기술에 따른 치환의 후보가 된다. 일단 이러한 변이체가 형성된 경우, 변이체 패넬을 본원에 기술된 바와 같이 선별하고 추가의 개발을 위해 한 가지 이상의 관련 검사에서 우수한 특성을 갖는 항체를 스크리닝할 수 있다.

[0208] 항체의 아미노산 변이체의 또 다른 유형은 항체의 고유 당화 패턴을 변형시키는 것이다. "변형시킨다"는 것은 항체에서 발견되는 탄수화물 모이어티 하나 이상을 결실시키고/시키거나 항체에 존재하지 않는 당화 부위 하나 이상을 부가하는 것을 의미한다.

[0209] 일부 양태로서, 본 발명의 항체에 당화 부위를 부가하여 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 당화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된다. N-연결된다는 것은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 모이어티가 결합한다는 것을 가리킨다. 트리펩타이드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다)은 아스파라긴 측쇄에 탄수화물 모이어티가 효소적으로 결합하기 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩타이드에 이들 트리펩타이드 서열중 어느 하나의 존재는 잠재적인 당화 부위를 형성한다. O-연결된 당화는 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시리신도 사용될 수 있지만 가장 흔하게는 세린 또는 트레오닌과 같은 하이드록시아미노산에 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토즈 또는 크실로즈중 하나를 결합시키는 것을 가리킨다. 따라서, 해당 단백질(예를 들어, 항체)을 당화시키기 위해 단백질의 아미노산 서열을 상기된 트리펩타이드 서열 중 하나 이상을 함유하도록 가공한다(N-연결된 당화 부위의 경우). 또한, 변형은 고유 항체의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 치환에 의해 이루어질 수 있다(O-연결된 당화 부위의 경우).

[0210] 항체의 아미노산 서열 변이체를 암호화하는 핵산 분자는 본 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이들

방법은 이로써 한정하는 것은 아니지만 천연 공급원으로부터 분리(천연 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 본원에 기술된 항체 분자의 기계조된 변이체 또는 비변이체의 올리고뉴클레오타이드-매개된(또는 부위-지정된) 돌연변이유도에 의한 제조, PCR 돌연변이유도 및 카세트 돌연변이유도를 포함한다. 상기된 바와 같이, 본 발명에 따른 항체 분자의 항원은 항응고제이다. 항원은 동물의 면역화에 의해 또는 파아지 디스플레이 방법에서와 같이 서열 라이브러리로부터 항체 서열을 선별함으로써 항체 분자를 생성하는데 사용된다.

- [0211] 동물의 면역화 프로토콜은 본 분야에 잘 알려져 있다. 적절한 면역 반응을 달성하기 위해, 항원을 인산알루미늄, 수산화알루미늄, 스쿠알렌 또는 프로인트 완전/불완전 보조제와 같은 보조제와 배합하는 것이 필요할 수 있다. 본 발명과 관련한 항원들은 다비가트란과 같이 대체로 비슷하게 작은 유기 분자이며 동물에 투여했을 때 때때로 항체 형성을 자극하지 않는다. 따라서, 합텐으로서 거대분자에 항원을 결합시키는 것이 필요할 수 있다.
- [0212] 추가의 관점에서, 본 발명은 의약에 사용하기 위한 상기 항체 분자에 관한 것이다.
- [0213] 추가의 관점에서, 본 발명은 상기 기재된 항체 분자와 약제학적 담체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0214] 치료요법에 사용하기 위해 항체 분자는 동물 또는 사람에게 용이한 투여를 위해 적절한 약제학적 조성물내로 포함된다. 항체 분자의 전형적인 제형은 항체 분자를 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 동결 건조제 또는 다른 건조제 또는 수용액 또는 수성 또는 비수성 현탁액의 형태로 혼합하여 제조할 수 있다. 담체, 부형제, 개질제 또는 안정화제는 사용된 용량 및 농도에서 무독성을 나타낸다. 이들은 인산염, 시트레이트, 아세테이트 및 기타 무기 또는 유기 산 및 염과 같은 완충시스템; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 옥사데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드와 같은 보존제; 헥사메트늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레소시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 당당류, 이당류, 올리고당류 또는 다당류 및 기타 탄수화물(글루코즈, 만노즈, 수크로즈, 트레할로즈, 텍스트린 또는 텍스트란을 포함); EDTA와 같은 킬레이트화제; 만니톨 또는 솔비톨과 같은 당 알코올; 나트륨과 같은 염-형성 반대이온; 금속 착화합물(예를 들어, Zn-단백질 착화합물); 및/또는 TWEEN™ 폴리솔베이트), PLURONICS™ 또는 지방산 에스테르, 지방산 에테르 또는 당 에스테르와 같은 이온성 및/또는 비이온성 계면활성제를 포함한다. 또한 에탄올 또는 이소프로판올과 같은 유기 용매가 항체 제형에 함유될 수 있다. 또한, 부형제는 또한 방출-변화 기능 또는 흡수-변화 기능을 가질 수 있다.
- [0215] 한 가지 관점에서, 약제학적 조성물은 항체 분자를 완충수용액중에 10 내지 20 mg/ml의 농도로 포함하거나 이와 같은 용액으로부터 제조된 동결건조체이다.
- [0216] 바람직한 투여 방식은 비경구, 주입 또는 주사(정맥내, 근육내, 피하, 복강내, 피내)이지만, 흡인, 경피, 비내, 구강, 경구과 같은 다른 투여 방식도 이용될 수 있다.
- [0217] 추가의 관점에서, 본 발명은 항응고제 치료요법의 부작용, 특히 출혈의 치료요법 또는 예방에 사용하기 위한 상기 항체 분자에 관한 것이다.
- [0218] 추가의 관점에서, 본 발명은 항응고제, 특히 다비가트란 또는 다비가트란 엑세틸레이트의 과다복용을 방지하는데 사용하기 위한 상기 기재된 항체 분자에 관한 것이다.
- [0219] 추가의 관점에서, 본 발명은 항응고제, 특히 다비가트란 또는 다비가트란 엑세틸레이트의 해독제로서 사용하기 위한 상기 기재된 항체 분자에 관한 것이다.
- [0220] 추가의 관점에서, 본 발명은 상기된 항체 분자의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하여, 항응고제 치료요법의 부작용을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0221] 추가의 관점에서, 본 발명은 상기된 항체 분자의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하여, 항응고제 치료요법에서의 과다복용을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0222] 투여될 항체의 "치료학적 유효량"은 항응고제 치료요법의 부작용을 예방, 완화 또는 치료하는데 필요한 최소량, 특히 출혈을 방지하는데 효과적인 최소량이다. 이것은 항체 분자의 화학양론적 양으로 달성될 수 있다.
- [0223] 예를 들면, 다비가트란은 권장 용량으로 투여된 경우 혈중 농도가 200 nM에 도달할 수 있다. 약 50 kD의 분자

량을 갖는 일가 항체 분자를 사용한 경우 예를 들어 단회(bolus) 정맥내 투여하면 약 1 mg/kg의 용량으로 중화를 달성할 수 있다. 다른 양태로서, 사람 환자에게 적용되는 Fab 분자의 용량은 투여당 50 내지 1000 mg일 수 있으며, 예로는 100, 200, 500, 750 또는 1000 mg이다. 처한 상황에 따라, 예를 들어 다비가트란을 환자에게 과다복용시킨 경우 투여당 훨씬 더 높은 용량(예를 들어, 1250, 1500, 1750 또는 2000 mg을 투여하는 것이 적절할 수 있다. 적절한 용량은 투여된 항응고제의 유형 및 용량, 투여 후 경과 시간, 항원 분자의 성질, 환자의 상태 및 기타 요인에 따라 상이할 수 있다. 본 분야의 전문가는 치료학적으로 효과적이면서 안전한 용량을 정하는 방법을 알고 있다.

[0224] 추가의 관점에서, 본 발명은 다비가트란 및/또는 다비가트란 에텍실레이트에 대해 결합 친화성을 갖는 항체 분자에 관한 것이다. 바람직하게는, 항체 분자는 다비가트란 및/또는 다비가트란 에텍실레이트와 예를 들어 표면 플라즈몬 공명 분석[참조:Malmqvist M., "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics.", *Curr Opin Immunol.* 1993 Apr;5(2):282-6] 또는 역학 배제 검사(KinExA) 기술[참조:Darling, R.J., and Brault P-A., "Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions." *ASSAY and Drug Development Technologies.* 2004, Dec 2(6): 647-657]에 의해 결정된 친화성으로 결합하며,  $K_D$  값의 범위는 0.1 pM 내지 100  $\mu$ M, 바람직하게는 1 pM 내지 100  $\mu$ M, 더 바람직하게는 1 pM 내지 1  $\mu$ M이다.

[0225] 또한, 본 발명의 항체 분자는 예를 들어 혈장, 혈청 또는 다른 체액과 같은 시료중의 항원 농도를 측정하는 분석 및 진단 방법에 사용할 수 있다. 예를 들면, 항원 분자는 실시예에 사용된 것과 같이 효소결합면역흡착검사(ELISA)에 사용할 수 있다. 따라서, 추가의 관점에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체 분자를 포함한 분석 및 진단 키트에 관한 것이며, 또한 개개의 분석 및 진단 방법에 관한 것이다.

[0226] 추가의 관점에서, 본 발명은 항체 분자를 제조하는 방법에 관한 것이며, 이는

[0227] (a) 발현 조절 서열과 기능적으로 결합되어 있는 상기된 항체 분자를 암호화하는 핵산 하나 이상을 포함하는 숙주 세포를 제공하고,

[0228] (b) 상기 숙주 세포를 배양하며,

[0229] (c) 세포 배양물로부터 상기 항체 분자를 회수함을 포함한다.

[0230] 또한, 본 발명은 경구용 항응고제, 특히 직접 트롬빈 억제제의 중화에 유용한 물질을 함유하는 제품 및 키트를 제공한다. 제품은 라벨과 함께 용기를 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알 및 시험관을 포함한다. 용기는 유리, 금속, 플라스틱 또는 이들의 조합과 같은 다양한 재료로 형성될 수 있다. 용기는 본원에 기술된 항체 또는 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 약제학적 조성물을 보유한다. 약제학적 조성물중의 활성 물질은 특정 항체 또는 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염이다. 항체의 용기상의 라벨은 약제학적 조성물이 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 생체내에서 중화 또는 부분 중화시키는데 사용된다는 것을 가리킨다.

[0231] 본 발명의 키트는 상기된 용기중 하나 이상을 포함한다. 또한, 본 발명의 키트는 다른 완충액, 희석제, 필터, 주사침, 주사기 및 사용지침서를 포함하는 판매자와 이용자 관점에서 필요한 기타 재료를 포함한다.

[0232] 본 발명의 한 가지 양태로서, 키트는 본원에 기술된 항체중에서 임의의 항체 또는 이의 약제학적 조성물을 포함한다. 예를 들어, 키트는 (1) 본원에 기술된 항체중 임의의 하나 또는 이의 약제학적 조성물, (2) 용기 및 (3) 라벨을 포함할 수 있다.

[0233] 다른 양태로서, 키트는 본원에 기술된 항체중에서 임의의 항체 또는 이의 약제학적 조성물 및 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다. 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염의 형태는 고체, 액체 또는 겔의 형태일 수 있다. 바람직한 양태로서, 다비가트란 에텍실레이트의 약제학적으로 허용되는 염은 메실레이트 염이다. 또 다른 바람직한 양태로서, 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염의 용량 단위 당 함량이 일일 1회(QD) 또는 일일 2회(BID)로 약 50 mg 내지 약 400 mg, 약 75 mg 내지 약 300 mg, 약 75 mg 내지 150 mg 또는 약 110 mg 내지 약 150 mg이다. 예를 들어, 키트는 (1) 본원에 기술된 항체중 임의의 하나 또는 이의 약제학적 조성물, (2) 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염의 약제학적 조성물, (3) 용

기 및 (4) 라벨을 포함할 수 있다.

[0234] 또 다른 양태로서, 키트는 (1) 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 제1 약제학적 조성물, (2) 상기된 항체 또는 이의 배합물중 임의의 하나를 포함하는 제2 약제학적 조성물, (3) 환자에게 상기 제1 및 제2 약제학적 조성물을 별도로 투여하기 위한 지침서를 포함하고, 상기 제1 및 제2 약제학적 조성물은 별도의 용기에 함유되며, 상기 제2 약제학적 조성물은 다비가트란 또는 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로나이드의 중화 또는 부분 중화를 필요로 하는 환자에게 투여된다. 또한, 본 발명은 본원에 기술된 항체, 이의 배합물 또는 이의 약제학적 조성물중 어느 하나를 투여함을 포함하여, 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로 치료를 받고 있는 환자에서 다비가트란 또는 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로나이드를 중화 또는 부분 중화시키는 진단 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 (a) 환자가 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염으로 치료를 받았었는 지와 환자가 복용한 양을 확인하고; (b) 다비가트란 또는 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로나이드가 응혈 또는 응고 시험 또는 검사 결과의 정밀 판독을 방해할 수 있는 응혈 또는 응고 시험 또는 검사를 수행하기 이전에 다비가트란 또는 1-0-아실글루쿠로나이드를 본원에 기술된 항체 또는 이의 배합물중 어느 하나로 중화시키며; (c) 상기 환자로부터 채취한 시료에 대해 응혈 또는 응고 시험 또는 검사를 수행하여 다비가트란 또는 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로나이드가 존재하지 않는 응혈의 형성 수준을 결정하고; (d) 환자의 응혈 형성과 분해사이에 적절한 균형을 달성하기 위해, 환자에게 투여된 다비가트란, 다비가트란 에텍실레이트, 다비가트란의 프로드러그 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염의 양을 조정하는 단계를 포함하는, 환자에게 다비가트란 또는 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로나이드를 중화 또는 부분 중화시키는 방법을 제공한다. 항체 대 다비가트란 또는 다비가트란의 1-0-아실글루쿠로나이드의 몰비는 0.1 내지 100, 바람직하게는 0.1 내지 10의 몰비이다. 시험 또는 검사 결과의 정밀한 판독은 피브리노겐 수준, 활성화된 단백질 C 내성 또는 관련된 시험들의 정밀한 판독일 수 있다.

[0235] 실시예

[0236] I. 다클론 항-다비가트란 항체의 제조

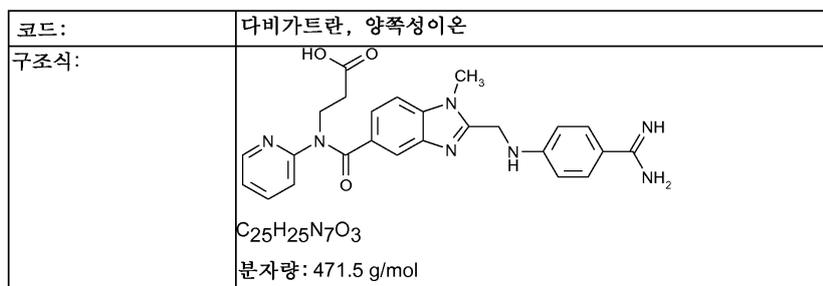
[0237] 다클론 항-다비가트란 항체의 제조를 위해, 2개의 상이한 합텐 및 합텐과 담체 단백질(BSA)의 상이한 투입 몰비로 3개의 상이한 면역원을 제조하였다.

[0238] 스크리닝을 위해 서양고추냉이-퍼옥시다제(HRP) 효소-결합체를 제조하고 효소-면역흡착 검사(ELISA)를 실시하였다.

[0239] 다클론 항체의 추가 정제는 단백질 A 세파로즈 FF에서 친화성 크로마토그래피로 수행하였다.

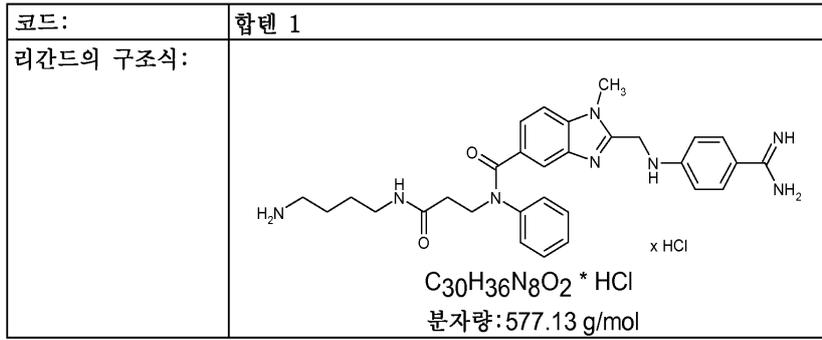
[0240] 1. 물질 및 방법

[0241] 시험 화합물(다비가트란)

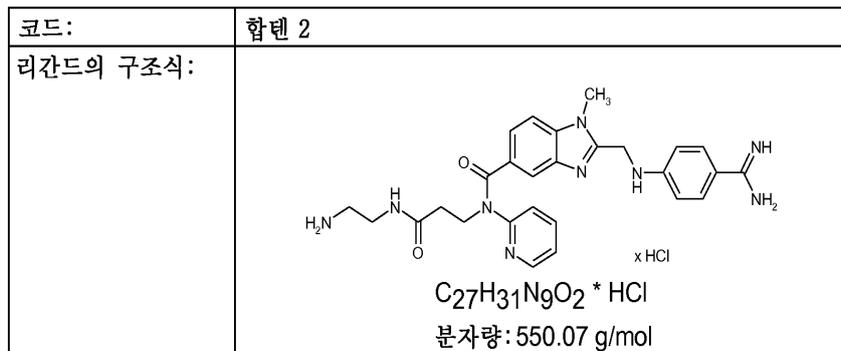


[0242]

[0243] 1.1 번역원 및 추적자의 합성을 위해 사용된 합텐



[0244]



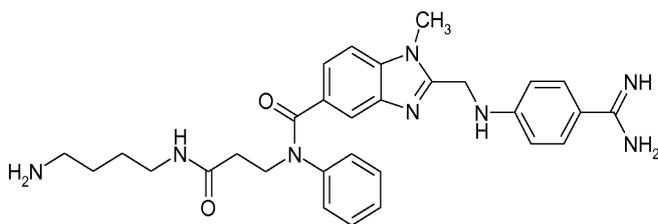
[0245]

[0246] 1.2 합텐의 합성

[0247] 합텐 1 및 합텐 2는 다음과 같이 합성하였다:

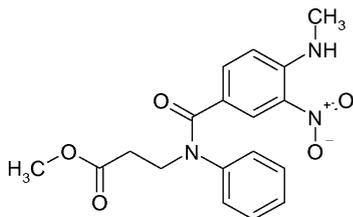
[0248] 합텐 1

[0249] 2-[(4-카르바미도일-페닐아미노)-메틸]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-5-카르복실산 [2-(4-아미노-부틸카르바모일)-에틸]-페닐-아미드



[0250]

[0251] 1a 3-[(4-메틸아미노-3-니트로-벤조일)-페닐-아미노]-프로피온산 메틸 에스테르



[0252]

[0253] 무수 테트라하이드로푸란(THF) 80 mL 중의 4-메틸아미노-3-니트로-벤조산 클로라이드(23.3 mmol)과 3-페닐아미노-프로피온산 메틸 에스테르(23.3 mmol)의 용액에 트리에틸아민(50.2 mmol)을 실온에서 교반시키면서 적가하였다. 3시간 후 반응 혼합물을 증발 건조시키고 잔여 고체를 물로 분쇄한 다음, 고체 생성물을 여과를 통해 분리

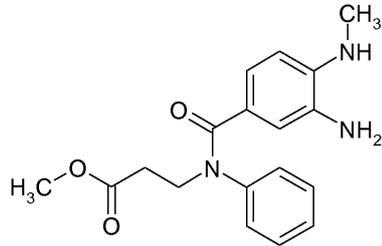
하였다.

[0254] 수율: 99%

[0255]  $C_{18}H_{19}N_3O_5(357.36)$

[0256] TLC(실리카 겔; 디클로로메탄/에탄올 19:1):  $R_f = 0.48$ .

[0257] 1b 3-[(3-아미노-메틸아미노-벤조일)-페닐-아미노]-프로피온산 메틸 에스테르



[0258]

[0259] 실온하에 촉매로서 Pd(복탄상 10%)를 사용하고 에탄올중에서 수소화하여 생성물 1a의 니트로 그룹을 환원시켰다.

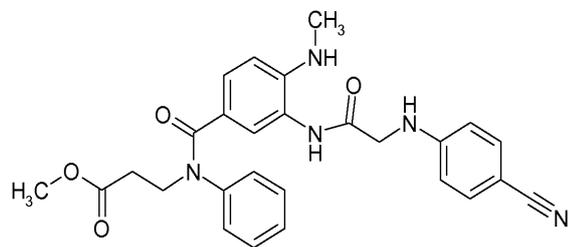
[0260] 수율: 99%

[0261]  $C_{18}H_{21}N_3O_3(327.38)$

[0262] TLC(실리카 겔; 디클로로메탄/에탄올 9:1):  $R_f = 0.23$ .

[0263] 질량 스펙트럼(ESI):  $[M+H]^+ = 328$ .

[0264] 1c 3-({3-[2-(4-시아노-페닐아미노)-아세틸아미노]-4-메틸아미노-벤조일}-페닐-아미노)-프로피온산 메틸 에스테르



[0265]

[0266] 1b 생성물(23.2 mmol)과 N-(4-시아노-페닐)-글리신(23.2 mmol)을 실온하에 무수 THF중에서 CDI(23.2 mmol)와 결합시켰다. 반응이 종료된 후 혼합물을 증발 건조시키고 조약한(crude) 생성물을 추가로 정제하지 않고서 사용하였다.

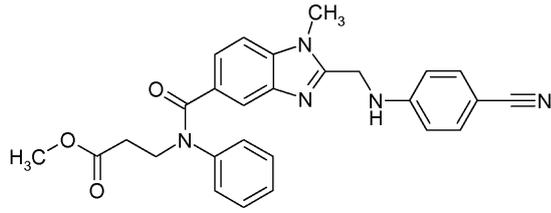
[0267] 수율: 97%

[0268]  $C_{27}H_{27}N_5O_4(484.54)$

[0269] 질량 스펙트럼(ESI):  $[M+H]^+ = 486$ .

[0270] 1d 3-({2-[(4-시아노-페닐아미노)-메틸]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-5-카르보닐}-페닐-아미노)-프로피온산 메틸 에

스테르



[0271]

[0272] 진한 아세트산 100 mL 중의 1c 생성물(22.6 mmol)의 용액을 1시간 동안 환류 가열하였다. 이어서, 용액을 증발 건조시키고 잔여 고체를 물로 분쇄한 다음, 교반하에 pH를 약 8 내지 9로 조정하였다. 조약한 생성물을 에틸 아세테이트로 추출하여 분리하고 실리카 겔(용출제: 디클로로메탄/에탄올 1:1)로 크로마토그래피하여 정제하였다.

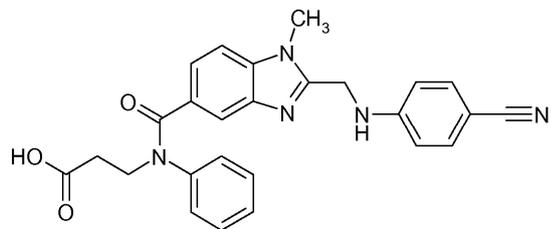
[0273] 수율: 58%

[0274]  $C_{27}H_{25}N_5O_3(467.52)$

[0275] TLC(실리카 겔; 디클로로메탄/에탄올 9:1):  $R_f = 0.71$

[0276] 질량 스펙트럼(ESI):  $[M+H]^+ = 468$ .

[0277] 1e 3-({2-[(4-시아노-페닐아미노)-메틸]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-5-카르보닐}-페닐-아미노)-프로피온산



[0278]

[0279] 메탄올 100 mL 중의 1d 생성물(13.0 mmol)의 용액에 수산화나트륨(20.0 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 40°C에서 2.5시간 동안 교반시킨 다음 증발 건조시켰다. 잔여 고체를 물 100 mL와 함께 교반하고 진한 아세트산으로 pH를 약 6으로 조정하였다. 침전된 생성물을 여과로 분리하고, 물로 세척한 다음, 60°C로 건조시켰다.

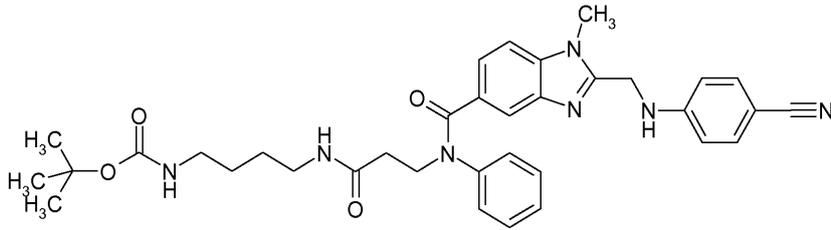
[0280] 수율: 88%

[0281]  $C_{26}H_{23}N_5O_3(453.49)$

[0282] TLC(실리카 겔; 디클로로메탄/에탄올 9:1):  $R_f = 0.33$

[0283] 질량 스펙트럼(ESI):  $[M+H]^+ = 454$ .

[0284] 1f {4-[3-({2-[(4-시아노-페닐아미노)-메틸]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-5-카르보닐}-페닐-아미노)-프로피오닐아미노]-부틸}-카르바산 3급-부틸 에스테르



[0285]

[0286]

DMF 20 mL 중의 1e 생성물(5.23 mmol), 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트(TBTU, 5.23 mmol) 및 N-메틸-모르폴린(5.23 mmol)의 용액을 실온에서 30분 동안 교반시켰다. 이어서, (4-아미노부틸)-카르복산 3급-부틸 에스테르(5.23 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 추가로 24시간 동안 실온에서 교반시켰다. 계속해서, 혼합물을 물(100 mL)로 희석하고 생성물을 에틸 아세테이트로 추출하여 분리하였다.

[0287]

수율:92%

[0288]

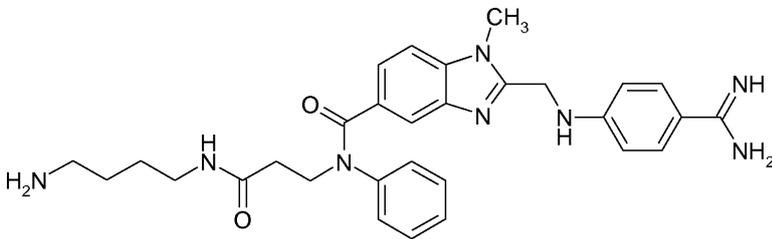
C<sub>35</sub>H<sub>41</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>(623.75)

[0289]

TLC(실리카 겔; 디클로로메탄/에탄올 9:1): R<sub>f</sub> = 0.51

[0290]

1g 2-[(4-카르바미도일-페닐아미노)-메틸]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-5-카르복실산 [2-(4-아미노-부틸카르바모일)-에틸]-페닐-아미드



[0291]

[0292]

1f 생성물(4.81 mmol)을 에탄올(250 mL)중의 HCl의 포화용액중에 용해시키고, 혼합물을 실온에서 밤새 교반시킨 다음, 30℃에서 증발 건조시켰다. 잔여 조 물질을 무수 에탄올 200 mL 중에 용해시킨 다음, 탄산암모늄(48.1 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반시켰다. 용매를 증발시킨 후, 잔여 조 물질을 약 5 mL의 에탄올로 분쇄하고, 미용해 물질을 여과하여 분리한 다음, 용매를 30℃에서 증발시켰다. 이어서, 생성물을 30 mL의 물에 용해시키고, 용액을 약 2 g 목탄과 함께 교반한 다음, 여과하고 증발 건조시켰다.

[0293]

수율: 90%

[0294]

C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>(540.67)

[0295]

TLC(역상 RP-8; 메탄올/5% 수성 NaCl 용액 9:1): R<sub>f</sub> = 0.79

[0296]

질량 스펙트럼(ESI): [M+H]<sup>+</sup> = 541

[0297]

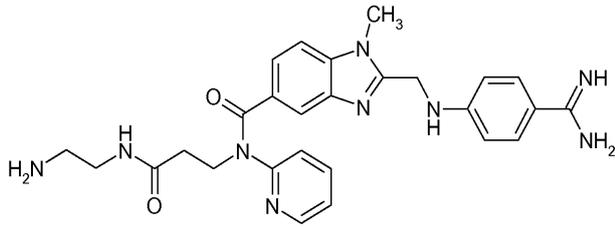
[M+Cl]<sup>-</sup> = 575/7.

[0298]

합텐 2

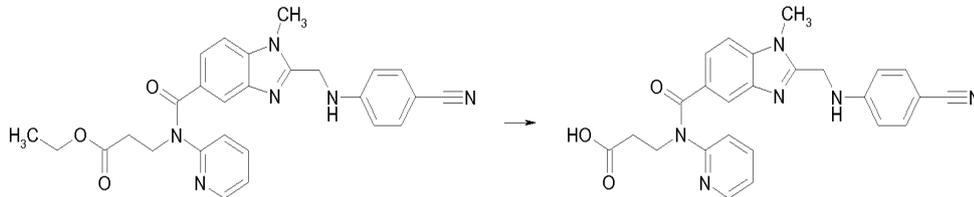
[0299]

2-[(4-카르바미도일-페닐아미노)-메틸]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-5-카르복실산 [2-(2-아미노-에틸카르바모일)-에틸]-피리딘-2-일-아미드



[0300]

[0301] 2a 3-((2-[(4-시아노-페닐아미노)-메틸]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-5-카르보닐)-피리딘-2-일-아미노)-프로피온산



[0302]

[0303] 에탄올 500mL와 물 50mL중의 수산화나트륨(50.0 mmol)의 용액에 3-((2-[(4-시아노-페닐아미노)-메틸]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-5-카르보닐)-피리딘-2-일-아미노)-프로피온산 에틸 에스테르(41.4 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반시킨 다음, 에탄올 약 350mL를 증류시키고, 물 약 100mL를 첨가한 다음 pH를 6으로 조정하였다. 이어서, 디에틸에테르(50 mL)를 첨가하고 혼합물을 밤새 교반시켰다. 생성물을 여과하여 분리하고 추가로 정제하지 않고서 사용하였다.

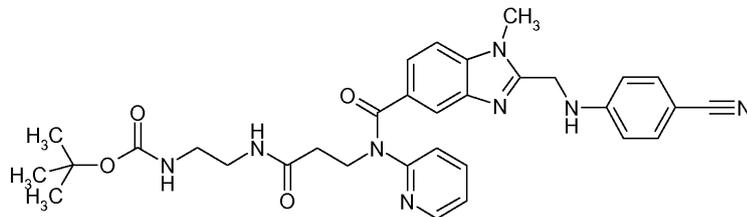
[0304]

수율: 78%

[0305]

C<sub>25</sub>N<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>(454.48).

[0306] 2b {2-[3-((2-[(4-시아노-페닐아미노)-메틸]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-5-카르보닐)-피리딘-2-일-아미노)-프로피오닐아미노]-에틸}-카르바산 3급-부틸 에스테르



[0307]

[0308] 무수 테트라하이드로푸란(100 mL)중의 2a 생성물(2.20 mmol), 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트(TBTU, 2.20 mmol) 및 N-메틸-모르폴린(2.20 mmol)의 용액을 실온에서 15분간 동안 교반시켰다. 이어서, (2-아미노-에틸)-카르바산 3급-부틸 에스테르(2.20 mmol)을 첨가하고 혼합물을 추가로 24 시간 동안 실온에서 교반시켰다. 계속해서, 혼합물을 물 40mL로 희석하고, 생성물을 에틸 아세테이트로 추출하여 분리하고 크로마토그래피로 정제하였다(실리카 겔; 디클로로메탄/메탄올 15:1).

[0309]

수율: 61%

[0310]

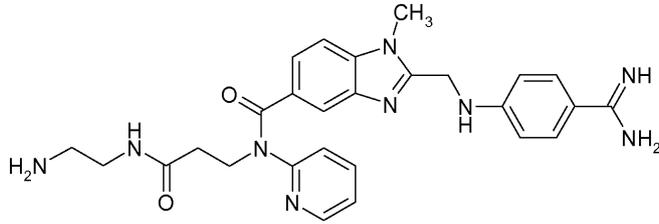
C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>N<sub>8</sub>O<sub>4</sub>(596.68)

[0311]

질량 스펙트럼(ESI): [M+H]<sup>+</sup> = 597

[0312]  $[M+H]^{-} = 595$

[0313] 2c 2-[(4-카르바미도일-페닐아미노)-메틸]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-5-카르복실산 [2-(2-아미노-에틸카르바모일)-에틸]-피리딘-2-일-아미드



[0314]

[0315] 2b 생성물(1.34 mmol)을 무수 에탄올(30 mL)중의 HCl 포화용액에 첨가하였다. 용액을 실온에서 5시간 동안 교반시킨 다음, 30°C에서 증발 건조시켰다. 에탄올(30 mL) 및 탄산암모늄(13.0 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반시켰다. 계속해서, 용매를 증발시키고, 잔여 물질을 약 4 mL의 디클로로메탄/메탄올(30:1) 혼합물로 5회 분쇄시킨 다음, 여과하고 증발시켜 생성물을 무기염으로부터 분리하였다.

[0316] 수율: 27%

[0317]  $C_{27}H_{31}N_9O_2$ (513.61)

[0318] 질량 스펙트럼(ESI):  $[M+C1]^{-} = 548/50$

[0319]  $[M+HC1+C1]^{-} = 584/6$

[0320]  $[M+H]^{+} = 514.$

[0321] 2. 화학물질

[0322] 2.1 시약 합성용 화학물질

명칭	명세	제조사	카탈로그 번호
1,4-벤조퀴논		Fluka	12309
소혈청알부민(BSA)		Serva	11920
1,1'-카르보닐-디-(1,2,4-트리아졸)		Fluka	21861
시트르산	분석용 등급	Riedel-De Haën	33114
N,N-디메틸포름아미드(DMF)	합성용	Merck	822275
에탄올	분석용 등급	Baker	8006
프로인트 보조제(CFA)	완전	Sigma	F-5881
프로인트 보조제(IFA)	불완전	Sigma	F-5506
글리세린	순수	Merck	104093
서양고추냉이 펄옥시다제 HRP	25000 U / 100 mg	Boehringer Mannheim	108090
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	분석용 등급	Riedel-De Haën	30743
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	분석용 등급	Merck	4873
NaHCO <sub>3</sub>	분석용 등급	Merck	106329
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	분석용 등급	Merck	106392
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	분석용 등급	Merck	101217
o-페닐렌 디아민	30 mg 정제	Sigma	P8412
과붕산나트륨	순수	Riedel-De Haën	11621
티몰	순수	Merck	8167

[0323]

[0324] 2.2 ELISA용 화학물질

명칭	명세	제조사	카탈로그 번호
시트르산	분석용 등급	Riedel-De Haën	33114
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	분석용 등급	Riedel-De Haën	30743
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	분석용 등급	Merck	4873
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	분석용 등급	Merck	6580
NaCl	분석용 등급	Merck	6404
NaOH	분석용 등급	Merck	6498
o-페닐렌 디아민	30 mg 정제	Sigma	P8412
과붕산나트륨	순수	Riedel-De Haën	11621
트윈 20	순수	Serva	37470

[0325]

[0326] 2.3 ELISA용 완충액

명칭	성분	용도
완충액 1	0.05 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.15 M NaCl, pH=7.4 안정성: 약 +4°C에서 4주	피복
완충액 2	5 g/l BSA가 첨가된 완충액 1 안정성: 약 +4°C에서 10일	검사 완충액
완충액 3	5 g/l BSA와 0.1 g/L 티메로살이 첨가된 완충액 1 안정성: 약 +4°C에서 4주	마이크로평판 차단: 저장
완충액 4	NaOH로 pH 5.0으로 조정된 0.1 M 시트르산 6.5 mmol/L 과붕산나트륨 안정성: 시트르산: 약 +4°C에서 6개월 과붕산염: 약 +4°C에서 10일	o-페닐렌 디아민을 위한 기질 완충액
세척액	물, 0.5 g/L 트윈20 안정성: 주변온도에서 10일	마이크로평판 세척
정지시약	2.25 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 안정성: 주변온도에서 5년	o-페닐렌 디아민 발색 정지

[0327]

[0328] Elgastat Maxima-HPLC 초순수 물 처리시스템으로부터 회수한 물을 완충 용액을 제조하는데 사용하였다.

[0329] 3. 면역원의 합성

[0330] 토끼의 면역계를 자극하여 다비가트란에 대한 다클론 항체를 제조하기 위해 결합 시약으로서 1,4-벤조퀴논 또는 1,1'-카르보닐-디-(1,2,4-트리아졸)을 사용하여 담체 단백질 소혈청 알부민(BSA)에 합텐 1 및 합텐 2에 결합시켜 세 가지 면역원(로트 번호 GL256, GL258 및 GL262)을 합성하였다.

[0331] GL256의 합성을 위해 1,4-벤조퀴논을 2개의 반응 부위를 갖는 단독이기능성 화합물로서 사용하였다. 이것은 먼저 산성 pH에서 두 부위중 하나에만 있는 아미노 그룹과 반응하고, 그런 다음 알칼리성 pH에서 최소 중합으로 다른 부위에서 반응한다. GL258 및 GL262는 결합 시약으로서 1,1'-카르보닐-디-(1,2,4-트리아졸)을 사용하고 합텐 대 담체 단백질의 유입 비율을 상이하게 하여 합성하였다.

[0332] 3.1 GL256의 합성

[0333] 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-완충액(pH = 4.5) 8.5mL중의 0.75 μMol BSA의 용액에 0.416 mMol 1,4-벤조퀴논(에탄올 1.5mL 중)을 첨가하고, 실온의 암실에서 1.5시간 동안 항온처리하였다. 그 후 용액을 0.15 M NaCl중에 평형된 세파텍스 G25 컬럼에 통과시켜 과량의 1,4-벤조퀴논을 제거하였다(최종 용량 12.5 mL).

[0334] (0.15 μMol)의 정제된 BSA-용액 2.5mL를 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-완충액 2mL (pH=8.5)중에 용해된 525 μMol 합텐 합텐 1의 용액에 교반하에 서서히 첨가하였다. BSA 용액의 첨가 동안에 pH를 약 8.0으로 조정하였다. 합텐과 담체 단백질의 유입 몰비는 3500:1이었다.

[0335] 밤새 실온에서 항온처리한 후 면역원을 1리터의 증류수에 대해 6회 투석하였다. 박층 크로마토그래피는 미결합된 합텐의 스팟이 합텐-담체 결합체에 남아있지 않음을 나타냈다.

[0336] 면역원을 분획(aliquot)들로 -20°C에서 동결 저장하였다. 면역원의 상청액에서 BSA가 합텐으로 치환된 정도는 302 nm에서 UV 흡광분석하여 측정된 결과 약 1:18이었다. 최종 용액중의 면역원의 함량은 0.75 mg GL256/mL이었다.

[0337] 3.2 GL258의 합성

[0338] N,N-디메틸포름아미드(DMF) 6.3mL 중의 158 μMol 합텐 2의 용액을 실온에서 제조하였다. 158 μMol 1,1'-카르보닐-디-(1,2,4-트리아졸)을 첨가하고 10°C에서 4시간 동안 먼저 항온처리한 후 30분간 실온에서 항온처리하였다. 박층 크로마토그래피로 화학반응을 점검하였고 약 20 내지 25%로 나타났다. 이어서, 0.75 μMol BSA를

0.13 M NaHCO<sub>3</sub> 2mL 중에 용해시키고 N,N-디메틸포름아미드(DMF) 1mL를 교반하에 적가하였다. pH를 약 8.3으로 조정하였다. 그런 후 합텐 용액(6.3 mL) 및 0.13 M NaHCO<sub>3</sub> 4 mL를 BSA 용액에 교반하에 적가하고 pH를 8.4로 조정하였다. 면역원 GL258을 위한 합텐과 담체 단백질의 유입 몰비는 210:1이었다.

[0339] 밤새 교반 조건하에 실온에서 항온처리한 후 면역원을 1리터의 증류수에 대해 6회 투석하였다. 박층 크로마토 그래피는 미결합된 합텐의 스팟이 합텐-담체 결합체에 남아있지 않음을 나타냈다.

[0340] 면역원을 분획들로 -20℃에서 동결 저장하였다. 면역원의 상청액에서 BSA가 합텐으로 치환된 정도는 302 nm에서 UV 흡광분석하여 측정된 결과 약 1:5였다. 최종 용액중의 면역원의 함량은 0.28 mg GL258/mL이었다.

[0341] 3.3 GL262의 합성

[0342] N,N-디메틸포름아미드(DMF) 8.75 mL 중의 225 μMol 합텐 2의 용액을 실온에서 제조하였다. 225 μMol 1,1'-카르보닐-디-(1,2,4-트리아졸)을 첨가하고 10℃에서 4시간 동안 항온처리하였다. 박층 크로마토그래피로 화학 반응을 점검하였고 약 20 내지 25%로 나타났다.

[0343] 이어서, 0.49 μMol BSA를 0.13 M NaHCO<sub>3</sub> 2 mL 중에 용해시키고 N,N-디메틸포름아미드(DMF) 1 mL를 교반하에 적가하였다. pH를 약 8.2로 조정하였다. 그런 후 합텐 용액(8.75 mL) 및 0.13 M NaHCO<sub>3</sub> 6 mL를 BSA 용액에 교반하에 적가하고 pH를 8.3으로 조정하였다. 면역원 GL262를 위한 합텐과 담체 단백질의 유입 몰비는 460:1이었다.

[0344] 밤새 교반 조건하에 실온에서 항온처리한 후 면역원을 1리터의 증류수에 대해 6회 투석하였다. 박층 크로마토 그래피는 미결합된 합텐의 스팟이 합텐-담체 결합체에 남아있지 않음을 나타냈다.

[0345] 면역원을 분획으로 -20℃에서 동결 저장하였다. 면역원의 상청액에서 BSA가 합텐으로 치환된 정도는 302 nm에서 UV 흡광분석하여 측정된 결과 약 1:32였다. 최종 용액중의 면역원의 함량은 0.71 mg GL262/mL이었다.

[0346] 4. 접합체의 합성

[0347] 4.1 GL261의 합성

[0348] N,N-디메틸포름아미드(DMF) 1.5 mL 중의 37.4 μMol 합텐 2의 용액을 실온에서 제조하였다. 37.5 μMol 1,1'-카르보닐-디-(1,2,4-트리아졸)을 첨가하고 10℃에서 4시간 동안 항온처리한 후 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 박층 크로마토그래피로 화학반응을 점검하였고 약 20 내지 25%로 나타났다.

[0349] 이어서, 1.125 μMol 효소 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)를 0.13 M NaHCO<sub>3</sub> 0.4 mL 중에 용해시키고 N,N-디메틸포름아미드(DMF) 0.267 mL를 교반하에 적가하였다. pH를 약 8.2로 조정하였다. 그런 후 합텐 용액(22.5 μMol) 0.9 mL 및 0.13 M NaHCO<sub>3</sub> 0.57 mL를 HRP 용액에 교반하에 적가하고 pH를 8.4로 조정하였다. HRP 결합체 GL261을 위한 합텐과 HRP의 유입 몰비는 20:1이었다.

[0350] 밤새 실온에서 교반 조건하에 항온처리한 후 겔 크로마토그래피에 의해 HRP 접합체를 유기 용매 및 과량의 합텐으로부터 분리하였다. 용액을 0.1 M 인산염 완충액 pH 7.0으로 평형화된 세파텍스 G25 컬럼에 통과시켰다.

[0351] 합텐-HRP 접합체(추적자, 5.64 mg/mL)의 최종 농도에 BSA를 섞어 약 10 mg/mL의 농도로 만들고, 동일한 용량의 글리세린을 섞어 동결을 방지하며, 티몰 결정을 섞어 세균 성장을 방지하였다. 추적자 용액을 로트 번호 GL261로 표기하고 분획들로 -20℃에서 저장하였다.

[0352] HRP가 합텐으로 치환된 정도는 302 nm에서 UV 흡광분석하여 측정된 결과 1:0.2였다.

[0353] 기질로서 o-페닐렌-디아민(OPD)을, 참조 물질로서 천연 HRP를 사용한 BSA-차단된 미세역가 평판에서 추적자의 특이적 활성을 측정하였다. 희석 HRP 표준물 또는 합텐-HRP 결합체와 기질 용액의 혼합물을 암실에서 30분 동안 항온처리하고, 황산으로 정지시킨 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 잔여 활성은 천연 HRP의 94%였고 글리세린중의 결합체 제형의 특이적 활성은 611 U/mL로 나타났다.

[0354] 추적자 명세의 요약:

유형:	합텐 2 - 서양고추냉이 퍼옥시다제 (로트번호 GL261)
단백질 함량:	5.64 mg/mL
특이적 활성:	108 U/mg 611 U/ml (기질 Guajacol 및 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 25°C)
저장:	약 -20°C에서
희석배수:	1:40000

[0355]

[0356] 5. 면역화 및 항체 생성

[0357] 5.1 토끼의 면역화

[0358] 생후 3개월된 12마리 암컷 친칠라 토끼를 0.9% NaCl 용액 0.5 mL 및 완전 프로인트 보조제(CFA) 0.5 mL중의 면역원 GL256, GL258 및 GL262 100 µg의 에멀전으로 면역화하였다. 다음 한 달 동안 수회 추가 면역화하였다. 3차 면역화를 위해 0.5 mL의 불완전 프로인트 보조제(IFA)를 사용하였다. 각 면역화는 4개 피하 부위 및 4개 근육내 부위에서 수행하였다.

[0359] A 군 - 면역원 GL256

[0360] 토끼 1 #50

[0361] 토끼 2 #51

[0362] 토끼 3 #52

[0363] 토끼 4 #53

[0364] B 군 - 면역원 GL258

[0365] 토끼 5 #54

[0366] 토끼 6 #55

[0367] 토끼 7 #56

[0368] 토끼 8 #57

[0369] C 군 - 면역원 GL262

[0370] 토끼 9 #46

[0371] 토끼 10 #47

[0372] 토끼 11 #48

[0373] 토끼 12 #49

[0374] 면역화 일정

[0375] 1일째 동물 당 CFA중의 100 µg 면역원/mL로 1차 면역화

[0376] 29일째 동물 당 CFA중의 100 µg 면역원/mL로 2차 면역화

[0377] 57일째 동물 당 IFA중의 100 µg 면역원/mL로 3차 면역화

[0378] 토끼 건강 상태는 면역원 GL256 및 GL258의 사용으로 악화될 수 있다. 토끼 7 #56은 치료하지 않았다.

[0379] 67일째 일차 출혈 발생(동물 당 2 mL)

- [0380] 81일째 동물 당 CFA중의 100  $\mu\text{g}$  면역원/mL로 4차 면역화
- [0381] 91일째 이차 출혈 발생(동물 당 25 mL)
- [0382] 112일째 동물 당 CFA중의 100  $\mu\text{g}$  면역원/mL로 5차 면역화
- [0383] 122일째 동물 번호를 지정하는데 오류가 일어났다.
- [0384] \_\_\_\_\_ 3차 최종 출혈 발생(방혈)\* \_\_\_\_\_

[0385] \* 토끼 1 내지 12는 5차 면역화 후 10일 경과하여 완전히 방혈되었다. 방혈은 자일라진(Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen, Germany) 및 케타민 하이드로클로라이드(Ketavet<sup>®</sup>, Parke-Davis, Freiburg, Germany)로 마취한 후 목동맥을 통해 수행하였다.

[0386] 5.2 토끼 혈청의 분석

[0387] 응고된 토끼 혈액을 원심분리하여 혈청을 제조하였다. 황산암모늄으로 침전시키고 세파텍스 G25 컬럼을 통해 탈염시켜 단백질 분획을 수득하였다.

[0388] 토끼 혈청으로부터 획득한 개개의 단백질 분획을 표준 ELISA 방법에 의해 항-다비가트란 역가에 대해 스크리닝 하였다.

[0389] 스크리닝-ELISA:

단계	과정
A	각 출혈에서 얻은 단백질 분획을 주변온도하에서 완충액 1종의 미세역가 평판상에 흡착시켰다(100 $\mu\text{L}$ /웰; 1, 2 또는 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). 마이크로평판을 매회 450 $\mu\text{L}$ 로 4회 세척한다. 250 $\mu\text{L}$ 완충액으로 적어도 1시간 동안 차단시킨다.
B	마이크로평판을 매회 450 $\mu\text{L}$ 로 4회 세척한다.
C	미세역가 평판의 각 웰에 3중으로 첨가한다: + 완충액 2 50 $\mu\text{L}$ + 완충액 2 50 $\mu\text{L}$ 중 보정 표준물 + 다비가트란-서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP) 결합체 GL261 25 $\mu\text{L}$ (추적자)(1/40000)
D	마이크로평판을 집착 호일로 밀봉하고, 모든 마이크로평판에 시료 분배를 종료하며, 주변온도하에 진탕기에서 4시간 동안 항온처리한다.
E	마이크로평판을 매회 450 $\mu\text{L}$ 로 4회 세척한다.
F	미세역가 평판의 각 웰에 100 $\mu\text{L}$ o-페닐렌 디아민 HCl, 2.7 mg/mL(완충액 4 mL중의 30mg 정제 한개)를 첨가한다. 주변온도에서 암실에서 30분 동안 항온처리한다.
G	미세역가 평판의 각 웰에 100 $\mu\text{L}$ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2.25 M)를 첨가한다. 5분 동안 진탕시킨다.
H	흡광도를 판독한다: 시험과장-490nm, 참조과장-650nm

- [0390]
- [0391] 5.3 토끼 혈청중의 항-다비가트란 항체의 검출
- [0392] 하기 3개 컬럼에서 수치는 다비가트란에 대한 것이다.

[0393]

출혈 2

토끼	면역원	피복제 농도 [µg/ml]	농도		
			[Mol]	[Ext]	[%]
1 #50	GL256	2	0	1.812	100%
			2.E-12	1.574	87%
			2.E-11	0.461	26%
			2.E-10	0.059	3%
2 #51	GL256	1	0	2.193	100%
			2.E-12	2.086	95%
			2.E-11	1.515	69%
			2.E-10	0.207	9%
3 #52	GL256	2	0	1.513	100%
			2.E-12	1.419	94%
			2.E-11	0.728	48%
			2.E-10	0.107	7%
4 #53	GL256	2	0	1.474	100%
			2.E-12	1.388	94%
			2.E-11	0.848	58%
			2.E-10	0.142	10%
5 #54	GL258	1	0	2.114	100%
			2.E-12	1.892	89%
			2.E-11	0.646	31%
			2.E-10	0.159	8%
6 #55	GL258	1	0	1.295	100%
			2.E-12	0.937	72%
			2.E-11	0.265	20%
			2.E-10	0.140	11%
7 #56	GL258	2	0	1.511	100%
			2.E-12	1.372	85%
			2.E-11	0.424	26%
			2.E-10	0.145	9%
8 #46	GL258	1	0	1.640	100%
			2.E-12	1.290	79%
			2.E-11	0.425	26%
			2.E-10	0.196	12%
9 #47	GL262	2	0	1.854	100%
			2.E-12	1.534	83%
			2.E-11	0.530	29%
			2.E-10	0.254	14%
10 #48	GL262	2	0	1.458	100%
			2.E-12	1.142	78%
			2.E-11	0.300	21%
			2.E-10	0.131	9%
11 #49	GL262	4	0	1.546	100%
			2.E-12	1.393	85%
			2.E-11	0.460	28%
			2.E-10	0.257	15%
12 #50	GL262	2	0	1.605	100%
			2.E-12	1.400	87%
			2.E-11	0.389	24%
			2.E-10	0.109	7%

[0394]

[0395] 최종 출혈

토끼	면역원	피복제 농도 [µg/ml]	농도		
			[Mol]	[Ext]	[%]
1	?	1	0	1.589	100%
			2.E-12	1.442	91%
			2.E-11	0.491	31%
			2.E-10	0.130	8%
2	?	1	0	1.375	100%
			2.E-12	1.041	76%
			2.E-11	0.293	21%
			2.E-10	0.101	7%
3	?	1	0	1.400	100%
			2.E-12	1.081	77%
			2.E-11	0.288	21%
			2.E-10	0.097	7%
4	?	1	0	1.183	100%
			2.E-12	0.882	75%
			2.E-11	0.396	33%
			2.E-10	0.183	15%
5	?	1	0	1.335	100%
			2.E-12	1.066	80%
			2.E-11	0.183	14%
			2.E-10	0.057	4%
6	?	1	0	1.214	100%
			2.E-12	0.976	80%
			2.E-11	0.250	21%
			2.E-10	0.123	10%
7	?	2	0	1.822	100%
			2.E-12	1.702	93%
			2.E-11	0.661	36%
			2.E-10	0.189	10%
8	?	2	0	1.234	100%
			2.E-12	1.085	88%
			2.E-11	0.671	54%
			2.E-10	0.147	12%
9	?	1	0	1.911	100%
			2.E-12	1.862	97%
			2.E-11	0.980	51%
			2.E-10	0.292	15%
10	?	1	0	1.933	100%
			2.E-12	1.891	98%
			2.E-11	1.055	55%
			2.E-10	0.076	4%
11	?	1	0	1.874	100%
			2.E-12	1.817	97%
			2.E-11	1.539	82%
			2.E-10	0.181	10%
12	?	2	0	1.599	100%
			2.E-12	1.425	89%
			2.E-11	0.475	30%
			2.E-10	0.050	3%

[0396]

[0397]

출혈 2로부터 획득한 모든 토끼의 단백질 분획을 스크리닝한 결과, 토끼 5(#54)가 바람직한 합텐 합텐 2에 의해 항-다비가트란 항체의 최고 역가를 나타낸 것으로 밝혀졌다. 또한, 항체 결합부위로부터의 추적자를 단지 낮은 농도의 분석물(다비가트란)로 치환시킬 수 있었다.

[0398]

최종 출혈 3의 스크리닝에서, 사용된 면역원에 대한 오류 정보때문에, 저농도의 분석물(다비가트란)에 의한 항체 결합부위로부터의 추적자의 치환을 주 결정기준으로서 사용하였다. 따라서, 토끼 2, 3 및 5가 추가 정제에 사용되었다.

[0399]

5.4 다클론 항체의 정제

[0400]

토끼 5(#54)의 출혈 2 및 토끼 2, 3 및 5의 출혈 3(최종 출혈)의 항혈청을 황산암모늄으로 침전시켰다. 침전물을 10°C에서 4500 U/분으로 30분 동안 원심분리하고, 용액으로부터 분리한 후, 트리스 완충액에 용해시켰다. 이 과정을 반복하였다. 단백질 A 세파로즈 FF에서 친화성 크로마토그래피로 추가의 정제를 수행하였다. 컬럼 완충액은 0.01 M 트리스 pH=7.5이었고, 0.1 M 글리신 pH=3.0을 용출을 위해 사용하였다. 토끼 IgG가 함유된 분획을 합쳤다. 280 nm에서 UV 분광으로 단백질 농도를 측정하였다.

[0401] 항체 명세의 요약:

면역원:	합텐 2-BSA(로트 번호 GL258)
도끼:	도끼 5(#54) 혈청(출혈 2)
단백질 함량:	1.85mg/mL
저장:	약 -20℃에서

[0402]

면역원:	합텐 1-BSA(GL256) 또는 합텐 2-BSA(로트 번호 GL258) 또는 합텐 2-BSA(로트 번호 GL262)
도끼:	수집한 도끼 2 혈청(최종 출혈)
단백질 함량:	3.9mg/mL
저장:	약 -20℃에서

[0403]

면역원:	합텐 1-BSA(GL256) 또는 합텐 2-BSA(로트 번호 GL258) 또는 합텐 2-BSA(로트 번호 GL262)
도끼:	도끼 3 혈청(최종 출혈)
단백질 함량:	9.96mg/mL
저장:	약 -20℃에서

[0404]

면역원:	합텐 1-BSA(GL256) 또는 합텐 2-BSA(로트 번호 GL258) 또는 합텐 2-BSA(로트 번호 GL262)
도끼:	도끼 5 혈청(최종 출혈)
단백질 함량:	5.72mg/mL
저장:	약 -20℃에서

[0405]

[0406] II. 다비가트란의 중화

[0407] 시험관내에서 다비가트란 항응고제 활성에 대한 항체의 효과를 나타내는 실험을 2회 연속 수행하였다. 4가지 다클론 항체가 실험실에서 수득되었고 사람 혈장에서 추가로 시험되었다. 이것은 기능성 검사인 트롬빈 응고 시간으로 시험되었다.

[0408] 검사 설명:

[0409] 간단히 설명하면 전혈을 3.13% 나트륨 시트레이트에 투입하여 사람 혈장을 수득한다. 이어서, 혈장을 원심분리하여 무혈소판 혈장을 수득하고 별도의 튜브로 옮긴 다음, 검사 당일 사용시까지 동결시켜 둔다. 검사 당일에 혈장은 37℃에서 해동한다.

[0410] 트롬빈 응고 시간은 다음과 같이 수행하였다. 먼저 트롬빈을 제공된 완충액(Dade Behring Test kit)에 제조사의 명세에 따라 희석하고(3 IU/mL 트롬빈), 37℃로 예비가온한다. 이것은 제조 후 2시간내에 사용한다. 모든 검사는 시판품인 CL4 응고 기기(Behnk Electronics, Norderstadt, Germany)상에서 수행하였다. 50 μL의 혈장을 자석교반기가 있는 제공된 큐벳에 피펫팅하고 CL4 기기에서 37℃로 예열된 웰에서 2분 동안 교반시켰다. 이 시점에서 100 μL의 트롬빈 용액을 첨가하고 혈장 시료가 응고하는데 걸리는 시간을 CL4로 자동 기록하였다. 트롬빈을 첨가하고 측정을 시작하기 전에 다비가트란은 제공된 큐벳의 혈장에서 5분 동안 예비향온처리시켰다. 항체를 또한 시험하는 경우(50 μL의 원액), 응고가 시작되기 전에 37℃에서 5분 동안 추가로 향온처리하였다(즉, 다비가트란으로의 총 향온처리시간은 10분, 항체로의 총 향온처리시간은 5분, 이후에 트롬빈에 의해 응고가 시작되었다).

[0411] 처음에, 사람 혈장에 농도가 증가된 다비가트란을 첨가하고 트롬빈의 첨가 후 응고 시간을 측정하여 다비가트란 표준 곡선을 수행하였다(도 1). 다비가트란의 농도가 증가함에 따라 트롬빈 응고 시간은 농도-의존적 증가를 보였다.

[0412] 중화 실험의 첫 번째 세트에서, 중화를 위해 모든 혈장 시료에 임상적 상대 농도인 200nM의 다비가트란을 첨가하였다. 모든 4 가지 항체 제제는 다비가트란을 함유한 혈장에서 응고 시간을 단축시킬 수 있었다(도 2). 중화 정도는 각 항체 제제중의 단백질 농도와 연관이 있었다. 이후에, 최고 농도의 항체 용액(D)을 연속 희석하고 별도의 실험 세트에서 200 nM 다비가트란 항응고제 활성을 중화시키는 능력에 대해 시험하였다. 도 3에서 볼 수 있듯이, 항체의 증가하는 농도에 따라서 다비가트란-유도된 항응고제 활성의 농도-의존적 억제가 있었다. 또한, 비특이적 도끼 다클론 항체(청색 사각형)가 다비가트란-함유 혈장에 첨가되었을 때, 항응고제 활성을 중

화시키는 능력은 나타나지 않았다. 농도 의존성 및 비특이적 항체의 중화 결여는 항체에 의한 항응고의 억제에 다비가트란에 대해 특이적임을 가리킨다.

[0413] 그러나, 다비가트란의 이러한 농도는 임상적으로 관련이 있으며, 출혈 또는 과다복용은 아마도 보다 높은 농도에서 일어날 것이다. 따라서, 도 1의 표준 곡선에서 최고 농도의 다비가트란(500 nM)의 항응고제 활성을 억제하는 항체의 능력을 또한 시험하였다. 도 4는 항체 D가 또한 고 농도의 다비가트란을 억제할 수 있음을 도시한다.

[0414] III. 단클론 항-다비가트란 항체의 제조 및 특성분석

[0415] 1. 단클론 항-다비가트란 항체 및 Fab의 제조

[0416] 헤모시아닌 및 면역글로불린과 같은 담체 단백질에 결합된 합텐 1(실시에 1.1 참조)로 마우스를 면역화하고 표준 방법에 따라 하이브리도마를 생성하였다. 배양 상청액으로부터 정제된 단클론 항체를 다비가트란-단백질 결합체에 결합시키고, 이 결합은 용액중의 다비가트란과 1 내지 10nM의 범위의 농도에서 최대 억제의 절반으로 경쟁할 수 있었다. 단클론 항체를 파파인으로 절단한 후 단백질 A를 통해 Fc 도메인을 제거하여 Fab를 생성하였다.

[0417] 마우스 항체의 중쇄 및 경쇄로부터의 가변 영역을 표준 방법을 사용하여 클로닝하고 서열분석하였다. 항체의 질량분석 및 N-말단 서열분석에 의한 단백질 분석으로 서열을 검증하였다. 특이적 마우스 가변 영역 및 사람 IgG 불변 영역을 포함하는 키메라 항체를 암호화하는 DNA 작제물을 생성하고 HEK 293T 세포에서 단백질을 발현시키고 정제하였다.

[0418] 2. 단클론 항-다비가트란 항체 및 Fab의 특성분석

[0419] 단클론 항체 클론 3종의 가변 도메인의 서열이 도 5 및 도 6에 도시되어 있다. 클론 13의 가변 도메인의 아미노산 서열은 도 5(DBG 13 VH, 중쇄, 서열번호 16) 및 도 6(DBG 13 VK, 경쇄, 서열번호 17)에 도시되어 있다. 클론 14의 가변 도메인의 아미노산 서열은 도 5(DBG 14 VH, 중쇄, 서열번호 18) 및 도 6(DBG 14 VK, 경쇄, 서열번호 19)에 도시되어 있다. 클론 22의 가변 도메인의 아미노산 서열은 도 5(DBG 22 VH, 중쇄, 서열번호 20) 및 도 6(DBG 22 VK, 경쇄, 서열번호 21)에 도시되어 있다.

[0420] 실시예 II에 기술된 트롬빈 응고 시간 검사에 의해 사람 혈장중의 다비가트란 항응고제 활성을 마우스 단클론 항체 클론 22가 중화시키는 능력에 대해 검사하였다. 이 항체는 사람 혈장중의 트롬빈 의존적 응고의 다비가트란-매개된 연장을 용량 의존적 양상으로 완전히 억제하였다(도 7). 또한 이 항체는 사람 전혈중의 다비가트란 기능을 효과적으로 억제하였다. 이 항체로부터 유도된 Fab는 사람 혈장중의 다비가트란 활성을 차단하였고, 이것은 일가 항원 결합 도메인이 화합물 항응고제 활성을 중화시킬 수 있음을 증명한다(도 8).

[0421] 사람에서 다비가트란의 주요 대사경로는 카르복실레이트 모이어티의 글루쿠로니드화이다. 다비가트란 아실글루쿠로니드가 약물학적으로 활성적인 것으로 제시되었다(Ebner et al., Drug Metab. Dispos. 2010, 38(9): 1567-75). 마우스 단클론 항체 클론 22가 이들 대사물을 중화시킬 수 있는지를 시험하기 위해, 다비가트란으로 치료한 붉은털원숭이의 뇨에서 다비가트란 아실글루쿠로니드를 정제하고 트롬빈 응고 시간 검사로 평가하였다. 상기 항체는 다비가트란에서 나타난 것과 유사한 효능으로 사람 혈장에서 트롬빈 의존적 응고의 다비가트란 아실글루쿠로니드-매개된 연장을 용량 의존적으로 억제하였다(도 9). 따라서, 이 항체는 사람에서 발견된 다비가트란 대사물의 항응고제 활성을 차단하는데 효과적이다.

[0422] 클론 22, 13 및 14의 가변 도메인과 사람 면역글로불린 불변 영역(경쇄 불변 영역: 서열번호 44; 중쇄 불변 영역: 서열번호 45)을 포함하는 마우스-사람 키메라 항체와 Fab의 친화성을 Kinexa 기술을 사용하여 측정하였다. 일정한 농도의 Fab 또는 키메라 항체를 다비가트란의 여러 농도와 평형이 이루어질 때까지 항온처리하였다. 이러한 항온처리 후 유리 항체의 농도를 비오틴-결합된 다비가트란 유사체와 결합된 뉴트라비딘 비드상의 항체를 포획함으로써 측정하였다. 포획된 Fab는 FITC가 표지된 항-마우스 IgG(Fab 특이적) F(ab')<sub>2</sub> 단편으로 검출하였다. 포획된 키메라 항체는 Cy5와 결합된 항-사람 IgG로 검출하였다. 1:1 결합 모델을 사용하여 해리상수를 계산하였다. 이들 실험의 결과는 하기 표에 요약되어 있다.

[0423] 항-다비가트란 항체의 친화성

항체	결보기 $K_d$
클론 22 Fab	48 pM
클론 22 키메라 항체	34 pM
클론 13 키메라 항체	60 pM
클론 14 키메라 항체	46 pM

[0424]

[0425] Fab와 키메라 항체 둘다 다비가트란과 고 친화성으로 결합한다.

[0426] 3. 인간화 단클론 항-다비가트란 항체 및 Fab의 제조

[0427] 사람에게 투여 후 잠재적 면역원성을 줄이기 위해 마우스 단클론 항체를 '인간화'하였다. 골격 상동성, CDR 구조, 보존 필수잔기, 보존 인터페이스 패킹 잔기 및 기타 변수를 기초로 하여 마우스 리드(lead)에 대해 사람 골격 서열을 선별하였다. 이들 골격 위치에서 아미노산 잔기의 특이적 치환은 사람 배선 골격 영역내로 CDR 또는 HVL의 "직접적인 스왑(direct swap)"에 의해 형성된 인간화 항체에서 증명된 것이상으로 결합 친화성 및/또는 안정성을 포함한 여러 관점의 항체 능력을 향상시킬 수 있다. 키메라 모(parent) Fab에 비하여 보다 양호하거나 대등한 결합 및 향상된 발현을 나타낸 Fab를 추가적인 특성분석을 위해 선별하였다. 인간화 Fab의 가변 도메인의 아미노산 서열이 도 5(Eng VH 14, 서열번호 22; ENG VH 15, 서열번호 24; 및 ENG VH 31, 서열번호 26) 및 도 6(Eng VK 11, 서열번호 23; ENG VK 17, 서열번호 25; 및 ENG VK 18, 서열번호 27)에 도시되어 있다. Eng VH 15 및 Eng VK 18(경쇄: 서열번호 37; 중쇄: 서열번호 36)을 포함한 Fab는 CHO 세포에서 직접 발현되었고 카파 선별 및 단백질 G 수지를 사용하여 정제되었다.

[0428] 또한, Eng VH15 및 Eng VK18을 포함한 Fab가 IgG1K0 형태(경쇄: 서열번호 35; 중쇄: 서열번호 40)로 전장 IgG로 전환되었다. IgG1K0(이펙터 기능의 녹아웃)는 Fc 영역에서 두개의 돌연변이(Leu234Ala 및 Leu235Ala)를 가지며, 이러한 돌연변이는 FcγR 및 보체 결합과 같은 이펙터 기능을 약화시킨다. IgG 형태는 예를 들어 문헌[참조: Hezareh et al.(2001) Journal of Virology 75: 12161-12168]에 기술되어 있다. 인간화 항-다비가트란 항체는 임의로 공통 또는 배선 골격 영역에 특이적 아미노산 치환을 포함한다. 18/15 항체가 HEK 293T 세포 또는 CHO 세포에서 발현되고 정제되었다. Fab 단편은 완전한 항체를 Lys-C 또는 파파인으로 절단하여 생성하고 단백질 A를 통해 Fc 도메인을 제거하여 정제하였다.

[0429] 4. 항-다비가트란 Fab의 특성분석

[0430] 실시예 II에 기술된 트롬빈 응고 시간 검사에서 완전한 항체를 Lys-C로 절단하여 생성된 18/15 Fab 단편의 사람 혈장중의 다비가트란 항응고제 활성을 중화시키는 능력에 대해 검사하였다. Fab는 사람 혈장에서 트롬빈 의존적 응고의 다비가트란-매개된 연장을 2.6 nM의 IC<sub>50</sub>으로서 용량 의존적 양상으로 완전히 억제하였다(도 10). 직접적으로 발현된 Fab 단편 및 완전한 항체의 파파인 절단에 의해 생성된 Fab 단편은 또한 각각 2.6 및 2.7 nM의 IC<sub>50</sub>으로서 다비가트란 항응고제 활성을 중화시켰다.

[0431] 완전한 항체의 Lys-C 절단에 의해 생성된 18/15 Fab 및 직접적으로 발현된 Fab의 친화성은 SPR 기술을 사용한 BIAcore 기기로 측정하였다. Fab를 농도가 증가된 다비가트란과 실온에서 30분 동안 예비항온처리하였다. 고정된 비오틴-결합된 다비가트란 유사체가 피복된 센서 칩위로 혼합물을 유동시키고 유리 Fab의 결합을 모니터링 하였다. 이와 같은 용액의 경쟁 검사를 사용하여, 다비가트란에 대한 Fab의 K<sub>D</sub> 값은 Lys-C에 의해 생성된 Fab의 경우 0.16 pM로, 직접적으로 발현된 Fab의 경우 0.45 pM로 측정되었다.

[0432] 파파인 절단에 의해 생성된 Fab를 사용한 생체내 실험

[0433] 랫트(수컷 위스타, 약 300 g)에 펜토바비탈을 단회 주사(60 mg/kg 복강내) 및 유지 마취를 위한 연속 주입(20 mg/kg/시간, 복강내)하여 마취하고 체내 온도를 유지하기 위해 37°C 예열 패드에 올려 놓았다. 혈액 시료를 위해 목동맥을 드러내어 캐놀러를 삽입하고, 물질 투여를 위해 우측 경정맥을 드러내어 캐놀러를 삽입하였다. 다

비가트란을 처음에 단회 투여하고(0.3 μM/kg) 지속적인 혈장 수준을 달성하기 위해 20분에 걸쳐 주입하였다 (0.1 μM/kg/시간). 20분 후, Fab를 등물 농도 또는 이의 절반 농도로 좌측 경정맥을 통해 단회 정맥내 주사하였다. 혈액 시료(3.13% 나트륨 시트레이트중에 1/10 희석)를 기준시점에서 채취하고(-20분, -2분) Fab 주사 후 30분 동안 여러 시간 간격에서 채취하였다.

[0434] 다비가트란의 항응고제 효과는 트롬빈 시간(TT) 및 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT)를 포함한 전혈 응고 시간으로서 측정하였다. 간단히 설명하면, 37°C로 예열된 웰에 전혈 50 μL를 첨가하고 코어골로미터상에서 트롬빈 시간을 측정한다. 3.0 U/mL 농도의 트롬빈(Siemens Healthcare, Marburg, Germany)을 첨가하고(100 μL 용량) 시료가 응고하는데 걸리는 시간을 측정한다. 전혈 aPTT는 코어골로미터에서 전혈 50 μL를 37°C로 예열하고 aPTT 시약 50 μL(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 3분 동안 첨가함으로써 수행된다. 응고 시간은 0.025 M 예열된(37°C) 염화칼슘 50 μL의 첨가시 개시된다. 그러한 다음 전혈 시료가 응고하는데 걸리는 시간을 기록한다.

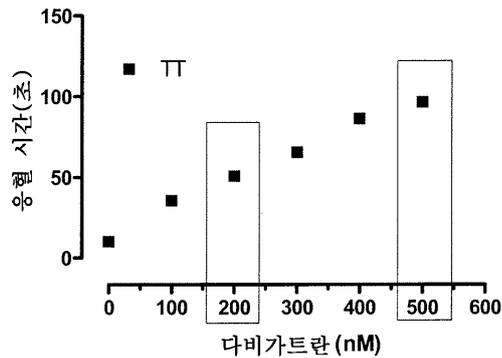
[0435] 다비가트란과 등물 용량으로 단회 정맥내 주사된 18/15 Fab(경쇄: 서열번호 37, 중쇄 Fd 단편: 서열번호 41, CHO 세포에서 발현된 완전한 면역글로불린의 파파인 절단에 의해 생성됨)의 결과가 도 11 및 도 12에 나타나 있다. 이 모델에서는 TT(도 11) 및 pPTT(도 12) 둘 다로서 측정된 것으로 다비가트란 항응고제 활성의 신속하고 거의 즉효성인 억제로 나타났다. 주사 후 1분내에, 다비가트란 항응고제 활성은 기준치 수준으로 떨어져 완전히 중화되었다. 이것은 다비가트란의 계속된 연속 정맥내 주입에도 불구하고 20분에 걸쳐 유지되었다.

[0436] 보다 낮은 용량, 즉 다비가트란의 몰용량의 절반이 투여된 경우 또한 TT(도 13) 및 aPTT(도 14) 둘다에서 초기 감소가 나타났다. 그러나, 이것은 다비가트란의 계속된 연속 주입의 조건하에서 보다 높은 용량이 투여되는 한 유지되지 않았다.

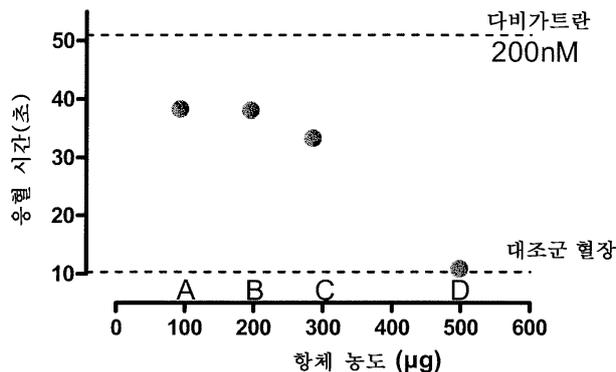
[0437] 따라서, 이들 결과는 이 동물 모델에서 항-다비가트란 Fab의 단회 정맥내 투여 후 다비가트란 항응고제 활성의 예측가능하고, 용량-의존적이며 매우 신속한 중화를 증명한다.

도면

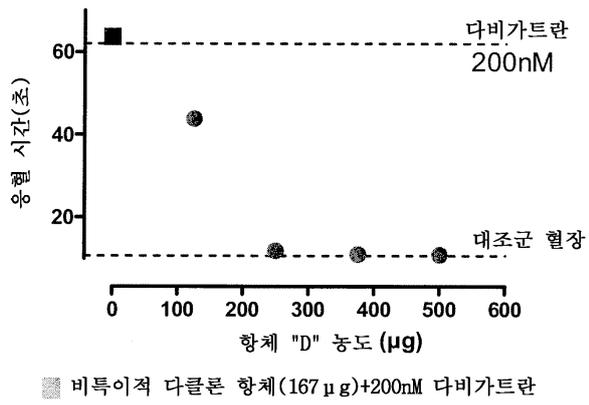
도면1



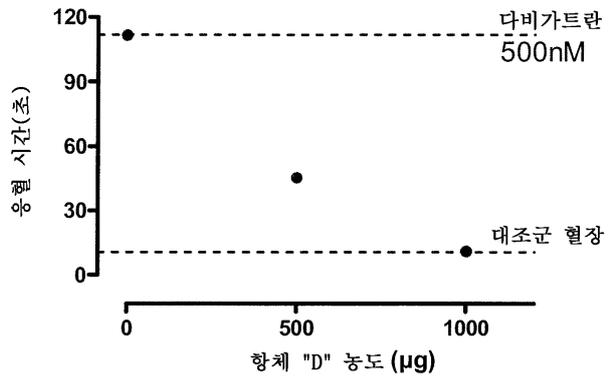
도면2



도면3



도면4



도면5

Chothia-----  
 Kabat-----  
 IMGT-----  
 DVQLKQSGPGLVAPQSLSITCTVS GFSLTSYIVDWVRQSPGKGLEWLG VIWAGGSTNYN  
 QVQLEQSGPGLVAPSQRLSITCTVS GFSLTYIIVDWVRQSPGKGLEWLG VIWAGGSTSYN  
 QVQLEQSGPGLVAPSQRLSITCTVS GFSLTSYIIVDWVRQSPGKGLEWLG VIWAGGSTNYN  
 QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVS GFSLTSYIIVDWIRQPPGKLEWIG VIWAGGSTRYN  
 QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVS GFSLTSYIIVDWIRQPPGKLEWIG VIWAGGSTGYN  
 QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVS GFSLTSYIIVDWIRQPPGKLEWLG VIWAGGSTAYN

- >DBG 13 VH
- >DBG 14 VH
- >DBG 22 VH
- >Eng VH#14
- >Eng VH#15
- >Eng VH#31

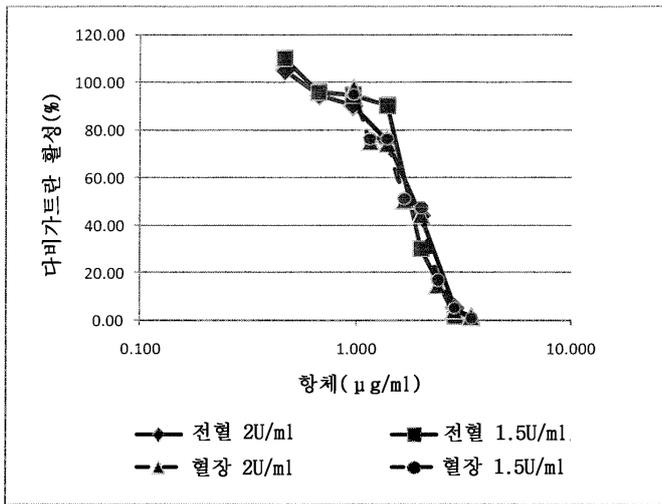
Chothia-----  
 Kabat-----  
 IMGT-----  
 SALKSRRLNITKDN SKNQVFLKMNLSIQTDDTAIYYCAS AAYSYNYDFGFAYWGQGTLVTVSA  
SALRSRLSITKNSKSQVFLQMNLSIQTDDTAIYYCAS AAYSYNYDFGFAYWGQGTLVTVSA  
SALRSRLSITKNSKSQVFLQMNLSIQTDDTAIYYCAS AAYSYNYDFGFAYWGQGTLVTVSA  
SALRSRVTISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAIYYCAS AAYSYNYDFGFAYWGQGTLVTVSS  
SALRSRVSITKDTSKNQFSLKLSVTAADTAIYYCAS AAYSYNYDFGFAYWGQGTLVTVSS  
SALRSRVTISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAIYYCAS AAYSYNYDFGFAYWGQGTLVTVSS

- >DBG 13 VH
- >DBG 14 VH
- >DBG 22 VH
- >Eng VH#14
- >Eng VH#15
- >Eng VH#31

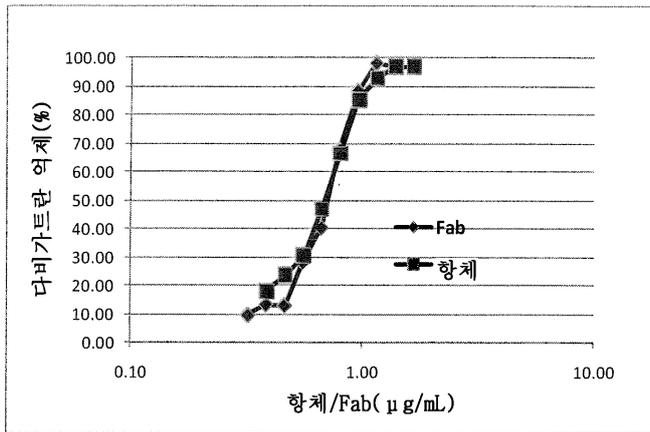
도면6

<p>&gt;DBG 13 VK &gt;DBG 14 VK &gt;DBG 22 VK &gt;Eng VK#11 &gt;Eng VK#17 &gt;Eng VK#18</p>	<pre> DIVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLYTNGKTYLYWLLQRPQGQSPKRLIY DVVLTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLYTNGKTYLYWLLQRPQGQSPKRLIY DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLYTNGKTYLYWLLQRPQGQSPKRLIY DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYTNGKTYLYWFLQRPQGQSPKRLIY DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYTNGKTYLYWFLQRPQGQSPKRLIY DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYTNGKTYLYWFLQRPQGQSPKRLIY                 </pre>
<p>&gt;DBG 13 VK &gt;DBG 14 VK &gt;DBG 22 VK &gt;Eng VK#11 &gt;Eng VK#17 &gt;Eng VK#18</p>	<pre> LVSKLDSGGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLVGYCYC LVSKLDSGGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYCYC LVSKLDSGGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYCYC LVSKLDSGGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYCYC LVSKLDSGGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYCYC LVSKLDSGGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYCYC                 </pre>

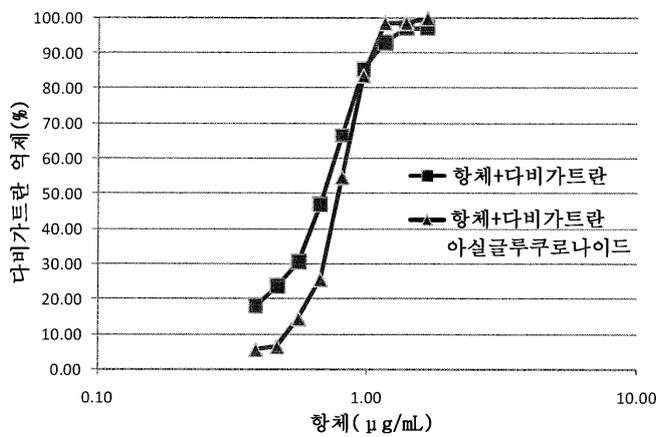
도면7



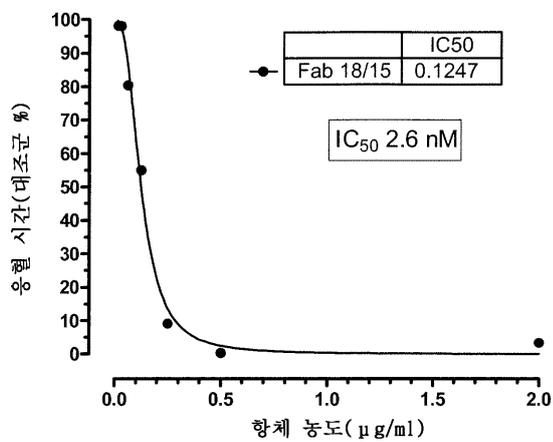
도면8



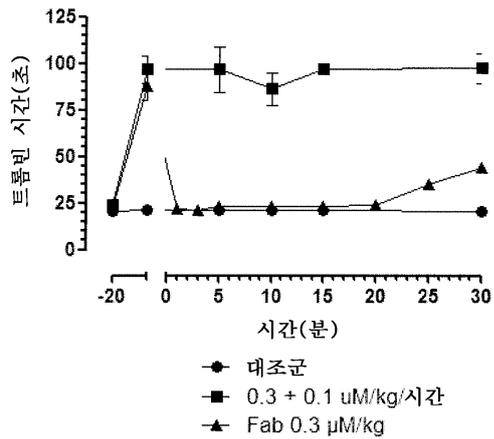
도면9



도면10

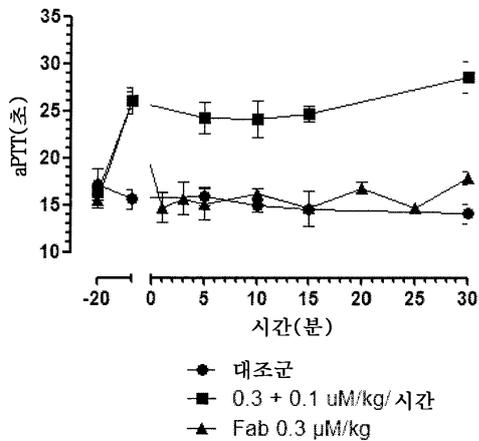


도면11



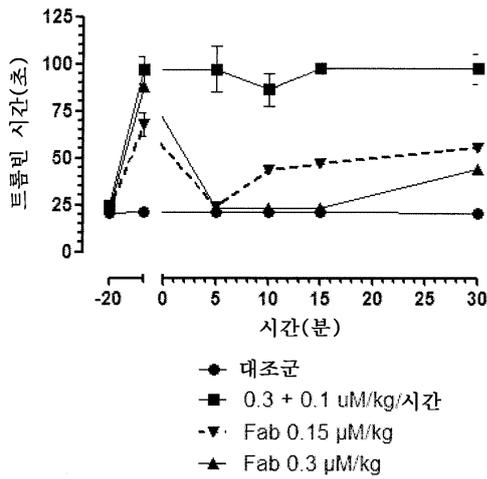
다비가트람: 단회 주사(0.3 μM/kg)+주입(0.1 μM/kg/시간)  
 트롬빈 시간: 검사에 사용된 3.0 U/ml 트롬빈  
 데이터는 평균 ± SE로 표시되었다, n=4

도면12



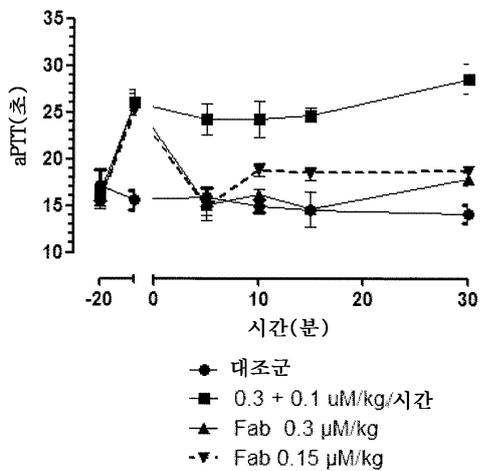
다비가트람: 단회 주사(0.3 μM/kg)+주입(0.1 μM/kg/시간)  
 데이터는 평균 ± SE로 표시되었다, n=4

도면13



다비가트란 단회 주사(0.3  $\mu$ M/kg)+주입(0.1  $\mu$ M/kg/시간)  
 트롬빈 시간: 검사에 사용된 3.0 U/ml 트롬빈  
 데이터는 평균  $\pm$  SE로 표시되었다, n=4

도면14



다비가트란 단회 주사(0.3  $\mu$ M/kg)+주입(0.1  $\mu$ M/kg/시간)  
 데이터는 평균  $\pm$  SE로 표시되었다, n=4

서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH
- <120> ANTICOAGULANT ANTIDOTES
- <130> P01-2585/W0/1
- <150> 10151239.0
- <151> 2010-01-20
- <150> 61/383,914

<151> 2010-09-17

<160> 45

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR1 A

<400> 1

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Ile Val Asp

1                    5                    10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR 1B

<400> 2

Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Ile Val Asp

1                    5                    10

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR2 A

<400> 3

Val Ile Trp Gly Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1                    5                    10                    15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR2 B

<400> 4

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Ser Ala Leu Arg Ser

1                    5                    10                    15

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR2 C

<400> 5

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Arg Ser

1                    5                    10                    15

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR2 D

<400> 6

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Ser Ala Leu Arg Ser

1                    5                    10                    15

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR2 E

<400> 7

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu Arg Ser

1                    5                    10                    15

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR2 F

<400> 8

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Ser Ala Leu Arg Ser

1                    5                    10                    15  
 <210> 9  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR3 A

<400> 9  
 Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Phe Asp Gly Phe Ala Tyr

1                    5                    10  
 <210> 10  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VH CDR3 B

<400> 10  
 Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr

1                    5                    10  
 <210> 11  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VK CDR1 A

<400> 11  
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr

1                    5                    10                    15  
 <210> 12  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VK CDR1 B

<400> 12  
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Ser Tyr Leu Tyr

1                    5                    10                    15

<210> 13  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> VK CDR1 C  
 <400> 13  
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr  
 1                    5                    10                    15

<210> 14  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> VK CDR2  
 <400> 14  
 Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser  
 1                    5

<210> 15  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> VK CDR3  
 <400> 15  
 Leu Gln Ser Thr His Phe Pro His Thr  
 1                    5

<210> 16  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 16  
 Asp Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1                    5                    10                    15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr  
                   20                    25                    30

Ile Val Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Trp Gly Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Asn Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Phe Asp Gly Phe Ala Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr  
 20 25 30  
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser  
 85 90 95  
 Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 18

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln

1                    5                    10                    15

Arg Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr

20                    25                    30

Ile Val Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35                    40                    45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Ser Ala Leu Arg

50                    55                    60

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asn Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65                    70                    75                    80

Gln Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85                    90                    95

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp

100                    105                    110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115                    120

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1                    5                    10                    15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr

20                    25                    30

Asn Gly Lys Ser Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35                    40                    45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro



<400> 21

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1                   5                   10                   15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr  
                   20                   25                   30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
           35                   40                   45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
       50                   55                   60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                   70                   75                   80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser  
                   85                   90                   95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                   105                   110

<210> 22

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered Antibody Sequence, Heavy Chain Variable Domain ENG VH

14

<400> 22

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1                   5                   10                   15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr  
                   20                   25                   30

Ile Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
           35                   40                   45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Ser Ala Leu Arg  
       50                   55                   60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65                   70                   75                   80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 23

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered Antibody Sequence, Light Chain Variable Domain ENG VK

11

<400> 23

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr  
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser  
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 24

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered Antibody Sequence, Heavy Chain Variable Domain ENG VH

15

<400> 24

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1                    5                    10                    15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr  
                   20                    25                    30

Ile Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                    40                    45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu Arg  
                   50                    55                    60

Ser Arg Val Ser Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65                    70                    75                    80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
                   85                    90                    95

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp  
                   100                    105                    110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115                    120

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered Antibody Sequence, Light Chain Variable Domain, ENG VK

17

<400>

> 25

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1                    5                    10                    15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr  
                   20                    25                    30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro



<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered Antibody Sequence, Light Chain Variable Domain, ENG VK

18

<400> 27

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1                    5                    10                    15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr

                  20                    25                    30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

                  35                    40                    45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

                  50                    55                    60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65                    70                    75                    80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser

                  85                    90                    95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

                  100                    105                    110

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1                    5                    10                    15

<210> 29

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 29

Ser Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Gly  
                   20                    25

<210> 30

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 30

Ser Pro Asn Gly Ala Ser His Ser Ser Ser Ala Ser Gln Thr Gly Ser  
 1                    5                    10                    15  
 Ala Ser Gly Ser Gln  
                   20

<210> 31

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 31

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr  
 1                    5                    10                    15  
 Lys Gly

<210> 32

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered Antibody Sequence, scFv

<400> 32

Met Ala Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr  
 1                    5                    10                    15

Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu  
 20 25 30  
 Tyr Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly  
 35 40 45  
  
 Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly  
 50 55 60  
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu  
 85 90 95  
 Gln Ser Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
 100 105 110  
  
 Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser  
 130 135 140  
 Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Ile Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 165 170 175  
  
 Ile Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu  
 180 185 190  
 Arg Ser Arg Val Ser Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 195 200 205  
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 210 215 220  
 Ala Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr  
 225 230 235 240  
  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245 250

<210> 33

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered Antibody Sequence, scFv2

<400> 33

Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr  
                   20                    25                    30  
 Ser Tyr Ile Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
                   35                    40                    45  
 Trp Ile Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala  
                   50                    55                    60  
 Leu Arg Ser Arg Val Ser Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
                   85                    90                    95  
 Cys Ala Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala  
                   100                    105                    110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
                   115                    120                    125  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr  
                   130                    135                    140  
 Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile  
 145                    150                    155                    160  
 Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Lys Thr Tyr  
                   165                    170                    175  
 Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile  
                   180                    185                    190  
 Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
                   195                    200                    205  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala



Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr



Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145                      150                      155                      160  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
                                  165                      170                      175  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
                                  180                      185                      190  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
                                  195                      200                      205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                                  210                      215

<210> 36

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered Antibody Sequence, Fab Fd

<400> 36

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1                      5                      10                      15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr  
                                  20                      25                      30

Ile Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                                  35                      40                      45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu Arg  
                                  50                      55                      60

Ser Arg Val Ser Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65                      70                      75                      80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
                                  85                      90                      95

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp  
                                  100                      105                      110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
                                  115                      120                      125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
 210 215 220

Cys  
 225

<210> 37  
 <211> 219  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered Antibody Sequence, Fab Light Chain

<400> 37

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr  
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser  
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 115 120 125  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 180 185 190  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215  
 <210> 38  
 <211> 226  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Engineered Antibody Sequence, Fab Fd  
 <400> 38  
 Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser  
 20 25 30  
 Tyr Ile Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Ile Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu  
 50 55 60  
 Arg Ser Arg Val Ser Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser



Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln  
 85 90 95  
  
 Ser Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 100 105 110  
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 115 120 125  
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 130 135 140  
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 145 150 155 160  
  
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 165 170 175  
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
 180 185 190  
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 195 200 205  
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215 220  
 <210> 40  
 <211  
 > 452  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Engineered Antibody Sequence, IgG1 Heavy Chain  
 <400> 40  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ile Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
  
 Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu Arg  
 50 55 60  
 Ser Arg Val Ser Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp  
 100 105 110  
  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 115 120 125  
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
 130 135 140  
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175  
  
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 180 185 190  
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 195 200 205  
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser  
 210 215 220  
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala  
 225 230 235 240  
  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 245 250 255  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser



1                    5                    10                    15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr  
                          20                    25                    30  
  
 Ile Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                          35                    40                    45  
 Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu Arg  
                          50                    55                    60  
 Ser Arg Val Ser Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65                    70                    75                    80  
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
                          85                    90                    95  
  
 Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp  
                          100                    105                    110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
                          115                    120                    125  
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
                          130                    135                    140  
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145                    150                    155                    160  
  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
                          165                    170                    175  
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
                          180                    185                    190  
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
                          195                    200                    205  
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
                          210                    215                    220  
  
 Cys Asp Lys Thr His  
 225  
 <210> 42  
 <211> 452

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mouse/Human Chimeric IgG Heavy Chain

<400> 42

Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Arg Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr  
                   20                    25                    30  
 Ile Val Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
                   35                    40                    45  
  
 Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Arg  
                   50                    55                    60  
 Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65                    70                    75                    80  
 Gln Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
                   85                    90                    95  
 Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp  
                   100                    105                    110  
  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
                   115                    120                    125  
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
                   130                    135                    140  
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145                    150                    155                    160  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
                   165                    170                    175  
  
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
                   180                    185                    190  
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
                   195                    200                    205  
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser  
                   210                    215                    220



<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mouse/Human Chimeric IgG Light Chain

<400> 43

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1                    5                    10                    15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr

                  20                    25                    30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

                  35                    40                    45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

                  50                    55                    60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65                    70                    75                    80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser

                  85                    90                    95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

                  100                    105                    110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

                  115                    120                    125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

                  130                    135                    140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145                    150                    155                    160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

                  165                    170                    175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

                  180                    185                    190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

                  195                    200                    205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 44

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

<210> 45

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 45

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50                      55                      60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65                      70                      75                      80  
  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
                                  85                      90                      95  
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
                                  100                      105                      110  
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
                                  115                      120                      125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
                                  130                      135                      140  
  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145                      150                      155                      160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
                                  165                      170                      175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
                                  180                      185                      190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
                                  195                      200                      205  
  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
                                  210                      215                      220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225                      230                      235                      240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
                                  245                      250                      255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
                                  260                      265                      270  
  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
                                  275                      280                      285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
                                  290                      295                      300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305                    310                    315                    320  
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                         325                    330