

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5114055号
(P5114055)

(45) 発行日 平成25年1月9日(2013.1.9)

(24) 登録日 平成24年10月19日(2012.10.19)

(51) Int.Cl. F I
A 6 1 K 39/395 (2006.01) A 6 1 K 39/395 Z N A N
A 6 1 P 11/00 (2006.01) A 6 1 P 11/00

請求項の数 28 (全 141 頁)

(21) 出願番号	特願2006-517186 (P2006-517186)	(73) 特許権者	510067991 ジェネンテック, インク. アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 080 サウス サンフランシスコ ディ ーエヌエー ウェイ 1
(86) (22) 出願日	平成16年6月4日(2004.6.4)	(74) 代理人	100136630 弁理士 水野 祐啓
(65) 公表番号	特表2006-528130 (P2006-528130A)	(72) 発明者	チャオ, チン-アン アメリカ合衆国 サウスダコタ州 571 06 スー フォールズ サウス グリネ ル アベニュー 2616
(43) 公表日	平成18年12月14日(2006.12.14)	(72) 発明者	ワン, ヒン, シー. アメリカ合衆国 フロリダ州 33332 ウェストン ウェントワース 2966
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/017900		
(87) 国際公開番号	W02005/004793		
(87) 国際公開日	平成17年1月20日(2005.1.20)		
審査請求日	平成18年10月18日(2006.10.18)		
(31) 優先権主張番号	60/480, 254		
(32) 優先日	平成15年6月19日(2003.6.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/538, 892		
(32) 優先日	平成16年1月22日(2004.1.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 障害に関連する凝固の治療用組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳類における急性肺損傷 (ALI) または急性呼吸促迫症候群 (ARDS) の予防または治療のための薬物であって、当該薬物が、以下のアミノ酸配列、

軽鎖 CDR 1: 配列番号 126 ;

軽鎖 CDR 2: 配列番号 127 ;

軽鎖 CDR 3: 配列番号 128 ;

重鎖 CDR 1: 配列番号 185 ;

重鎖 CDR 2: 配列番号 186 ;

重鎖 CDR 3: 配列番号 187

を有する軽鎖および重鎖の相補性決定領域 (CDR) を含む、少なくとも1つのヒト化抗体、キメラ抗体、またはその断片を治療上有効な量、含む、薬物。

【請求項2】

哺乳類における急性肺損傷 (ALI) または急性呼吸促迫症候群 (ARDS) の予防または治療のための薬物であって、当該薬物が、以下のアミノ酸配列、

軽鎖 CDR 1: 配列番号 126 ;

軽鎖 CDR 2: 配列番号 127 ;

軽鎖 CDR 3: 配列番号 128 ;

重鎖 CDR 1: 配列番号 188 ;

重鎖 CDR 2: 配列番号 189 ;

重鎖 CDR 3: 配列番号 190

を有する軽鎖および重鎖の相補性決定領域 (CDR) を含む、少なくとも1つのヒト化抗体、キメラ抗体、またはその断片を治療上有効な量、含む、薬物。

【請求項 3】

哺乳類における急性肺損傷 (ALI) または急性呼吸促迫症候群 (ARDS) の予防または治療のための薬物であって、当該薬物が、配列番号2のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、キメラ抗体またはその断片を治療上有効な量、含む、薬物。

【請求項 4】

請求項1、2、または3のいずれかに記載の薬物であって、前記抗体がヒト組織因子 (TF) に特異的に結合して複合体を形成し、第X因子 (FX) または第IX因子 (FIX) の前記複合体への結合、およびTF: 第VIIa因子 (FVIIa) によるFX またはFIX活性化が阻害され、前記抗体がTFおよび第VIIa因子間の相互作用を阻害しない、薬物。

【請求項 5】

請求項1、または2のいずれかに記載の薬物であって、ヒト化抗体またはその断片の軽鎖がさらに、

- (a) 配列番号82または94のいずれかに少なくとも90%の同一性を有する配列を含む第1のフレームワーク (FR1) ;
- (b) 配列番号83、91、または123のいずれかに少なくとも90%の同一性を有する配列を含む第2のフレームワーク (FR2) ;
- (c) 配列番号84、104、108、116、または120のいずれかに少なくとも90%の同一性を有する配列を含む第3のフレームワーク (FR3) ; および
- (d) 配列番号85、89、または97のいずれかに少なくとも90%の同一性を有する配列を含む第4のフレームワーク (FR4) 、

を含み、ならびに

ヒト化抗体、キメラ抗体、またはその断片の重鎖が

- (a) 配列番号129、133、153、157、161、169、173、177、または181のいずれかに少なくとも90%の同一性を有する配列を含む第1のフレームワーク (FR1) ;
- (b) 配列番号130または138のいずれかに少なくとも90%の同一性を有する配列を含む第2のフレームワーク (FR2) ;
- (c) 配列番号131、143、147、または151のいずれかに少なくとも90%の同一性を有する配列を含む第3のフレームワーク (FR3) ; および
- (d) 配列番号132または136のいずれかに少なくとも90%の同一性を有する配列を含む第4のフレームワーク (FR4)

を含む、薬物。

【請求項 6】

請求項1または2のいずれかに記載の薬物であって、ヒト化抗体またはその断片の軽鎖がさらに、

- (a) 配列番号82または94の配列を含む第1のフレームワーク (FR1) ;
- (b) 配列番号83、91、または123の配列を含む第2のフレームワーク (FR2) ;
- (c) 配列番号84、104、108、116、または120の配列を含む第3のフレームワーク (FR3) ; および、
- (d) 配列番号85、89、または97の配列を含む第4のフレームワーク (FR4)

を含み、ならびに

ヒト化抗体、キメラ抗体、またはその断片の重鎖が

- (a) 配列番号129、133、153、157、161、169、173、177、または181の配列を含む第1のフレームワーク (FR1) ;
- (b) 配列番号130または138の配列を含む第2のフレームワーク (FR2) ;
- (c) 配列番号131、143、147、または151の配列を含む第3のフレームワーク (FR3) ;

および

10

20

30

40

50

(d) 配列番号132または136の配列を含む第4のフレームワーク (FR4) を含む、薬物。

【請求項 7】

請求項 5 に記載の薬物であって、前記抗体の軽鎖可変領域の第1のフレームワーク (FR1) が、配列番号82と比較して、Q11がLへ、L15がVへ、E17がDへ、およびS18がRへのアミノ酸変化を1つ以上含む、薬物。

【請求項 8】

請求項 5 に記載の薬物であって、前記抗体の軽鎖可変領域の第2のフレームワーク (FR2) が、配列番号83と比較して、Q3がLへ、およびK8がQへのアミノ酸変化を1つ以上含む、薬物。

10

【請求項 9】

請求項 5 に記載の薬物であって、前記抗体の軽鎖可変領域の第3のフレームワーク (FR3) が、配列番号84と比較して、K14がDへ、K18がTへ、A24がPへ、V28がAへ、およびN29がTへのアミノ酸変化を1つ以上含む、薬物。

【請求項 10】

請求項 5 に記載の薬物であって、前記抗体の軽鎖可変領域の第4のフレームワーク (FR4) が、配列番号85と比較して、A3がQへ、およびL9がIへのアミノ酸変化を1つ以上含む、薬物。

【請求項 11】

請求項 5 に記載の薬物であって、前記抗体の重鎖可変領域の第1のフレームワーク (FR1) が、配列番号129と比較して、E1がQへ、Q5がVへ、P9がGへ、L11がVへ、V12がKへ、Q19がRへ、およびT24 が Aへのアミノ酸変化を1つ以上含む、薬物。

20

【請求項 12】

請求項 5 に記載の薬物であって、前記抗体の重鎖可変領域の第2のフレームワーク (FR2) が、配列番号130と比較して、H6がPへ、およびS9がGへのアミノ酸変化を1つ以上含む、薬物。

【請求項 13】

請求項 5 に記載の薬物であって、前記抗体の重鎖可変領域の第3のフレームワーク (FR3) が、配列番号131と比較して、S10がTへ、T11がSへ、F14がYへ、H16がEへ、N18がSへ、T21がRへ、D23がEへ、およびS25がTへのアミノ酸変化を1つ以上含む、薬物。

30

【請求項 14】

請求項 5 に記載の薬物であって、前記抗体の重鎖可変領域の第4のフレームワーク (FR4) が、配列番号132と比較して、L7がVへのアミノ酸変化を含む、薬剤。

【請求項 15】

請求項 2 に記載の薬物であって、前記抗体がさらに、(i)前記軽鎖上に、それぞれ配列番号110乃至113を含むフレームワークFR1、FR2、FR3、およびFR4を含み、ならびに(ii)前記重鎖上にそれぞれ配列番号161乃至164を含むフレームワークFR1、FR2、FR3、およびFR4を含む、薬物。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の薬物であって、さらに、配列番号191の軽鎖の定常領域、および配列番号192の重鎖の定常領域を含む、薬物。

40

【請求項 17】

請求項 15 に記載の薬物であって、さらに、配列番号193の軽鎖の定常領域、および配列番号194の重鎖の定常領域を含む、薬物。

【請求項 18】

請求項 1、2、または3のいずれかに記載の薬物であって、前記抗体がさらに、IgG1またはIgG4イソタイプを有する定常領域を含む、薬物。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の薬物であって、前記の軽鎖の定常領域が配列番号191を含み、前記の重鎖の定常領域が配列番号192を含む、薬物。

50

【請求項 2 0】

請求項 1 8 に記載の薬物であって、前記の軽鎖の定常領域が配列番号193を含み、前記の重鎖の定常領域が配列番号194を含む、薬物。

【請求項 2 1】

請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の薬物であって、前記断片が、Fab、Fab'、またはF(ab')₂断片である、薬物。

【請求項 2 2】

請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の薬物であって、前記抗体または断片が、単鎖免疫グロブリンである、薬物。

【請求項 2 3】

請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の薬物であって、前記抗体がモノクローナル抗体である、薬物。

【請求項 2 4】

請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の薬物であって、前記哺乳類が霊長類である、薬物。

【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載の薬物であって、前記霊長類がヒトである、薬物。

【請求項 2 6】

請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の薬物であって、その投与から少なくとも5時間後に前記哺乳類においてIL-6、IL-8、IL-1、TNF- またはTNFR値が低下する、薬物。

【請求項 2 7】

請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の薬物であって、前記薬物に含まれる前記抗体または断片の量が血小板沈着を少なくとも50%阻害するのに十分な、薬物。

【請求項 2 8】

請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の薬物であって、前記薬物に含まれる抗体または断片の量が、哺乳類の体重1kgにつき0.01乃至25mgである、薬物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本願発明は血液凝固の望ましくない活性化に関連する障害を予防または治療するための組成物および方法の特徴とする。ある例では、前記凝固は特定の炎症性疾患および関連する障害に關与する。ある局面では、本願発明は、組織因子(TF)に特異的に結合するキメラ抗体またはヒト化抗体を治療上有効な量投与することによってそのような障害を治療するための方法を提供する。本願発明には、敗血症および関節炎を含む炎症の予防または治療への利用を含む、幅広い重要な用途がある。

【0002】

発明の背景

凝固および炎症の間の関係性については、認識が高まっている。たとえば、ある凝固因子は炎症誘発性細胞を活性化させると考えられている。その一方で、ある炎症誘発性サイトカインがTF発現を誘発し、凝固因子を産生すると報告されている。ある種の霊長類における研究では、ある抗凝固因子が炎症を減少することを証明することによって、前記の関連性の存在を支持している。たとえば、F. B. Taylor Jr. et al., J. Clin. Invest. 79:918-925 (1987); M. Levi et al., J. Clin. Invest. 93:114-120 (1994); and M. C. Minnema et al., Blood 95:1117-23 (2000)を参照。

【0003】

血液凝固についてはたくさんの報告が行われている。たとえば、トロンピンは、凝固と炎症の関係性を提供すると考えられる血液タンパク質である。ほとんどのトロンピンは、TFが凝固カスケードを誘発することによって産生される。その他の主要な凝固因子には、第VIIa因子および第Xa因子が含まれる。トロンピンは凝固誘発因子、抗凝固因子、炎症および分裂促進応答において数多くの役割を占めていると考えられている。一般論はL. Sty

10

20

30

40

50

er, Biochemistry, 3rd

Ed, W.H. Freeman Co., New York; およびThe Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed., McGraw-Hill Inc., New York

に掲載のA.G. Gilman et al.を参照。

【 0 0 0 4 】

ある感染性因子はTFが誘発する凝固カスケードを阻害すると考えられている。幸い、凝固カスケードの局所的な活性化はその阻害を抑制することが多い。しかし、異常なTF発現が重篤で致命的になりかねない血栓性障害を引き起こすことがある。たとえば、細菌によるTF発現の誘発は、敗血症、播種性血管内凝固症候群(DIC)、広汎性フィブリン沈着、およびその他の合併症を引き起こすことがあると示唆されてきた。TF発現の増加は、これら障害の進行を促進するために重要な因子と考えられる。炎症性障害の進行の例には、急性肺損傷(ALI)から急性呼吸窮迫症候群(ARDS)への進行、そしてその後、腎臓などさらなる組織系に關与する損傷へ進行し、より重篤な敗血症への進行する過程である。たとえばWelty-Wolf, K. et al. Am. J.

10

Respir. Crit. Care Med. 164:1988 (2001)などを参照。

【 0 0 0 5 】

敗血症などの凝固に關連する障害を理解しようとする試みが行われている。

【 0 0 0 6 】

たとえば、敗血症という用語は、感染症、外傷、またはその両方に対する宿主免疫応答によって促進される臨床症状のスペクトラムを特徴付けるために用いられてきた。敗血症は、血液凝固、フィブリン溶解、および炎症の制御できないカスケードとして特徴付けられてきた。このカスケードのあるステップでは、自己増幅プロセスが凝固異常、望ましくない炎症、および内皮損傷の加速に關与する。前記増幅プロセスは、炎症性サイトカインが内皮細胞および単球などの細胞上でのTF発現を上方調節した結果生じ、その結果凝固カスケードの高い活性化が生じて、PARレセプタの活性化および炎症性サイトカインの産生

20

の上方調節が生じる。Osterud, B. et al., Thrombosis

Hemost. 83:861 (2000); Mechtcheriakova, D. et al., FASEB J. 15:230 (2001);

Shen, B.-Q. et al., J. Biol. Chem. 276:5281 (2001)を参照。

【 0 0 0 7 】

より具体的には、敗血症は、炎症および血液凝固の全身的な活性化によって特徴付けられてきた。フィブリン溶解は抑制することができる。たとえばDICおよび微小血管血栓症を促進すると考えられる止血の不均衡を指摘する研究もある。これらおよび關連する徴候が、正常な組織機能に影響を与え、死を引き起こす場合もあると考えられている。

30

【 0 0 0 8 】

さらに、敗血症および關連する障害は患者の病院および外来への接触と關連している。したがって、これらの障害の管理は、多くの健康行政官、医師および保険会社の第一の關心事である。

【 0 0 0 9 】

望ましくない血液凝固の活性化が特定の炎症性疾患の主要な特徴であるという報告がある。たとえば、血管外フィブリン沈着が、関節リウマチ(RA)、糸球体腎炎、多発性硬化症、乾癬、シェーグレン症候群、および炎症性腸疾患の患者の自己免疫病変において発見されている。Weinberg, et al., Arthritis

40

Rheum. 34:996-1005 (1991); Wakefield, et al., J Clin Pathol 47:129-133

(1994); Schoph, et al., Arch Dermatol Res 285:305-309 (1993); Zeher,

et al., Clin Immunol Immunopathol 71:149-155 (1994); More, et

al., J Clin Pathol 46:703-708 (1993)を参照。

【 0 0 1 0 】

さらに、高TF値は全身性紅斑性狼瘡に關連すると考えられている。Segal, et al., J Rheumatol 27:2827-2832 (2000)を参照。さらにNakano, et al., Clin Exp Rheumatol 17: 161-170

50

(1999); Morris, et al., *Ann Rheum Dis* 53:72-79 (1994);
 Furmaniak-Kazmierczak, et al., *J Clin Invest* 94:472-480 (1994);
 Bokarewa, et al., *Inflamm Res* 51:471-477 (2002)を参照。

【 0 0 1 1 】

ある炎症性の症状を、血栓症を阻害することによって治療することができるかもしれないと示唆されている。Gordon et al., *The New England Journal of Medicine* 344:699-709, 759-762 (2001)を参照。ある抗TF抗体が、ある種の炎症を減少させるのにある程度役立っていると報告されている。Levi, M. et al., 同上を参照。

【 0 0 1 2 】

血液凝固因子に結合する抗体をつくる研究が行われている。

10

【 0 0 1 3 】

たとえば、Wong, H. et al.による米国特許第5,986,065号および6,555,319号およびPCT/US98/04644 (WO 98/40408)は、さまざまなそのような抗体を開示している。具体的には、組織因子(TF)への有意な結合親和性および特異性を有するマウス抗体、キメラ抗体誘導体、およびその断片が提供される。キメラ抗原結合分子を使用すると、ヒト患者の望ましくない免疫応答のリスクを低減させると考えられている。S.L. Morrison and V. Oi, *Adv. Immunol.* 44:65 (1989) (ヒト-マウスキメラ抗体の作製方法を報告)も参照。

【 0 0 1 4 】

免疫学的によりヒトに認容性のある抗体を作製するために、さまざまなアプローチが用いられてきた。組換えDNA技術を用いるものもある。たとえば、ある戦略では、非ヒト抗体をクローニングして修飾し、よりヒト抗体によく似たものを作製する。総じて、そのような抗体は「ヒト化」といわれる。Studnicka et al.の米国特許第5,766,886号、Queen et al.の第5,693,762号、Waldeman et al.の第5,985,279号、Winterの第5,225,539号、Pedersen et al.の第5,639,641号、およびヒト化抗体の作製および使用の方法についての本願明細書に引用された参考文献を参照。

20

【 0 0 1 5 】

ヒト化抗体の作製のためのさらなる戦略も報告されている。E. Padlan *Mol. Immunol.* 28:489 (1991); Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Junghans et al., 同上、および Roguska, et al., *PNAS (USA)* 91:969 (1994)を参照。さらに、公開済み米国特許出願第2003/0109860 A1 および2003/0082636も参照のこと。

30

【 0 0 1 6 】

従前の抗体が、血液凝固の望ましくない活性化を阻害するまたは減少させるのに十分なほど堅牢であるかどうかは明らかではない。より具体的には、そのような抗体が敗血症および関節炎などの炎症性疾患を予防または治療するのに十分なほど協力かどうかは明らかではない。

【 0 0 1 7 】

発明の概要

本願発明は血液凝固の望ましくない活性化に関連する障害の予防および治療のための組成物および方法を特徴とする。ある局面では、本願発明は、組織因子(TF)に特異的に結合するキメラ抗体またはヒト化抗体を治療上有効な量投与することによってそのような障害を予防または治療するための方法を提供する。本願発明には、敗血症および関節炎を含む炎症の予防または治療への利用を含む、幅広い重要な用途がある。

40

【 0 0 1 8 】

本願発明者らは、未変性ヒトTFに支配的なエピトープに特異的に結合する抗体および抗原結合断片が、血液凝固の望ましくない活性化に関連する障害を予防または治療するのに好適であることを発見している。好適な抗体および断片は未変性ヒトTFに特異的に結合し、実質的に非未変性または変性TFには結合しない。本願発明での使用に好適なより詳細な抗体および断片は、ヒトTFに結合するので、第X因子(FX)、および第IX因子(FIX)の少

50

なくとも1つがTF-第VIIa因子複合体に有効に結合しない。さらなる好ましい抗体および断片は、一般的に、FXのTF分子への結合およびアクセスの獲得を低減または阻害することによって、TF機能を低減または遮断する。本願発明への使用に好適なさらなる好ましい抗体および断片は、TFおよび第VIIa因子の間の相互作用もしくは結合を有意に阻害もしくは遮断しないか、またはFXまたはFIX以外の物質に対してTF-第VIIa因子複合体の活性を阻害もしくは遮断しない。

【0019】

上述のように、血液凝固の望ましくない活性化が敗血症およびさまざまな特異的炎症性疾患の原因になっていると考えられている。より具体的には、多くの場合、望ましくないTF媒介凝固はそのような障害を開始および/または長引かせると考えられている。したがって、本願発明の目的は、すべてではないがたくさんのTF関連機能を低減または不活化させるために、TFに特異的に結合する抗体およびその断片を提供することである。そのような機能には、FIXおよびFXのうち少なくとも一つのTF複合体への結合を遮断または阻害することが、それらに限定されずに含まれる。理論に束縛されることを望むことなく、これらの因子の少なくとも一つとTF複合体の結合を遮断または阻害することによって、不必要な血液凝固の活性化は低減できるか、またはある場合には除去することができる。本願発明にしたがってそのような不必要なプロセスを遮断または阻害することによって、敗血症および特定の炎症性疾患に関連する症状を予防、治療または緩和することが可能になると考えられる。

【0020】

好ましくは、そのような抗体およびその断片はキメラまたはヒト化されたものであり、一般に、霊長類、特に治療を要するヒト患者への使用に好適である。

【0021】

敗血症および関連する症状は、感染、外傷、またはその両方に対する、強力で致命的でもありうる免疫応答の結果生じると認識されている。典型的には、血管系全体の血液は凝固しやすく、炎症、播種性血管内凝固症候群(DIC)、凝固、および組織障害などの合併症を生じる。症状を迅速に治療しなければ、数時間以内に死に至る可能性もある。本願発明の前には、敗血症および関連する症状を予防または治療のために十分強固な抗TF抗体またはTF結合断片があるのかどうかはわからなかった。

【0022】

しかし、本願明細書に記載の抗TF結合抗体は、凝固カスケードの不必要な活性化を阻害または遮断するのに十分強固である(つまり、ヒトTFに十分特異的に結合し、および適切な結合活性を有している)ことが明らかになっている。そのような活性化は有益であり、敗血症および関連する症状を予防または治療するために使用することができることも明らかにしている。後述の通り、本願発明者らは、そのような抗体および断片が、ヒト敗血症のin vivo動物モデルにおいて、炎症、播種性血管内凝固症候群(DIC)、凝固、組織障害、および関連する症状の好調な減弱を示すことを発見している。

【0023】

さらに、血液凝固カスケードのそのように強力な遮断または阻害は、特定の炎症性疾患の予防または治療に高度に有用であるということも明らかになっている。理論に束縛されることを望むことなく、本願発明を血液凝固の望ましくない活性化を遮断または阻害するために用いることによって、前記炎症性疾患の一つまたは組み合わせに関連する症状を予防、治療、または緩和することが可能であると考えられている。重要なことに、本願明細書に記載の抗TF結合抗体は、前記凝固カスケードの不必要な活性化を阻害または遮断し、関節炎およびその他の炎症性疾患に関連する症状を予防、治療、または緩和する一助となるのに十分強固であることが明らかになっている。

【0024】

したがって、およびある局面では、本願発明は哺乳類における敗血症および炎症性疾患のうちの少なくとも一つを予防または治療するための方法を提供する。ある実施態様では、前記方法には、ヒトTFに特異的に結合して複合体を形成するヒト化抗体、キメラ抗体、

10

20

30

40

50

またはその断片のうちの少なくとも1つを治療上有効な量、前記哺乳類に投与するステップが含まれる。より好ましい抗体は、前記複合体に結合するFXおよびFIXのうちの少なくとも1つを低減または遮断する。前記方法の実施には、敗血症および、限定はしないが関節リウマチ(RA)を含む炎症性疾患に関連する症状の重篤性を予防、治療、または低減するために高度に有用である。

【0025】

本願発明はその他の重要な使用および利点を提供する。

【0026】

たとえば、本願発明者らは、好ましいヒト化抗体、キメラ抗体およびその断片が、FXおよびFIXのうちの少なくとも1つのTF-FXIIa複合体への結合を望ましく遮断するという10
ことを発見した。好ましくは、そのような抗体および断片も、前記複合体によるFXまたはFIXの活性化を阻害または遮断する。驚くことに、そのような抗体は、本願明細書に提供されるヒト敗血症のin vivo動物でテストすると、敗血症および関連する複合体の症状を予防、治療または軽減するのに十分強固である。さらに驚くことに、そのような好ましい抗体および断片は、特定の炎症性疾患に関連する症状を予防、治療、または軽減するのに十分強固である。重要なことに、本願発明の好ましい使用は、これらの徴候に関連した症状を予防、治療、または緩和するために利用することができるヒトTF分子上の特定の免疫学的標的(エピトープ)を同定し、利用する。

【0027】

本願発明には柔軟性があり、敗血症および感染性疾患が疑われるまたは優位を占めるさまざまな背景において使用することができる。20

【0028】

たとえば、およびある実施態様では、本願発明は敗血症が主要な健康問題となってきた病院、診療所、およびその他の医療背景において使用することができる。特に問題なのは抗生物質耐性微生物の発生だった。そのような微生物は、たとえば血中に存在すると、敗血症ショックおよび関連する合併症を迅速に引き起こす可能性のある細菌などである。本願発明の実施を実施することによって、敗血症または関連する症状を食い止めている間に、介護者が適切な治療プロトコルを特定するか、または、おそらく、敗血症の影響を保留することができる。したがって、本願発明の目的は、敗血症予防または治療の方法であって、本願明細書に開示された抗体および断片の投与を1つ以上の抗生物質の投与と組み合わせることも可能な方法を提供することである。30

【0029】

本願発明は、さらに救急医療の背景(たとえば救急車、戦場など)においても使用される。その場合、本願明細書に記載の予防および治療の方法は介護の時点で施すことができる。したがって、ある発明の実施態様では、患者を評価および治療のために病院または診療所へ輸送している間、敗血症または敗血症に関連する症状をある程度の管理下におくことができる。

【0030】

他の発明の実施態様では、本願発明を用いて、関節炎および特に関節リウマチに関連する症状を予防、治療、または低減することができる。たとえば、血液凝固の不必要な活性化を遮断または低減することによって、現在、疼痛性の炎症、病理学的組織破壊、および関節炎および関連する炎症性疾患に典型的に関連するリモデリングを低減することが可能である。40

【0031】

別の局面では、本願発明は、本願発明の方法を実施するためのキットを提供する。ある実施態様では、このキットには少なくとも1つの本願明細書に提供されるヒト化抗体、キメラ抗体、またはその断片が含まれる。

【0032】

さらに、本願発明は哺乳類におけるサイトカイン産生を減少させる方法も提供する。ある実施態様では、前記方法には、組織因子(TF)に特異的に結合して複合体を形成する、50

少なくとも1つのヒト化抗体、キメラ抗体、またはその断片を治療上有効な量、前記哺乳類に投与するステップが含まれる。好ましくは、第X因子、または第IX因子の前記複合体への結合を阻害し、前記投与が前記哺乳類におけるサイトカイン産生を低減させるのに十分である。好ましいヒト化抗体、キメラ抗体およびその断片は、前述、および後述の考察および実施例に開示する。

【0033】

本願発明によってさらに提供されるのは、哺乳類における敗血症関連症状の予防または治療のための方法である。ある実施態様では、前記方法には、組織因子(TF)に特異的に結合して複合体を形成する、少なくとも1つのヒト化抗体、キメラ抗体、またはその断片を治療上有効な量、前記哺乳類に投与するステップが含まれる。好ましい抗体および断片は本願明細書に開示されており、第X因子、または第IX因子の前記複合体への結合を阻害するものが含まれる。好ましくは、投与は前記哺乳類における症状を予防または治療するのに十分である。

10

【0034】

本願発明はさらに、哺乳類における敗血症誘発性貧血の予防または治療の方法を提供する。ある実施態様では、前記方法には、組織因子(TF)に特異的に結合して複合体を形成する、少なくとも1つのヒト化抗体、キメラ抗体、またはその断片を治療上有効な量、前記哺乳類に投与するステップが含まれる。好ましい抗体および断片は本願明細書に開示されており、第X因子、または第IX因子の前記複合体への結合を阻害するものが含まれる。好ましくは、投与は前記哺乳類における症状を予防または治療するのに十分である。本願発明のその他の局面については後述する。

20

【0035】

発明の詳細な説明

上述の通り、本願発明は敗血症または関節炎などの炎症性疾患に関連する症状を予防、治療、または緩和するための方法を提供する。前記方法の実施には、これらの疾患および関連する症状を予防または治療するために、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはヒト化TF結合断片の少なくとも一つを治療上有効な量、そのような治療を要する哺乳類に投与するステップが関与する。

【0036】

敗血症および敗血症に関連する症状の病因論を理解するための研究が行われている。たとえば、敗血症カスケードにおける初期のイベントは宿主の免疫応答によって引き起こされ、したがって血管内皮への破壊的な作用を促進すると認識されている。内皮細胞下の構造が露出し、コラゲナーゼが遊離する。組織因子(TF)を発現する内皮細胞が露出し、凝固カスケードの活性化の外因性経路が惹起され、トロンビン産生が加速される。同時に、内皮損傷によってさらに炎症が悪化し、その結果、好中球の活性化、好中球-内皮細胞接着、およびさらなる炎症性サイトカインの生成が生じる。これらの炎症プロセスはさらに血管内皮機能不全を助長する。タンパク質Cおよび抗トロンビンIII(AT III)などの止血の内因性モジュレータが消費され、体が正常に機能する状態に戻ろうとするに当たって、その量が不足するようになる。正常な条件下において、内皮表面タンパク質トロンボモジュリンおよび内皮タンパク質Cレセプタ(EPCR)はタンパク質Cおよびその調節作用を活性化させる。敗血症の場合、内皮損傷がトロンボモジュリンおよびEPCRのこの機能を障害し、制御の喪失に関与する。対策を施さないと内皮損傷が蓄積する。この制御されない炎症および凝固のカスケードが敗血症の進行を促進し、その結果、多数の患者に低酸素症、広汎性虚血症、および組織機能障害を引き起こし、最終的には死に至る。

30

40

【0037】

「敗血症関連症状」という用語は、播種性血管内凝固症候群(DIC)、フィブリン沈着、血栓症、および急性肺損傷(ALI)、または急性呼吸窮迫症候群(ARDS)を含む肺損傷を、それらに限定されることなく含む敗血症に先行する、随伴する、または後続することが知られる症状を意味する。本願発明を使用することによって予防または治療できるある種の肺損傷は、敗血症誘発急性肺損傷である。たとえば、Welty-Wolf, K. et al. Am. J.

50

Respir. Crit. Care Med. 164:1988 (2001)を参照。さらに、急性腎尿細管壊死 (ACN) および関連する症状などの敗血症に付随するある腎障害も包含される。

【 0 0 3 8 】

急性肺損傷 (ALI) および急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) は注目を集め続ける重篤な障害である。特に、ALIおよびARDSの重要な特徴は、外因性凝固の局所的活性化およびフィブリン溶解の阻害である。損傷が発展するにしたがって、これらのかく乱が、肺の微小血管、間質内、および肺胞の空間にフィブリンが沈着し、毛細血管閉塞および硝子質膜形成を引き起こすことが報告されている。外来性凝固経路の要素 (たとえば組織因子 (TF)、トロンピン、およびフィブリンなど) は、炎症性細胞輸送における変化のシグナルを伝達し、血管透過性を上昇させる。さらに、凝固促進因子およびフィブリンは、補体の活性化、炎症促進性サイトカインの産生、フィブリン溶解の阻害、および損傷した肺のリモデリングを含む損傷におけるその他の主要なイベントを促進すると考えられている。理論に束縛されることを望むことなく、肺におけるこれらの開始イベント (外因性凝固) および下流作用 (炎症促進性イベント) を低減または遮断することによって、障害されたフィブリンのターンオーバーを低減または遮断することができ、ALI/ARDSの重篤な構造的および機能的損傷の発展を低減または回避することができる。いくつかの時点において、TF-第VIIa (TF-FVIIa) 複合体を凝固の遮断の標的にすることができるが、炎症におけるこれらの様々な戦略の作用と肺損傷の発展は、まだ確認されているところである。実施例では、ヒトTF (cH36) に対するキメラ化モノクローナル抗体とそのFab断片 (cH36-Fab) の、グラム陰性敗血症の開始の遮断への使用を示し、急性肺損傷を予防する。

10

20

【 0 0 3 9 】

ある実施態様では、本願発明は、血液凝固カスケードの主要成分の活性 (すなわちTF) を減少または遮断することによって敗血症および敗血症関連症状 (DIC、ALI、およびARDS) を予防または治療することを意図する。好ましいヒト化抗体、キメラ抗体、およびその断片は、典型的にはヒトTFに特異的に結合し、FXまたは第IX因子のうちの少なくとも1つのTF複合体への結合を遮断する。典型的には、そのような好ましい抗体および断片が、その複合体のFXまたはFIX活性化をも阻害または遮断する。したがって、本願発明の組成物および方法は、腫瘍分子成分の活性を低下させるまたは妨げることによって血液凝固カスケードの不必要な活性化を減少または遮断する。

【 0 0 4 0 】

そのような好ましい抗体は、O'Brien et al.の米国特許第6,274,142 (" '142' ") によって提供された抗体などの従来の抗体とは異なる。たとえば、'142特許は、第VII/VIIa因子に結合できないかまたは第IXまたはX因子のタンパク質分解に作用しないTF中和抗体を報告している。反対に、本願発明の好ましい抗体は、FXまたはFIXのうちの少なくとも1つのTF複合体への結合を実質的に減少または遮断する。PCT/US01/07501 (WO 01/0984)も参照。

30

【 0 0 4 1 】

前述したとおり、不必要な凝固活性化は、ある炎症性疾患、特に自己免疫に関連する疾患の顕著な特徴である。Weinberg, et al., Arthritis Rheum. 34:996-1005 (1991); Kincaid-Smith, Kidney Int 7:242-253 (1975); Wakefield, et al., J Clin Pathol 47:129-133 (1994); Schoph, et al., Arch Dermatol Res 285:305-309 (1993); Zeher, et al., Clin Immunol Immunopathol 71:149-155 (1994); More, et al., J Clin Pathol 46:703-708 (1993)を参照。全身性紅斑性狼瘡における疾患活性に関連して、高TF値が報告されている。Segal, et al., J Rheumatol 27:2827-2832 (2000)を参照。したがって、組織因子媒介凝固の制御を促進し、炎症、病理学的組織崩壊、および多くの炎症性疾患の特徴である望ましくないリモデリングを減少させる、またはある場合には遮断することは、本願発明の目的である。

40

【 0 0 4 2 】

複数の形態を含む「炎症性疾患」という用語は、凝固の不必要なTF媒介活性化に関連する病理学的症状を意味する。好ましい炎症性疾患は、通常、既知の、または疑われる自己

50

免疫症状に関連する。典型的にはそのような疾患はさらに、標準的な方法によって決定された炎症促進性サイトカインおよび/またはケモカインの大量産生に関連する。そのようなサイトカインの例には、IL-1、TNF、GM-CSF、M-CSF、IL-6、LIF、IL-15、INF、およびIL12が含まれる。そのようなケモカインの例には、IL-8、MIP-1、MIP-1、MCP-1、ENA-78およびRANTESが含まれる。典型的であって限定的ではないが、1つ以上の血管新生および血管外フィブリン沈着は炎症性疾患に関連する。本願発明にしたがった炎症性疾患のより具体的な例には、関節炎、好ましくは関節リウマチ(RA)、糸球体腎炎、多発性硬化症、乾癬、シェーグレン症候群、および炎症性腸疾患が含まれる。関節炎は、滑膜炎、パンヌス形成、および軟骨破壊の存在を含む特徴の1つまたは組み合わせによって容易に検出できる。

10

【0043】

本願発明の好ましい使用は、典型的にはTF媒介凝固活性化を低下させることによって、炎症性疾患の症状を減少、予防または緩和を促進するだろう。TFによるそのような活性化には、炎症生分子産生のサポート、炎症促進生細胞活性の増加、組織破壊の増加、不必要なリモデリングの増加、および血管新生の増強を、それらに限定せずに含む、数多くのデメリットがあると考えられている。したがって、本願発明は、特にTF機能の結合および阻害のための組成物および方法を提供することによって、炎症性疾患を解決するための新規で基本的な手段を提供する。

【0044】

本願発明の実施は、特に、炎症性自己免疫疾患の予防および治療を支援する。最近の研究が本願発明の概念と一致している。Marty, et al., J Clin Invest 107:631-640 (2001); Varisco, et al., Ann Rheum Dis 59:781-787 (2000); Busso, et al., Arthritis Rheum 48:651-659 (2003)を参照。

20

【0045】

上述のとおり、Wong, H. et al.による米国特許第5,986,065号および6,555,319号およびPCT/US98/04644 (WO 98/40408)は、さまざまなマウス抗TF抗体および優れたTF結合特性を有する断片に結合する抗原を開示している。本願発明にしたがって、そのような抗体および断片を用いることができる。さらに、そのような抗体および断片を用いて、たとえば関連する齧歯類モデルにおいて、実験的に誘発させた敗血症を治療することができる。しかし、あとで理解されるであろう通り、通常、そのようなマウス抗体および断片は、霊長類などのその他の哺乳類および特にヒト被験者に使用するのには適切ではない。さらに好適な抗体および断片は米国特許出願公報第20030082636; WO 03/037911およびWO 98/40408に開示されている。

30

【0046】

「抗原結合断片」という用語は、抗原に特異的に結合する抗体の少なくとも一部分を意味する。そのような断片の例には、抗体V領域が含まれる。好適なV領域結合パートナーの例には、C領域および許容可能なその断片が含まれる。さらなる好適な断片には、V領域の合計分子量が、適切なサイズのマーカー断片を用いたSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法もしくはサイズ排除クロマトグラフィ、質量分光法、またはアミノ酸配列解析を含む各種の標準的な方法によって決定された、約15キロダルトン乃至約40キロダルトン、好ましくは約20キロダルトン乃至約30キロダルトン、より好ましくは約25キロダルトンであるV領域の部分が含まれる。さらに特異的な抗原結合断片には、Fab、F(v)、Fab'、F(ab')₂および抗体V領域を含む特定の1本鎖作製物が含まれる。

40

【0047】

さらなる好適な抗原結合断片には、抗原結合V領域単体、もしくは同族定常(C)領域の少なくとも一部分、またはその断片が含まれる(「同族」は、同一の免疫グロブリン重(H)鎖または軽(L)鎖の2成分の間の関連性を示すために用いる)。典型的なC領域断片は、適切なサイズのマーカー断片を用いたSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法もしくはサイズ排除クロマトグラフィ、質量分光法、またはアミノ酸配列解析を含む各種の標準的

50

な方法によって決定された、約5キロダルトン乃至約50キロダルトン、より好ましくは約10キロダルトン乃至40キロダルトンの分子量を有する。さらなる好適な抗原結合断片は、以下に、またはWong, H. et al.による米国特許第5,986,065号および6,555,319号およびPCT/US98/04644

(WO 98/40408)に開示されている。さらに、米国特許出願第20030082636号、ならびに国際出願WO

03/037911およびWO98/40408も参照。

【 0 0 4 8 】

これも上述のとおり、ヒト患者などの霊長類宿主によるいかなる免疫拒絶反応の可能性をも最小化するための1つのアプローチは、キメラ抗体の作製である。「キメラ抗体」という用語または複数の形態を含む関連する用語は、本願明細書に開示されるとおり、軽鎖および重鎖遺伝子を、典型的には、異なる種であって、通常は霊長類および好ましくはヒトである異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから遺伝子操作で作製することによって作製された抗体を意味する。たとえば、H36などのマウス抗体の遺伝子の可変領域を、₁、₂、₃、または₄などのヒト定常(C)領域に結合させてもよい。したがって、典型的な治療用キメラ抗体は、マウス抗体のV領域または抗原結合領域、およびヒト抗体のC領域またはエフェクタ領域からなるハイブリッドタンパク質であるが、他の哺乳類が用いられてもよい。本願発明に用いるための特に好ましいキメラ抗体は以下の実施例に開示する抗組織因子抗体cH36である。

【 0 0 4 9 】

本願発明に用いるのに好適なキメラ抗体は、既知の戦略の1つまたは組み合わせによって作製することができる。米国特許第5,986,065号および6,555,319号およびPCT/US98/04644

(WO 98/40408)に開示されているとおり、有用性の高いマウス抗TF抗体は、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ACCT, 10801 University Boulevard, VA 20110)を含むさまざまな供給源から容易に入手することができる。代替的には、好適な抗体は、たとえば米国特許第5,986,065号および6,555,319号に開示される手順に従って、新たに(必要に応じてポリクローナルまたはモノクローナル)作製することができる。

【 0 0 5 0 】

さらに、米国特許出願第20030082636号、ならびに国際出願WO 03/037911およびWO98/40408も参照。

【 0 0 5 1 】

ATCC H36に預託された抗体は、本願明細書ではH36とよぶ。またH36.D2およびH36.D2.B7ともよぶ。H36と命名された抗体は、母親クローンによって産生された抗体で、H36.D2は第1クローンから、H36.D2.B7は第2クローンから得られたものである。抗体のTFまたはその他の物理的な特性を阻害する能力に関して、これら3種類のクローンによって産生された抗体には、差は認められなかった。一般的な用途では、これらのクローンまたはH36は、前記抗体を産生する関連細胞株のいずれかによって産生された抗TF抗体を示すために用いられることが多い。H36のマウス-ヒトキメラはcH36と(およびSunol-cH36とも)よぶ。H36抗体についてのより詳細な情報は、米国特許第5,986,065号およびPCT/US98/04644 (WO 98/40408)も参照。

【 0 0 5 2 】

好ましいキメラ抗体は、H36などの好適な抗体のマウス可変領域と、ヒト定常領域を組み合わせる。その操作は通常、標準的な核酸組換え技術によって行われる。各種のそのようなキメラ抗体は、たとえば、可変領域、特に抗原結合領域の保存領域の部分がヒト由来であって、高頻度可変領域は非ヒト由来である、ヒト可変領域キメラの産生を含むステップによって調製することができる。Morrison, Science, 229:1202-1207

(1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Teng et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:7308-7312 (1983); Kozobor et al., Immunology

Today 4:72-79 (1983); Olsson et al., Meth. Enzymol. 92:3-16 (1983); 米国特許第5,

10

20

30

40

50

986,065号およびPCT/US98/04644 (WO 98/40408)を参照。

【0053】

H36可変領域および定常領域をコードする核酸は、たとえば米国特許第5,986,065号およびPCT/US98/04644 (WO 98/40408)に開示されている。さらに、米国特許出願第2003008263号、ならびに国際出願WO 03/037911およびWO98/40408も参照。

【0054】

ある実施態様では、抗TFキメラ抗体にはヒト軽鎖定常(C)領域、つまりC₁、C₂、またはその断片が含まれるだろう。ヒト化軽鎖断片は、約80乃至約250アミノ酸、好ましくは約95乃至約235アミノ酸、より好ましくは約104乃至約225アミノ酸のアミノ酸長を有することが多いだろう。ヒト化軽鎖フラグメントのサイズは、適切なサイズのマーカー断片を用いたSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法もしくはサイズ排除クロマトグラフィ、質量分光法、またはアミノ酸配列解析を含む各種の標準的な方法によって決定することができる。

10

【0055】

典型的には、本願方法に用いるためのキメラ抗体にはさらに、約80乃至約250アミノ酸、好ましくは約95乃至約235アミノ酸、より好ましくは約104乃至約225アミノ酸のアミノ酸長を有するヒト重鎖可変(V)領域が含まれ、その長さは、例えば適切なサイズのマーカー断片を用いたSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法もしくはサイズ排除クロマトグラフィ、質量分光法、またはアミノ酸配列解析を含む各種の標準的な方法によって決定される。

20

【0056】

好適なヒト軽鎖CおよびV領域をコードする核酸配列が報告されている。たとえば、Kabat et al. in Sequences of Proteins of Immunological Interest Fifth Edition, 米国健康福祉サービス省、米国政府印刷局(1991) NIH 公報第91-3242号およびジェンバンクを参照。国立医学図書館(38A, 8N05, Rockville Pike, Bethesda, MD 20894)の遺伝子配列データベース(ジェンバンク)の国立バイオテクノロジー情報センタ(NCBI)を参照。ジェンバンクについてのより詳細な説明については、Benson, D.A. et al., Nucl. Acids. Res.

25:1 (1997)を参照。

【0057】

本願明細書に報告されたキメラ抗体およびその他の抗体、ならびに断片を作製するために用いる好適な組換え技術は開示されている。一般的にはSambrook et al., in Molecular

30

Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed. 1989)、およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular

Biology, John Wiley & Sons, New York (1989)を参照。

【0058】

抗TF抗体に対する最小の免疫拒絶反応が必要であるいくつかの発明出願には、ヒト化抗体の調製は有用だろう。「ヒト化」という用語は、少なくとも1つのヒトFRサブセット、好ましくは少なくとも2つまたは3つの同、より好ましくは4つのヒトFRサブセット、および非ヒト供給源、通常はラットまたはマウスなどの齧歯類の免疫グロブリンの1つ以上のCDRが含まれる免疫グロブリンを意味する。典型的に好ましい本願発明のヒト化免疫グロブリンには、2つ以上、好ましくは3つのCDRが含まれるだろう。定常領域はある必要はないが、in vivo用として意図されているヒト化抗体の機能を助けるために有用であることは多い。好ましい定常領域が存在するとすると、それはヒト免疫グロブリン定常領域に実質的に同一、つまり、アミノ酸配列に関して少なくとも約90%同一、好ましくは少なくとも約95%以上同一である。したがって、CDRを除く場合もあるかもしれないが、ヒト化免疫グロブリンのほぼすべての部分は、好ましくは、天然のヒト免疫グロブリン配列の相当部分に実質的に同一である。

40

【0059】

50

アミノ酸配列アイデンティティを決定するための方法は、当業では標準であって、目視による検査、およびBLASTおよびFASTA（米国立医学図書館ウェブサイトから入手可能）を用いたコンピュータ支援アプローチが含まれる。ほとんどの実施態様に好ましいマッチングプログラムは、International ImMunoGeneTics（IMGT）データベースのウェブサイトから入手可能であり、この実施態様に好ましいマッチングプログラムはKabatデータベースで入手できるMatchとよばれるプログラムである。Jhonson G, Wu T. “Kabat database and its application: Further directions” *Nucleic Acids Res.* 29:205-206 (2001)を参照。

【0060】

10

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む、抗体を意味する。S.L. Morrison, supra; Oi et al., supra; Teng et al., supra; Kozbor et al., supra; Olsson et al., 同上、および上に引用されたその他の文献を参照。したがって、「ヒト化抗体断片」は、抗体の一部分、好ましくは抗原に特異的に結合する部分を意味する。

【0061】

H36またはcH36抗体は、たとえば米国特許第5,766,886号、5,693,762号、5,985,279号、5,225,539号、EP-A-0239400号、5,985,279号、および5,639,641号、または米国特許出願第20030190705号に記載のアプローチの1つ、または組み合わせによってヒト化することができる。抗体のヒト化についてのさらなる情報は、E. Padlan *Mol. Immunol.* 28:489 (1991); Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Junghans et al., supra; and Roguska, et al. *PNAS (USA)* 91:969 (1994)も参照のこと。

20

【0062】

本願発明に用いるためのあるヒト化抗体およびその断片は、後述の実施例に開示される。

【0063】

ヒトTFに特異的に結合する好ましいキメラ抗体、ヒト化抗体、およびその断片。「特異的な結合」または同様の用語は、本願明細書に開示される分子であって、別の分子に結合して特異的な結合対を形成する分子を意味する。しかし、前記分子は、たとえばウエスタンブロッティング法、ELISA、RIA、移動度シフトアッセイ、酵素免疫アッセイ、競合アッセイ、飽和アッセイまたはその他の当業に知られるタンパク質結合アッセイ等によって決定されたその他の分子を認識せず、または結合しない。一般的に、分子間の特異的結合の検出方法の例は、Sambrook et al. in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989); and Ausubel et al., 同上; および Harlow and Lane in *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) Cold Spring Harbor, New Yorkを参照。

30

【0064】

特に本願発明への使用のために好適なキメラ抗体、ヒト化抗体および断片は、1) 約0.5 nM未満のTFの乖離定数 (Kd)、および2) 約 $10 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 未満のTFの親和定数 (Ka) のうちの、少なくとも1つを特徴とするだろう。そのようなアッセイの実施方法は、当業に知られており、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、酵素免疫アッセイ (EIA)、放射免疫アッセイ (RIA)、およびBIAコア解析が含まれる。

40

【0065】

さらなる好適な抗体は、本願明細書で「標準in vivo敗血性ショックアッセイ」として引用されることがあるアッセイにおいて生存時間を延長するだろう。一般に、そのようなアッセイには、サルに敗血症を引き起こすためにグラム陰性細菌を投与するステップが含まれる。たとえば、Taylor et al. *J Clin. Invest.* 79:918 (1987)参照。より具体的には、ある量の大腸菌 (約 10^{10} CFU/kg) を新たに調製し、たとえ

50

ばヒヒまたはアカゲザルなどの霊長類に1乃至2時間間隔で投与する。対照群には食塩水またはPBS溶液を投与することができる。投与群には、少なくとも1mg/kg、好ましくは約10mg/kgの抗体をボラス投与し、その後約1時間以内に細菌を注入する。その後、対象および投与群のサルを約1週間監視して、生存を確認する。標準in vivo敗血性ショックアッセイについてのより詳細な情報は、以下の実施例参照。

【0066】

本願発明の好ましい方法には、サルの生存時間（時間数または日数）を少なくとも約2倍、好ましくは少なくとも約3倍、より好ましくは少なくとも約5倍乃至10倍、またはそれ以上延長させる、ヒト化抗体、キメラ抗体、または断片を用いる。生存時間の決定は標準in vivo敗血性ショックアッセイによる。

10

【0067】

本願発明への使用のために好適なさらなる抗体は、前記抗体の投与後、少なくとも約5時間後に、対象哺乳類の血漿中のインターロイキン6（IL-6）およびインターロイキン8（IL-8）のうちの少なくとも1つの存在量を減衰（減少）させることができる。IL-6およびIL-8を検出しそれらの血漿中の量を定量する方法は知られており、RIA、EIA、およびELISAなどの免疫学的アプローチが含まれる。

【0068】

あるアプローチでは、敗血症を、サル、および好ましくは前述した系統に沿ったヒヒなどの好適な霊長類に誘発する。対照ヒヒへの接種（約 10^{10} CFU/kgの大腸菌または食塩水）の前に、投与ヒヒには少なくとも1mg/kg、好ましくは約10mg/kgの抗体をボラス投与してから、たとえば前記接種を注入してから約1時間以内に細菌を注入する。ヒヒの生存およびIL-6およびIL-8の血漿濃度を標準の手順で監視する。

20

【0069】

別のアプローチでは、敗血症様の症状を、「初回刺激敗血症モデル」（WeltyWolf, K. et al. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164:1988 (2001)を参照、およびさらに詳細には実施例4に記載）として記述されるモデルを用いて、ヒヒなどの好適な霊長類に誘発させる。

【0070】

さらなる好ましいヒト抗体、キメラ抗体、およびその断片は、標準プロトロンビン（PT）時間アッセイによって決定されるとおり、特に前記抗体または断片の前記哺乳類への投与から約5分後には、約50乃至約350秒の間の血液凝固時間を示す。特に有用なPTアッセイは、たとえば米国特許第5,986,065号、6,555,319号、およびPCT/US98/04644 (WO 98/40408)に開示されている。

30

【0071】

本願発明にしたがった使用にさらに好ましい抗体は、標準血小板沈着アッセイによって決定されたとおり、血小板沈着を少なくとも約50%阻害する。前記圧政の実施の方法は、たとえば係属中の国特許出願第10/310,113号に開示されている。

【0072】

さらに好ましい抗体は、実験用マウスモデルにおいてコラーゲン誘発関節炎を阻害する。例5を参照。

40

【0073】

「抗体」、「本願発明での使用のための抗体」、および同様の文言は、望ましい抗原に結合する完全免疫グロブリンおよび免疫学的に活性な断片を意味する。前記免疫グロブリン、およびその免疫学的に活性な（抗原結合）断片には、エピトープ結合部位（すなわち抗体認識抗原によって特異的に結合される能力がある部位またはエピトープ）が含まれる。例示的な抗体断片には、Fab、F(v)、Fab'、F(ab')₂断片、免疫グロブリンのジスルフィド結合を減少させることによって誘導される「半分子」、1本鎖免疫グロブリン、またはその他の好適な抗原結合断片が含まれる（たとえばBird et al., Science, 242:423-426 (1988); Huston et al., PNAS, (USA), 85:5879 (1988); Webber et al., Mol. Immunol., 32:249 (1995)を参照）。

50

【0074】

本願発明のあるキメラまたはヒト化抗体は、必要に応じてポリクローナルまたはモノクローナルであってよく、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4イソ型、またはIgA、IgD、IgE、IgMを、それらに限定せずに含む。本願発明での使用に特に好ましい抗体は、IgG1（「hOAT」とよばれる）またはIgG4（「hFAT」とよばれる）イソ型を有するか、または有するように操作することができる。そのような抗体は、発明のある実施態様の目的を達成するために、必要に応じてポリクローナルまたはモノクローナルであってよい。ある場合では、ヒト化1本鎖などの1本鎖抗体が好ましいだろう。

【0075】

本願発明の実施は、広範囲の哺乳類に適用可能である。好ましくは、前記哺乳類はサル、チンパンジーまたはヒヒなどの霊長類である。より好ましくは、前記霊長類は本願明細書に開示される方法を必要とするヒト患者、すなわち、敗血症もしくは敗血症関連症状、または炎症性障害もしくは疾患を有する、または有する疑いのあるヒト患者である。

10

【0076】

上述のとおり、本願発明の抗体およびその好適な断片は、哺乳類、好ましくはヒトなどの霊長類に投与され、敗血症および関連する合併症を予防または低減させることができる。ある実施態様によると、そのような抗体は、1つ以上の薬学的に許容な無毒性担体であって、滅菌水もしくは食塩水、ポリエチレングリコールなどのグリコール、および植物由来する油などの担体とともに使用する。特に、生物適合性、生分解性ラクチドポリマー、ラクチドグリコリドコポリマー、またはポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレンコポリマーが有用な賦形剤である。その他の有用であると考えられる投与システムには、エチレン酢酸ビニルコポリマー粒子、浸透圧ポンプ、および移植可能な注入システムおよびリポソームが含まれる。必要であれば、1つ以上の好適な抗体または断片が溶液または懸濁液の形態（または溶液または懸濁液に再構築可能な凍結乾燥形態）であってよく、好ましくは本願発明の抗体の約0.01%乃至10%（w/w）、好ましくは前記抗体の約0.01%乃至5%（w/w）が含まれているだろう。

20

【0077】

すでに述べたとおり、前記抗体または断片は、単独の活性物質として、またはその他の既知の抗敗血症療法と組み合わせて、本願発明にしたがって投与することができる。たとえば、そのような抗体または断片は、1つ以上の適切な抗生物質、典型的には広域スペクトル静脈抗生物質療法による介入の前、その最中、またはその後、ヒト患者に投与することができる。好ましい抗生物質には、グラム陽性、グラム陰性および嫌気性細菌に及ぶ、広域スペクトル抗微生物活性を有することが知られている抗生物質が含まれる。したがって、ある実施態様では、そのような抗生物質は本願明細書に開示される抗体および断片の投与中または投与後に投与し、好ましくは殺菌血清レベルに到達するのに十分な投与量を経口投与する。前記患者を安定化させた後、さまざまな認識された支持療法を用いて酸素、静脈液、および血圧を上昇させるための医薬品の投与などの回復を支援することができる。腎不全のイベントには透析が必要である場合もあり、呼吸器不全が生じた場合には機械的な換気を要する場合が多い。

30

【0078】

敗血症および関連症状を発症する「リスクのある」患者には、非常に高齢な個人および非常に若齢の個人が、それらに限定されることなく含まれる。さらに、HIVまたはヘルペスなどのDNAまたはRNAウイルスに感染した患者など、免疫系に障害のある患者もリスクがある。ほぼいずれの細菌性生物も、敗血症を引き起こす。ある真菌および（まれに）ウイルスが敗血症および関連する症状を促進する可能性もある。一般に、前記細菌または真菌によって放出された毒素が直接的な臓器（たとえば肺、腎など）または組織損傷を引き起こすと考えられており、低血圧および/または臓器機能の低下を引き起こす可能性がある。これらの毒素は体からの活発な炎症応答も生じ、敗血症性ショックに寄与する。

40

【0079】

さらなるリスク因子には、糖尿病、血液癌（リンパ腫または白血病）、ならびに泌尿生

50

殖器系、肝もしくは胆管系および腸系のその他の障害および疾患などの基礎疾患が含まれる。その他のリスク因子は、最近罹患した感染症、長期間の抗生物質療法、および最近受けた侵襲性外科的または内科的処置に曝された場合である。敗血症および関連症状の症状は、当業に知られており、発熱、悪寒、立ちくらみ、息切れ、動悸、四肢の冷えおよび/または血色の喪失、発熱、興奮、倦怠感、および意識混濁などが、限定されることなく含まれる。

【0080】

敗血症および関連症状の予防または治療における本願発明の成功は、1つのアプローチまたはアプローチの組み合わせを用いる介護者によって評価される。典型的には、1つ以上の前述の症状の低減または消滅は、敗血症または関連症状が解決されたことを示す指標と見なすことができる。好ましくは、そのような治療を受けた患者は、そのような介入を受けていない患者よりも少なくとも約2倍以上、長期間生存するだろう。

10

【0081】

すでに述べたとおり、本願発明は、哺乳類におけるサイトカイン産生を減少させる方法であって、たとえば、組織因子(TF)に特異的に結合して複合体を形成する、少なくとも1つのヒト化抗体、キメラ抗体、またはその断片を治療上有効な量、前記哺乳類に投与することによる方法を提供する。好ましくは、前記複合体に結合する第X因子または第IX因子が阻害され、前記投与が前記哺乳類におけるサイトカイン産生を減少させるのに十分である。好適なヒト化抗体、キメラ抗体、およびどの断片は本願明細書に開示される。哺乳類におけるサイトカイン産生を監視する許容可能な方法は知られており、実施例に概説された具体的な方法が含まれる。

20

【0082】

本願明細書による治療用抗体および断片は、特に液体状の溶液の形状で経口または静脈投与に用いることができる。そのような組成物は、単位用量で便利に投与することも出来、製薬業に知られる方法に従って調製することもできる。Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton PA, (1980))を参照。「単位用量」という用語は、ヒトなどの霊長類に好適な単位投与量に物理的に分割した単位で用いられる本願発明の治療用組成物であって、当該組成物において、前記各単位には必要な希釈剤または担体とともに望ましい治療効果を生じるように計算され、予め決定された量の活性物質を含有する、組成物を意味する。前記単位用量は、治療されるべき敗血症の種類および重症度、患者の健康状態、および医療歴などのを含む各種の要因に依存している。投与される抗体の正確な量は、典型的には医師の判断によって指示されるであろうが、前記単位用量は一般に投与経路に依存するもので、一日に体重1kgあたり10ng乃至50mg、より典型的には一日に体重1kgあたり100ng乃至10mgの範囲内であろう。追加投与の初期投与に好適な投与計画も変更可能であるが、初期投与のあとに1時間以上の間隔をあげた注射またはその他の投与による繰り返し投与を特徴とする。代替的には、連続的なまたは断続的な静脈注入で、前記抗体を少なくとも約10ナノモル乃至10マイクロモルの濃度を十分維持することができる。

30

【0083】

本願発明で使用するための抗体および断片は、本願明細書に開示された方法およびアッセイに用いられる場合、実質的に純粋であることが好ましい。「実質的に純粋」な抗体についての言及は、自然状態で付随する成分から分離された抗体またはタンパク質を意味する。たとえば、標準の免疫親和性、またはタンパク質A親和性精製技術などを用いることによって、本願発明の抗体を、抗原としての未変性TFまたはタンパク質A樹脂を用いてハイブリドーマまたは培養培地から精製することができる。同様に、実質的に純粋な状態の未変性TFは、本願発明の抗体を用いて標準的な免疫親和性精製技術によって得ることができる。特に、抗体またはタンパク質は、全タンパク質の少なくとも50%(特定のサンプル中の全タンパク質における重量%)が本願発明の抗体またはタンパク質である場合に、実質的に純粋である。好ましくは、前記抗体またはタンパク質は、全タンパク質の少なくとも60重量%、より好ましくは少なくとも75重量%、さらにより好ましくは少なくとも90重量

40

50

%、および最も好ましく全物質の少なくとも98重量%である。純度のアッセイは、SDSポリ
 アクリルアミドゲル電気穿孔法 (PAGE)、カラムクロマトグラフィ (たとえばアフィニテ
 イクロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィなど)、質量分光法またはHPLC分析法
 などの既知の方法によって容易に行うことができる。

【0084】

本願発明の抗体の分子量は、目的の用途、および前記抗体が、結合または組換え的に融
 合された毒素、薬物、放射性同位体、または検出可能な標識などを含んでいるかどうかな
 どのいくつかの要因に依存して変化するだろう。さらに、前記分子量は、性質、またはも
 しあれば前記抗体への翻訳後修飾 (グリコシル化など) の程度にも依存して変化するだろ
 う。前記修飾は、非グリコシル化抗体を産生する大腸菌、およびグリコシル化抗体を産生
 する哺乳類細胞または植物などの真核性宿主による発現に用いられる宿主の働きである。
 一般に、本願発明の抗体はおよそ20乃至150kDaの分子量を有するだろう。そのような分子
 量の決定は、SDS-PAGEなどの分子量決定法のあとにタンパク質染色またはウエスタンプロ
 ット分析法を行うことによって、容易に行うことができる。

10

【0085】

ヒト化cH36抗体を作製する前述の方法は、本願発明によるその他のヒト化抗体および抗
 原結合断片を作製するために容易に適用することができることは明らかであろう。

【0086】

A. ヒト化抗組織因子結合抗体の調製

ヒト化抗組織因子結合抗体の調製および用途を説明する。後述の例1乃至3も参照のこと
 。

20

【0087】

簡単に説明すると、好ましい抗体はヒト組織因子と結合して結合複合体を形成する。前
 記組織因子は天然に存在してもよく、または組換えヒト成長因子 (rhTF) であってもよい
 。好ましくは、第X因子または第IX因子への前記複合体の結合が阻害される。本願発明の
 好ましい実施態様では、前記ヒト化抗体は、hTFへの見かけ上の親和定数 ($K_A M^{-1}$) が約1n
 M未満、好ましくは約0.5nM未満、より好ましくは約0.01nM乃至約0.4nMの範囲内を有する
 。前記ヒト化抗体の親和定数の決定についてのさらなる情報は、例1乃至3を参照のこと。
 「特異的な結合」は、RIA、ウエスタンブロットまたはELISAなどの標準的な免疫学的技術
 によって決定されるとおり、前記ヒト化抗体がTF (またはrhTF) とだけ検出可能な結合複
 合体を形成し、他の抗原とは形成しないことを意味する。

30

【0088】

本願発明によって作製されるさらに好ましいヒト化抗TF結合抗体は、表面プラスモン分
 析法 (特に、後述の例3に記載の手順に従ったBIAコア分析法) によって決定した未変性ヒ
 トTFへの見かけの親和定数 (K_A, M^{-1}) が少なくとも $1 \times 10^8 M^{-1}$ 、より好ましくは表面プ
 ラスモン分析法によって決定した親和定数が少なくとも約 $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、さらに好ましく
 は表面プラスモン共鳴分析によって決定された未変性ヒトTFへの見かけ上の親和定数 (K_A
 $, M^{-1}$) が少なくとも約 $3 \times 10^8 M^{-1}$ を示す。本願発明の抗体のそのように実質的な結合親
 和性は、はるかに低い既報の抗体の結合親和性と著しい対照を成している。

【0089】

本願発明によってヒト化されている特定の組織因子結合抗体、つまりH36.D2.B7の核酸
 配列 (配列番号1および3) ならびにアミノ酸配列 (配列番号2および4)。たとえば、図面
 に記載の図1Aおよび1BPCT 出願第 WO 98/40408号を参照。配列番号1および2は軽鎖可変領
 域の核酸およびアミノ酸であって、配列番号3および4は重鎖可変領域の核酸およびアミ
 ノ酸であって、それらの配列すべてにおいて下線を施してある部分は超可変領域 (CDR、相
 補性決定領域) である。

40

【0090】

さらなる本願発明の組織因子結合ヒト化抗体は、図1Aおよび1Bに記載の軽鎖または重鎖
 配列のどちらか片方もしくは両方との実質的なアミノ酸配列同一性を有するだろう。さら
 に詳しくは、そのような抗体には、配列番号2および/または4に少なくとも約70%の相同

50

性を、より好ましくは配列番号2および/または4に約80%以上の相同性を、さらにより好ましくは配列番号2および/または4に約85、90、または95%以上の相同性を有する抗体が含まれる。

【0091】

本願発明のより詳細な組織因子結合ヒト化抗体は、配列番号2および4の超可変領域（図1Aおよび1Bにおいて二重下線で示されている）との高いアミノ酸配列同一性を有するだろう。特定の抗体は、H36.D2.B7（図1Aにおいて下線で示された超可変領域）の軽鎖可変領域の対応する超可変領域のうちの1つ、2つ、または3つとの配列同一性が高い（アミノ酸配列の同一性は少なくとも90%または95%）か、またはそれらと同一の、軽鎖可変領域のうちの1つ、2つ、または3つを有し、以下の通りの配列である。

- 1) LASQTID（配列番号5）
- 2) AATNLAD（配列番号6）および、
- 3) QQVYSSPFT（配列番号7）

【0092】

本願明細書に記載の方法によってヒト化されたさらなる特定の抗体および結合組織因子は、H36.D2.B7（図1Bにおいて下線で示された超可変領域）の重鎖可変領域の対応する超可変領域のうちの1つ、2つ、または3つとの配列同一性が高い（アミノ酸配列の同一性は少なくとも90%または95%）か、またはそれらと同一の、重鎖可変領域のうちの1つ、2つ、または3つを有し、以下の通りの配列である。

- 1) TDYNVY（配列番号8）、
- 2) YIDPYNGITIIDQNFKG（配列番号9）；および、
- 3) DVTTALDF（配列番号10）。

【0093】

本願明細書に開示された抗体または断片の一部またはすべてをコードする特定の核酸は、以下に記載の、37℃で0.9M食塩水/0.12Mクエン酸ナトリウム（6xSSC）バッファ中に20%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーションバッファを使用し、37℃で前記2xSSCバッファで1回洗浄しても結合したままの状態を維持する、緩やかにストリンジェントな条件（本願明細書では「通常にストリンジェントな」条件とよぶ）下において、配列番号1および/または配列番号3の配列に結合するのに十分な長さ（好ましくは少なくとも約100、200、または250塩基対）を、おそらく有するだろう。

【0094】

さらに具体的にいうと、特定の前記核酸（好ましくは少なくとも100、200、または250塩基対）は、42℃で0.9M食塩水/0.12Mクエン酸ナトリウム（6xSSC）バッファ中に20%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーションバッファを使用し、42℃で前記1xSSCバッファで1回洗浄しても結合したままの状態を維持する、高度にストリンジェントな条件（本願明細書では「高ストリンジェントな」条件とよぶ）下において、配列番号1および/または配列番号3の配列に結合するだろう。

【0095】

好適な核酸は、好ましくは少なくとも20塩基対、より好ましくは少なくとも約50塩基対を含み、およびさらにより好ましくは本願発明の核酸は少なくとも約100、200、250、または300塩基対を含む。

【0096】

本願発明に一般に好ましい核酸は、本願明細書に開示されたとおり、好ましい結合親和性とその他の特性を示す本願発明の抗体を発言するだろう。さらなる情報は、米国特許第5,986,065号およびPCT/US98/04644（WO 98/40408）も参照のこと。

【0097】

その他の適切な核酸は、図1Aおよび1Bに示された軽鎖または重鎖配列のいずれか片方

10

20

30

40

50

たは両方への実質的な配列同一性を有するだろう。さらに具体的には、好ましい核酸は、配列番号1および/または3への相同性（ヌクレオチド配列の同一性）が少なくとも約70%、より好ましくは配列番号1および/または3への相同性が約80%以上、よりさらに好ましくは配列番号1および/または3への相同性が約85%、90%、または95%以上である、配列を含むだろう。

【0098】

さらに具体的な核酸配列は、配列番号1および3の超可変領域（図1Aおよび1Bにおいて下線を施している）への高い配列同一性を有するだろう。そのような核酸には、抗体軽鎖可変領域を有し、超可変領域をコードする配列を1つ、2つ、または3つ有し、H36.D2.B7（図1Aにおいて下線で示された超可変領域）の対応する超可変領域をコードする配列のうちの

10

1)

CTGGCAAGTCAGACCATTGAT（配列番号11）、

2)

GCTGCCACCAACTTGGCAGAT（配列番号12）、および

3)

CAACAAGMACAGTTCTCCATTCCACGT（配列番号13）

の核酸が含まれる。

【0099】

より具体的な核酸は、抗体重鎖可変領域をコードし、超可変領域をコードする配列を1つ、2つ、または3つ有し、H36.D2.B7（図1Bにおいて下線で示された超可変領域）の対応する超可変領域をコードする配列のうちの1つ、2つ、または3つとの配列同一性が高い（ヌクレオチド配列の同一性は少なくとも90%または95%）か、またはそれらと同一であって、以下のとおり

20

1)

ACTGACTACAACGTGTAC（配列番号14）、

2)

ATATTGATCCTTACAATGGTATTACTATCTACGACCAGAAGTTCAAGGGC（配列番号15）、および

3)

GATGTGACTACGGCCCTTGACTTC（配列番号16）

の核酸でもある。

30

【0100】

本願発明の方法に使用するためのTFに結合するより具体的なヒト化抗体は、フレームワーク領域（FR）1、2、3、および4のそれぞれが、図3A（配列番号82-125）に記載の軽鎖FR配列へのアミノ酸配列同一性が少なくとも約90%、好ましくは同一性が少なくとも約95%以上であって、好ましくは図3Aの「LC-09」と示される配列を有する抗体である。さらに具体的なヒト化抗体には、図5A（配列番号191）または図6A（配列番号193）に記載の配列へのアミノ酸配列同一性が少なくとも約90%、好ましくは少なくとも約95%以上の軽鎖定常領域が含まれる。

40

【0101】

さらに具体的なヒト化抗体は、フレームワーク領域（FR）1、2、3、および4のそれぞれが、図4A（配列番号129-184）に記載の重鎖配列へのアミノ酸配列同一性が少なくとも約90%、好ましくは同一性が少なくとも約95%以上であって、好ましくは図4Aの「HC-08」と示される配列を有する抗体である。さらなるヒト化抗体は、図5B（配列番号192）または図6B（配列番号194）に記載の配列へのアミノ酸配列同一性が少なくとも約90%、好ましくは少なくとも約95%以上の重鎖定常領域を有する。

【0102】

ある実施態様では、前記ヒト化抗体は、公開済み米国出願第20030190705号に開示されるとおり、IgG1（hOAT）またはIgG4（hFAT）を有するだろう。

50

【0103】

さらに本願発明において提供されるのは、本願明細書に開示のヒト化抗体の機能的フラグメントである。そのようなフラグメントの例には、親和定数が約1mM未満、好ましくは約0.5nM未満、より好ましくは約0.01nM乃至約0.4nMである、TFと結合する断片が、それらに限定されずに含まれる。

【0104】

上述のとおり、本願発明は、例えばCDR1、CDR2、CDR3など少なくとも1つのマウス相補性決定領域（CDR）を含むヒト化抗体を特徴とする。本願発明のある実施態様では、前記抗体はヒト組織因子（TF）と特異的に結合して複合体を形成する。典型的には、TFまたはTF-FVIIaに結合する第X因子または第IX因子、およびTF-FVIIaによる活性化が阻害される。上述のとおり、好ましいCDR（軽鎖および重鎖）は齧歯類、典型的にはマウスから得られる。

10

【0105】

本願発明のヒト化抗体のある実施態様では、前記抗体にはさらに、少なくとも1つのフレームワーク領域（FR）サブセットが含まれる。好ましくは、すべてのFR（軽鎖および重鎖）はヒトである。

【0106】

より具体的な実施例では、ヒトTFに結合する重鎖超可変領域の第1のCDR（CDR1）は、図4B（配列番号185）に記載のCDR1アミノ酸配列に少なくとも90%、好ましくは前記配列に少なくとも約95%以上同一である。典型的には、前記重鎖超可変領域の第2のCDR（CDR2）は、図4C（配列番号186）に記載のCDR2アミノ酸配列に少なくとも90%、好ましくは少なくとも約95%以上同一である。好ましくは、前記重鎖超可変領域の第3のCDR（CDR3）は、図4D（配列番号187）に記載のCDR3配列に少なくとも90%、より好ましくは前記配列に少なくとも約95%以上同一である。

20

【0107】

本願発明の別の実施例では、ヒトTFに結合する軽鎖超可変領域の第1のCDR（CDR1）は、図3B（配列番号126）に記載のCDR1アミノ酸配列に少なくとも90%、好ましくは少なくとも約95%以上同一である。典型的には、前記軽鎖超可変領域の第2のCDR（CDR2）は、図3C（配列番号127）に記載のCDR2アミノ酸配列に少なくとも90%、好ましくは少なくとも約95%以上同一である。好ましくは、前記軽鎖超可変領域の第3のCDR（CDR3）は、図3D（配列番号128）に記載のCDR3アミノ酸配列に少なくとも90%、より好ましくは前記配列に少なくとも約95%以上同一である。

30

【0108】

本願発明の方法に用いるのに好適なさらなるヒト化抗体には、ヒトTFに結合する重鎖超可変領域の第1のフレームワーク領域（FR1）であって、当該FR1が、図4A（配列番号161）に「FR1 HC-08」と示されているアミノ酸配列に少なくとも90%以上同一であり、好ましくはその配列に約95%以上同一である、第1のフレームワーク領域が含まれる。ある実施態様では、前記FR1には、以下のアミノ酸の変化が少なくとも1つ含まれる。その変化とは、E1からQへ、Q5からVへ、P9からGへ、L11からVへ、V12からKへ、Q19からRへ、およびT24からAへ、である。好ましくは、前記FR1には、2、3、4、5、または6つのそれらの変化が含まれるが、それらのアミノ酸変化すべてが含まれることが数多くの用途に好ましい。

40

【0109】

さらなるヒト化抗体はヒトTFに適切に結合し、重鎖超可変領域の第2のフレームワーク領域（FR2）であって、当該FR2が、図4A（配列番号162）に「FR2 HC-08」と示されているアミノ酸配列に少なくとも90%以上同一であり、好ましくはその配列に約95%以上同一である、第2のフレームワーク領域が含まれる。ある実施態様では、前記FR2は、以下のアミノ酸変化の少なくとも一つである。その変化とはH41からPへ、およびS44からGへの変化である。好ましいFR2には、それら両方のアミノ酸変化が含まれる。

【0110】

本願発明はさらに、ヒトTFに結合するヒト化抗体の使用であって、当該ヒト化抗体にお

50

いて、重鎖超可変領域の第3のフレームワーク領域（FR3）が、図4A（配列番号163）に「FR3 HC-08」と示されている配列に少なくとも90%以上同一であり、好ましくはその配列に約95%以上同一である、ヒト化抗体を特徴とする。ある実施態様では、前記FR3には以下のアミノ酸変化の少なくとも一つが含まれる。その変化とは、S76 からTへ、T77からSへ、F80からYへ、H82からEへ、N84からSへ、T87からRへ、D89からEへ、およびS91からTへの変化である。好ましいFR3には、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのアミノ酸変化が含まれるが、一般にはそれらのアミノ酸変化の7つすべてが含まれることが好ましい。

【0111】

さらに、ヒトTFに適切に結合するヒト化抗体の使用であって、当該ヒト化抗体において、重鎖超可変領域の第4のフレームワーク領域（FR4）が、図4A（配列番号164）に「FR4 HC-08」と示されているアミノ酸配列に少なくとも90%以上同一であり、好ましくはその配列に約95%以上同一である、ヒト化抗体を特徴とする。好ましくは、前記FR4には以下のアミノ酸変化が含まれる。その変化とは、L113からVへの変化である。さらなるヒト化抗体はヒトTFに結合し、軽鎖超可変領域の第1のフレームワーク領域（FR1）であって、当該FR1が、図3A（配列番号110）に「FR1

LC-09」と示されているアミノ酸配列に少なくとも90%以上同一であり、好ましくはその配列に約95%以上同一である、第1のフレームワーク領域を特徴とする。ある実施態様では、前記FR1は以下のアミノ酸変化の少なくとも一つを含む。その変化とは、Q11からLへ、L15からVへ、E1

7からDへ、およびS 18からRへの変化である。好ましいFR1には、2つまたは3つのアミノ酸変化が含まれるが、一般にはそれらのアミノ酸変化の4つすべてが含まれることが好ましい。

【0112】

本願発明はさらに、ヒトTFに適切に結合するヒト化抗体の使用であって、当該ヒト化抗体において、軽鎖超可変領域の第2のフレームワーク領域（FR2）が、図3A（配列番号111）に「FR2 LC-09」と示されているアミノ酸配列に少なくとも90%以上同一であり、好ましくはその配列に約95%以上同一である、ヒト化抗体を特徴とする。好ましいFR2には以下のアミノ酸変化が含まれる。その変化とは、Q37からLへの変化である。

【0113】

本願発明はさらに、ヒトTFに結合するヒト化抗体の使用であって、当該ヒト化抗体において、軽鎖超可変領域の第3のフレームワーク領域（FR3）が、図3A（配列番号112）に「FR3 LC-09」と示されているアミノ酸配列に少なくとも90%以上同一であり、好ましくはその配列に約95%以上同一である、ヒト化抗体の使用も包含する。ある実施態様では、前記FR3は、以下のアミノ酸変化の少なくとも一つを有する。その変化とはK70からDへ、K74からTへ、A80からPへ、V84からAへ、N85からTへの変化である。好ましくは、FR3は、2つ、3つまたは4つのアミノ酸変化が含まれるが、一般には前記アミノ酸変化の5つすべてが含まれることが好ましい。

【0114】

本願明細書に開示された方法での使用に適切なさらなるヒト化抗体は、TFに結合し、軽鎖超可変領域の第4のフレームワーク領域（FR4）であって、当該FR4が、図3A（配列番号113）に「FR4 LC-09」と示されているアミノ酸配列に少なくとも90%以上同一であり、好ましくはその配列に約95%以上同一である、第4のフレームワーク領域が含まれる。ある実施態様では、前記FR4には少なくとも1つおよび好ましくはすべての以下のアミノ酸変化が含まれる。その変化とは、A100からQへ、およびL106からIへの変化である。

【0115】

本願発明は、前記ヒト化抗体のヒトTF結合断片も特徴とする。そのような断片の例には、Fab、Fab'、およびF(ab)₂が含まれる。本願発明にしたがって作製された、さらなる好ましいヒト化抗TF抗体については、公開済み米国特許出願第20030190705号および本願明細書に引用された参考文献を参照のこと。

【0116】

10

20

30

40

50

次の3種類のベクタ、pSUN36（ヒト化抗TF抗体Ig G1-HC発現ベクタ）、pSUN37（ヒト化抗TF抗体Ig G4HC発現ベクタ）、およびpSUN38（ヒト化抗TF抗体LC発現ベクタ）は、ブダペスト条約に準じて、10801 University Boulevard, Manassas VA 201102209のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）に預託されている。

本願発明のヒト化抗TF抗体を作製および使用するのに好適な発現および精製戦略は、たとえば公開済み米国特許第20030190705号に開示されている。

【0117】

上述のとおり、本願発明は、本願明細書に提供された1つ以上の方法を実施するために有用なキットも提供する。ある実施態様では、前記キットには、ヒト組織因子（TF）に特異的に結合し複合体を形成するヒト化抗体、キメラ抗体またはその断片であって、当該ヒト化抗体、キメラ抗体またはその断片において前記複合体への第X因子または第IX因子の結合を阻害する、ヒト化抗体、キメラ抗体またはその断片の少なくとも1つが含まれる。典型的には、前記ヒト化抗体、キメラ抗体、またはその断片は、食塩水、水、またはバッファなどの薬学的に許容な賦形剤中にも提供される。前記キットには、前記ヒト化抗体、キメラ抗体、または断片を使用前に溶解するための薬学的に許容な賦形剤が含まれてよい。

【0118】

以下の制限されない例が、本願発明の具体例である。以下の実施例および他の箇所において、本願発明の方法は前記マウス抗組織因子抗体H36のヒト化にも用いられる。たとえば、米国特許第5,986,065号および6,555,319号、米国特許出願第20030082636号、WO 03/037911およびWO 98/40408、ならびに公開済み米国特許出願第20030190705号、ならびに本願明細書に引用された参考文献および上述の考察を参照のこと。時に、H36またはcH36のFab断片は、便宜上、それぞれ「H36-Fab」および「cH36-Fab」とよばれるだろう。

【0119】

本願明細書に記載のすべての文書は、引用をもってその全体を完全に援用する。

【0120】

【実施例】

例1 - 抗組織因子抗体のヒト化

H36.D2（上述のとおり、H36とよばれることもある）とよばれるあるマウス抗体の作製および使用の方法の説明は、米国特許第5,986,065号および第6,555,319号に記載されている。本例では、その抗体のヒト化版の作製および使用の方法を示す。ヒト化H36抗体には、ヒト化抗マウス抗体（HAMA）免疫応答の可能性の最小化を促進するステップも含めた、多様な用途がある。これら、およびその他の望ましくない応答は、H36抗体をヒトの治療用途に使用する際に問題をもたらす。

【0121】

A キメラ抗組織因子抗体（cH36）の調製

既述のH36抗体はIgG2マウス抗体である。H36は、最初、臨床開発用にマウス-ヒトキメラ抗体へ転換された。これをするために、H36の重鎖および軽鎖遺伝子をクローニングした（米国特許第5,986,065号参照）。重鎖可変領域をヒトIgG4定常（Fc）領域に融合させて、軽鎖可変領域をヒト軽鎖定常領域に融合させた。得られたIgG4キメラ抗体をcH36と命名した（Sunol-cH36ともよぶ）。慢性疾患患者におけるH36またはcH36の多くの用途のためには、完全なヒト化cH36が好ましい。それは、いずれのヒト抗キメラ抗体（HACA）免疫応答をも低減または除去できるからである。cH36のヒト化は後述の通りである。

【0122】

B cH36抗体のヒト化戦略

キメラ抗組織因子抗体cH36のヒト化は、本願発明の「FRベストフィット」法を用いることによって実施された。本方法は、多数の既知のアミノ酸配列またはヒトIgG断片の配列が公開データベースで入手可能であるという事実を十分に利用する。cH36のマウス重および軽可変領域の個別のフレームワーク領域の配列を、カバトデータベースの配列別重または軽鎖可変領域またはフレームワーク（もしくはその断片）（たとえばKabat et al.

10

20

30

40

50

in Sequences of Proteins of Immunological Interest Fifth Edition, U.S. Dept. of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991) NIH Publication No. 91-3242 or <http://immuno.bme.nwu.edu>を参照)と比較するヒト化のために望ましいヒトIgGフレームワーク領域サブセットを選択するために、以下の基準が用いられた。(1) ミスマッチしているアミノ酸の数を可能な限り少なくした。(2) 「副尺(バーニア)」領域の中にあるアミノ酸(この領域の中にあるアミノ酸はCDR構造を調整し抗原へのフィットを微調整すると考えられている。Foote, J. and Winter, G., J. of Mol. Bio. 224(2):487-499 [1992]参照)は、変化させなかった。(3) 類似する候補の比較をする場合は、保存的アミノ酸置換が好ましかった。この比較のために用いられたマッチングプログラムは、カバトデータベースにみつけることができる。Johnson G, Wu T. "Kabat database and its application: Future directions." Nucleic Acids Res. 29:205-206 (2001)参照。このプログラムは、マウスの配列と前記カバトデータベースのヒト配列に相同性がある領域を発見してアラインする。この固有なFRベストフィット法を用いることによって、前記標的IgGのヒト化LCまたはHC可変領域が少なくとも1つヒトIgG分子乃至多くとも4つの異なるIgG分子に由来する4つのFRすべてを有する場合があるということが理解されよう。

10

【0123】

B(i) ヒトIgG 軽鎖可変領域フレームワーク領域の選択

cH36 LC の各フレームワーク領域におけるアミノ酸配列を、カバトデータベースのヒトIgG 軽鎖可変領域におけるFRにおけるアミノ酸配列と比較した。ベストフィットFRの選択は、上述の3つの基準に基づいて行われた。

20

【0124】

カバトデータベースID No. 005191を有するヒトIgG 軽鎖可変領域のアミノ酸配列を、cH36 LC FR1のヒト化用として選択した。カバトデータベースID No. 019308を有するヒトIgG 軽鎖可変領域のアミノ酸配列を、cH36 LC FR2のヒト化用として選択した。以下の突然変異をcH36 LC FR1 に施し、カバトデータベースID No. 005191を有するヒトIgG 軽鎖可変領域のアミノ酸配列とマッチさせた。その突然変異とは、I1 L, L15 V, E17 D, S18 Rである。1つの突然変異Q37 LをcH36 LC FR2 に施して、カバトデータベースID No. 019308(配列情報は表1Aを参照)を有するヒトIgG 軽鎖可変領域のアミノ酸配列とマッチさせた。

30

【0125】

カバトデータベースID No. 038233を有するヒトIgG 軽鎖可変領域のアミノ酸配列を、cH36 LC FR3のヒト化用として選択した。カバトデータベースID No. 004733を有するヒトIgG 軽鎖可変領域のアミノ酸配列を、cH36 LC FR4のヒト化用として選択した。以下の突然変異をcH36 LC FR3 に施し、カバトデータベースID No. 038233を有するヒトIgG 軽鎖可変領域のアミノ酸配列とマッチさせた。その突然変異とは、K70 D, K74 T, A80 P, V84 A, N85 Tである。2つの突然変異A100 QおよびL106 IをcH36 LC FR4 に施して、カバトデータベースID No. 004733(配列情報は表1Bを参照)を有するヒトIgG 軽鎖可変領域のアミノ酸配列とマッチさせた。

40

【0126】

B(ii). ヒトIgG 重鎖可変領域フレームワーク領域の選択

cH36 HC の各フレームワーク領域におけるアミノ酸配列を、カバトデータベースのヒトIgG 重鎖可変領域におけるFRにおけるアミノ酸配列と比較した。ベストフィットFRの選択は、上述の3つの基準に基づいて行われた。

【0127】

カバトデータベースID No. 000042を有するヒトIgG 重鎖可変領域のアミノ酸配列を、cH36 HC FR1のヒト化用として選択した。カバトデータベースID No. 023960を有するヒトIgG 重鎖可変領域のアミノ酸配列を、cH36 HC FR2のヒト化用として選択した。以下の突

50

然変異をcH36 HC FR1 に施し、カバトデータベースID No. 000042を有するヒトIgG重鎖可変領域のアミノ酸配列とマッチさせた。その突然変異とは、E1 Q, Q5 V, P9 G, L11 V, V12 K, Q19 R, T24 Aである。2つの突然変異H41 PおよびS44 GをcH36 HC FR2 に施して、カバトデータベースID No. 023960 (配列情報は表2Aを参照)を有するヒトIgG重鎖可変領域のアミノ酸配列とマッチさせた。

【 0 1 2 8 】

カバトデータベースID No. 037010を有するヒトIgG重鎖可変領域のアミノ酸配列を、cH36 HC FR3のヒト化用として選択した。カバトデータベースID No. 000049を有するヒトIgG重鎖可変領域のアミノ酸配列を、cH36 HC FR4のヒト化用として選択した。以下の突然変異をcH36 HC FR3 に施し、カバトデータベースID No. 037010を有するヒトIgG重鎖可変領域のアミノ酸配列とマッチさせた。その突然変異とは、S76 T, T77 S, F80 Y, H82 E, N84 S, T87 R, D89 E, S91 Tである。1つの突然変異L113 VをcH36 HC FR2 に施して、カバトデータベースID No. 000049 (配列情報は表2Bを参照)を有するヒトIgG重鎖可変領域のアミノ酸配列とマッチさせた。

10

【 0 1 2 9 】

【表 1】

表1. cH36とヒト軽鎖 (LC) FR配列の比較
表1A (配列番号27-30、それぞれの記載順)

名称	LC-FR1 (23 aa)			
	1	10	20	35 49
cH36-LC	DIQMTQSPASQASLGSVITIC WYQQKPGKSPQLLY			
ヒト-LC	L V DR L			
	005191			019308

20

表1B (配列番号31-34、それぞれの記載順)

名称	LC-FR3 (32 aa)				LC-FR4 (10 aa)		
	57	60	70	80	98	107	
cH36-LC	GVPSRFSGSG GT KFSFKISSLQAEDFVNYIC				FGAGTKLELK		
ヒト-LC	D T P AT				Q I		
	038233				004733		

【 0 1 3 0 】

【表 2】

表2. cH36とヒト重鎖 (HC) FR配列の比較

30

表2A (配列番号35、195、36及び196、それぞれの記載順)

名称	HC-FR1 (30 aa)					
	1	10	20	30	36	49
cH36-HC	EIQLQQSGPELVKPGASVQV SCKT SGYSFT WVRQSHGKSLEWIG					
ヒト-HC	Q V G VK R A P G					
	000042			023960		

表2B (配列番号37-40、それぞれの記載順)

Names	HC-FR3 (32 aa)				HC-FR4 (11 aa)		
	67	75	85	95	107	117	
cH36-HC	KATLTVDKS ST TAFMHLNSLTSDDSAVYFCAR				WGQGTTLTVSS		
ヒト-HC	TS Y E S R E T				V		
	037010				000049		

40

【 0 1 3 1 】

望ましいフレームワーク領域について決定してから、以下の3種類の技術を用いて、軽鎖および重鎖両方において望ましいアミノ酸置換を実施した。(1) 通常のPCRをクローニングに用いて、クローニングまたは診断用制限エンドヌクレアーゼ部位を導入し、前記

50

可変領域の末端に位置するアミノ酸残基を変化させた。(2) PCRを用いた変異誘発を用いて、複数のアミノ酸残基を、特にこれらの残基が前記可変領域の中央にある場合、一度に変化させた。(3) 部位特異的変異誘発を用いて、1つまたは2つのアミノ酸置換基を一度に導入した。部位特異的変異誘発は、ストラタジーン社製"QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit" (カタログ番号200518)に記載のプロトコルにしたがって行われた。

【0132】

各ステップ後、前記の部分的なヒト化クローンの配列を決定し、これら可変領域の一部を後で発現ベクタにクローニングした。プラスミドtKMC180を用いて、LC突然変異体を発現させ、pJRS 355またはpLAM 356ベクタを用いて、HC突然変異体をそれぞれIgG1またはIgG4として発現させた。その後、これらのクローンの一部を一時的にCOS細胞に組み合わせて発現させ、ELISAによって発現量を決定した。

10

【0133】

前記抗TF重および軽可変領域の最終的な完全ヒト化形態を、本願明細書において「メガベクタ」と呼ばれる場合もあるベクタにクローニングし、IgG発現のためにCHOおよびNSO細胞へトランスフェクトした。その後、安定な細胞株を用いて、分析に十分な量のヒト化抗TFを作製した。得られたヒト化バージョンは100%ヒト由来である(前記CDR配列を考慮しない場合)。前記ヒト化IgG4バージョンはhFATと命名され(humanized IgG Four Anti-Tissue Factor antibody、ヒト化IgG4抗組織因子抗体)、IgG1バージョンはhOAT (humanized IgG One Anti-Tissue Factor antibody、ヒト化IgG1抗組織因子抗体)と命名されている。cH36のこれらの完全ヒト化バージョンは、血栓症、癌、および炎症性疾患などの慢性徴候の治療が意図される。

20

【0134】

C. ヒト化抗TF抗体重鎖の作製

1. 抗TF mAb cH36重鎖(HC)可変領域のPCR増幅およびpGem T-easy へのクローニングを、テンプレートとしてプラスミドpJA1IgG4TF.A8(キメラH36用の発現ベクタ)、ならびにTFHC1s2およびTFHC1as2を用いて行った。プライマTFHC1s2は、開始コドンの上流のBsiWI部位、およびフレームワーク(FR)1におけるE1からQへのアミノ酸変化を導入した。プライマTFHC1as2は、FR4におけるL113からVへのアミノ酸変化を導入した。このステップによって、構造物HC01が生じた。

30

【0135】

2. 前述の作成物(HC01)および後述の4つのプライマを用いたPCRを用いた変異誘発により、作成物HC02を作製した。上流PCRにはプライマTFHC1s2およびTFHC7asを用いた。下流PCRにはプライマTFHC7sおよびTFHC1as2を用いた。上流および下流PCR産物をテンプレートとして用い、TFHC1s2およびTFHC1as2をプライマとして用いたPCRによって、HC02が得られた。プライマTFHC7sおよびTFHC7asを用いることによって、FR2に2つのアミノ酸変化を導入した。その変化とはH41からPへ、およびS44からGへ、である。

【0136】

3. テンプレートとしてHC02、および後述の4つのプライマを用いたPCRを用いた変異誘発により、作成物HC03を作製した。上流PCRにはプライマTFHC1s2およびTFHC5as2を用いた。下流PCRにはプライマTFHC5sおよびTFHC1as2を用いた。上流および下流PCR産物をテンプレートとして用い、TFHC1s2およびTFHC1as2をプライマとして用いたPCRによって、HC03が得られた。プライマTFHC5sおよびTFHC5as2を用いることによって、FR3に3つのアミノ酸変化を導入した。その変化とはT87からRへ、D89からEへ、およびS91からTへの変化である。さらに、Bgl II部位も位置87に導入した。

40

【0137】

4. PCR増幅を、プライマTFHC2sおよびTFHC3as、ならびにテンプレートとしてpGemのHC03を用いて行った。TFHC2sはpGemのクローニング部位の上流にある。TFHC3asはフレームワーク3にあり、FR3に2つのアミノ酸変化、H82からEへ、およびN84からSへの変化を導入す

50

る。得られたPCRバンドをpGemにクローニングして、適切な大きさのインサートをBsiW1およびBgl IIで切断した。この断片をHC03にクローニングすることで、HC04が得られる。

【0138】

5. テンプレートとしてHC04、および後述のプライマを用いたPCRを用いた変異誘発により、作成物HC05を作製した。上流PCRにはプライマTFHC1s2およびTFHC6asを用いた。下流PCRにはプライマTFHC6sおよびTFHC1as2を用いた。上流および下流PCR産生物をテンプレートとして使い、TFHC1s2およびTFHC1as2をプライマとして用いた変異誘発PCRによって、HC05が得られた。このステップによって、FR3に以下のアミノ酸配列変化を導入した。その変化とは、S76からTへ、T77からSへ、およびF80からYへの変化である。

【0139】

6. テンプレートとしてHC05、および後述の4つのプライマを用いたPCRを用いた変異誘発により、HC06を作製した。上流PCRにはプライマTFHC2sおよびTFHC2as2を用いた。下流PCRにはプライマTFHC3s2およびTFHC1as2を用いた。TFHC2as2を用いた増幅によって、FR1にP9からGへのアミノ酸変化を導入した。プライマTFHC3s2は、Q19からRへ、およびT24からAへ変化させる。上流および下流PCR産生物をテンプレートとして使い、TFHC1s2およびTFHC1as2をプライマとして用いたPCRによって、HC06が得られた。

【0140】

7. FR1の位置2におけるIからMへの点突然変異は、HC06の作製中に自然に導入される。テンプレートとしてHC06を用い、プライマとしてTFHC1s3およびTFHC1as2を用いたPCR増幅によって、この誤置換が修正され、さらにFR1にQ5からVへのアミノ酸変化が導入された。得られた作成物がHC07だった。

【0141】

8. テンプレートとしてHC07、および後述のプライマを用いたPCRを用いた変異誘発により、作成物HC08を作製した。上流産生物にはTFHC2sおよびTFHC2as3が用いられた。下流産生物は、TFHC1s3およびTFHC1as2を用いて予め増幅した（ステップ7参照）。プライマTFHC2as3を使用することによって、FR1に2種類のアミノ酸変化を導入した。その変化とはL11からVへ、およびV12からKへの変化である。自然発生の点突然変異によって、CDR2の位置64にフェニルアラニンからロイシン(F L)への変化が生じた。さらにスクリーニングおよびシーケンシングによって、CDR2における位置64の正しい配列を有する作成物HC08R1を得た。

【0142】

9. 2つの作成物HC11およびHC12は、HC07から部位特異的変異誘発によって作製した。2つの相補的なプライマTFHC8sPおよびTFHC8asPをテンプレートとしてHC07とともに用いて、FR1にG9からPへ、L11からVへ、およびV12からKへの3つのアミノ酸変化を有するHC11を作製した。その後、HC11をメチル化して、次の部位特異的変異誘発のためにカラムで精製した。テンプレートとしてHC11および相補的プライマTFHC9sLおよびTFHC0asLを用いたPCRによって、FR1にV11からLへの変異を有するHC12を作製した。

【0143】

10. テンプレートとしてHC12、および相補性プライマTFHC10sKおよびTFHC10asKを用いたPCRを実施することによって、HC12から作成体HC09をつくり出した。HC09は、FR1にK12からVへのアミノ酸変化を含有する。

【0144】

11. 作成物HC10をHC09から作製した。テンプレートとしてHC09および相補的プライマLV-1およびLV-2を用いたPCRによって、FR1にV11からVへの変異を有するHC10を作製した。各変異ステップの後に、部分的にヒト化された、またはフリル付きでヒト化されたクローンの配列を決定し、その後、これらの可変領域の一部を発現ベクタにクローニングした。pJRS 355またはpLAM 356ベクタを用いて、ヒトIgG1またはIgG4のFcに融合されたHC変異を発現した。

図3A乃至Dは、ステップ1乃至11がまとめられており、FR1-4に導入された増分のアミノ酸変化を示す。HC08をのぞくすべての重鎖変異およびcH36は、CDR2の位置64にFを含有する

10

20

30

40

50

。HC08は、位置64にFからLへの変異を有する。図4B乃至Dは、重鎖CDR配列を示す。

【 0 1 4 5 】

重鎖ヒト化に使用されたプライマ

(配列番号41-62、それぞれ記載順)

TFHC1s2

5'

TTTCGTACGTCTTGTCCCAGATCCAGCTGCAGCAGTC 3'

TFHC1as2

5'

AGCGAATTCTGAGGAGACTGTGACAGTGGTGCCTTGCCCCAG 3'

10

TFHC7s

5'

GTGAGGCAGAGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGG 3'

TFHC7as

5' CCAATCCACTCAAGGCCCTTCCAGGGCTCTGCCTCAC

3'

20

TFHC5s

5' GCATCTCAACAGCCTGAGATCTGAAGACACTGCAGTTTATTTCTGTG

3'

TFHC5as2

5'

CTGCAGTGTCTTCAGATCTCAGGCTGTTGAGATGCATGAAGGC 3'

TFHC3as

5'

GTCTTCAGATCTCAGGCTGCTGAGCTCCATGAAGGCTGTGGTG 3'

30

TFHC2s

5'

TACGACTCACTATAGGGCGAATTGG 3'

TFHC6s

5' CTGTTGACAAGTCTACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAG

3'

40

TFHC6as

5' CTGCTGAGCTCCATGTAGGCTGTGCTGGTAGACTTGTCAACAG 3'

TFHC2as2

5' GCACTGAAGCCCCAGGCTTACCAGCTCACCTCCAGACTGCTGCAGC

3'

TFHC3s2

5' CTGGGGCTTCAGTGGGGTATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTAC

3'

50

TFHC1s3

5'

TCGTACGTCTTGTCCCAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGTGAGC 3'

TFHC2as3

5'

GCACTGAAGCCCCAGGCTTCTTCACCTCACCTCCAGACTGCACC 3'

TFHC9sL

5'

GCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGG 3'

10

TFHC9asL

5'

CCCCAGGCTTCTTCAGCTCAGGTCCAGACTGC 3'

TFHC8sP

5' GCTGGTGCAGTCTGGACCTGAGGTGAAGAAGCC 3'

TFHC8asP

5' GGCTTCTTCACCTCAGGTCCAGACTGCACCAGC 3'

20

TFHC10sK

5'

GCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTC 3'

TFHC10asK

5'

GAAGCCCCAGGCTTCACCAGCTCAGGTCCAGACTGC 3'

LV-1

5'

CAGTCTGGACCTGAGGTGGTGAAGCCTGGG 3'

30

LV-2

5' CCCAGGCTTCACCACCTCAGGTCCAGACTG

3'

【 0 1 4 6 】

D. ヒト化抗TF抗体軽鎖の作製

1. テンプレートとしてプラスミドpJA1gG4TF.A8（キメラH36の発現ベクタ）、およびプライマとしてTFLC1s2.1およびTFLC1as2を用いて、PCR増幅を行った。このステップによって、コード領域の上流にクローニング部位AgeIを導入した。さらに、FR4にL106I変異を導入した。このステップによって、構造物LC03が得られた。

40

【 0 1 4 7 】

2. 相補性プライマTFLC5sおよびTFLC5as、ならびにテンプレートとしてLC03を用いて、部位特異的変異誘発を実施した。このステップによって、FR2に変異Q37Lが導入され、診断用にPstI部位が加えられた。この新しい作成物はLC04と命名された。

【 0 1 4 8 】

3. テンプレートとしてLC04、ならびにプライマTFHC2sおよびTFLC2asIを用いて、PCR増幅を行った。このステップによって、フラグメントAが作製された。このフラグメントAはステップ6で使われる。このステップによって、FR1にQ11LおよびL15Vが導入された。

【 0 1 4 9 】

4. テンプレートとしてLC04、ならびにプライマTFLC1s2.1 およびTFLC1asRを用いて、PC

50

R増幅を行った。これによって、LC可変領域の末端にKpnI部位が導入された。このPCRフラグメントをpGEMにクローニングすると、pGEM04Kが得られる。これはステップ6に使われる。

【 0 1 5 0 】

5. テンプレートとしてLC04、ならびにプライマTFLC2s およびTFLC4asを用いて、PCR増幅を行った。このステップによって、フラグメントCが作製された。このフラグメントCはステップ6で使われる。FR4のE17D、S18R、およびFR4のA100Q の3つの変異をこのステップで導入した。

【 0 1 5 1 】

6. テンプレートとしてフラグメントAおよびフラグメントC、ならびにプライマTFHC2sおよびTFLC4asを用いたPCR変異誘発によって、フラグメントDが得られた。フラグメントDをpGEM04Kにクローニングして、作成物LC05を得た。

10

【 0 1 5 2 】

7. テンプレートとしてpGEM04K、ならびにプライマTFLC1s2.1 およびTFLC4asを用いて、PCR増幅を行った。このステップによって、フラグメントHが作製された。その後、このフラグメントHをpGEM04Kにクローニングする。これによりFR4にA100Qが導入された。この作成物はLC06と命名される。

【 0 1 5 3 】

8. テンプレートとしてLC06、ならびにプライマTFLC1s2.1 およびTFLC3asを用いて、PCR増幅を行った。このステップによって、フラグメントIが作製された。このフラグメントはステップ10で使われる。これによりFR3にK70DおよびK74T変異が導入された。

20

【 0 1 5 4 】

9. テンプレートとしてLC06、ならびにプライマTFLC3s2 およびTFLC4asを用いて、PCR増幅を行った。このステップによって、フラグメントFが作製された。このフラグメントはステップ10で使われる。これによりFR3にA80P変異が導入された。

【 0 1 5 5 】

10. テンプレートとしてフラグメントIおよびフラグメントF、ならびにプライマTFLC1s2.1およびTFLC4asを用いたPCRによって、フラグメントJが得られた。フラグメントJをpGEMにクローニングして、作成物LC07を得た。

【 0 1 5 6 】

30

11. 相補性プライマTFLC08sdsおよびTFLC08sdsa、ならびにテンプレートとしてLC07を用いて、部位特異的変異誘発を実施した。これによりFR3にV84AおよびN85T 変異が導入された。この作成物はLC08と命名された。

【 0 1 5 7 】

12. 変異Q11L、L15V、E17D、S18RおよびQ37Lを含有するLC05のAgeIからEco01091までのフラグメントをLC08にクローニングする。これにより、作成物LC09が得られた。

【 0 1 5 8 】

13. テンプレートとしてLC09、ならびに相補性プライマLC105およびLC103を用いて、部位特異的変異誘発を実施した。このステップによりFR3にT85N変異が導入され、作成物LC10が得られた。

40

【 0 1 5 9 】

14. テンプレートとしてLC10、ならびに相補性プライマLC115およびLC113を用いて、部位特異的変異誘発を実施した。これによりFR3にD70K変異が導入された。これにより、作成物LC11が得られた。

【 0 1 6 0 】

15. テンプレートとしてLC11、ならびに相補性プライマLC125aおよびLC123aを用いて、部位特異的変異誘発を実施した。これによりFR2にK42Q変異が導入された。これにより、作成物LC12が得られた。

各変異ステップ後、前記の部分的ヒト化および完全ヒト化LCクローンの配列を決定し、これら可変領域の一部を後で発現ベクタtKMC180にクローニングした。

50

【 0 1 6 1 】

軽鎖ヒト化に使用されたオリゴヌクレオチドプライマ
(配列番号63-81、それぞれ記載順)

TFLC 1 as2:

5' TTCGAAAAGTGTACTTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCAG
 3'

TFLC1s2.1:

5'
 ACCGGTGATATCCAGATGACCCAGTCTCC 3' 10

TFLC5s:

5'
 GGTTAGCATGGTATCTGCAGAAACCAGGG 3'

TFLC5as:

5'
 CCCTGGTTTCTGCAGATACCATGCTAACC 3'

TFHC2s:

5' 20
 TACGACTCACTATAG000GAATTGG 3'

TFLC2as1:

5' CCACAGATGCAGACAGGGAGGCAGGAGACTG
 3'

TFLC1asR:

5'
 TTCGAAAAGTGTACTTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTACCAGCACCGAAC G 3' 30

TFLC2s:

5' CCTGTCTGCATCTGTGGGAGATAGGGTCACCATCACATGC 3'

TFLC4as:

5'
 'GATCTCCAGCTTGGTACCCTGACCGAACGTGAATGG 3'

TFLC3as:

5' GTAGGCTGCTGATCGTGAAAGAAAAGTCTGTGCCAGATCC
 3' 40

TFLC3s2:

5'
 CACGATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGTAATTATTACTGTC 3'

TFLC08sds:

5'
 GCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAAG 3'

TFLC08sdsa:

50

5'
CTTGTTGACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGTAGGCTGC 3'

LC105:
5' CAGCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGCAAATTACTGTCAAC
3'

LC103:
5'
GTTGACAGTAATAATTTGCAAAATCTTCAGGCTGTAGGCTGCTG 3' 10

LC115:
5'
CAGTGGATCTGGCACAAAGTTTTCTTTCACGATCAGCAGC 3'

LC113:
5' GCTGCTGATCGTGAAAGAAAACCTTTGTGCCAGATCCACTG
3'

LC125a: 20
5'
CTGCAGAAACCAGGGCAATCTCCTCAGCTCCTG 3'

LC123a:
5'
CAGGAGCTGAGGAGATTGCCCTGGTTTCTGCAG 3'

【 0 1 6 2 】

図5Aは、ヒト 軽鎖定常領域 (配列番号191) の配列を示す。図5Bは、ヒトIgG1重鎖定常領域 (配列番号192) を示す。図6Aは、hFAT (IgG4) 定常領域配列 (配列番号193) を示す。図6Bは、ヒトIgG4重鎖定常領域 (配列番号194) を示す。さらに、公開済み米国特許出願第20030190705号、および前述の免疫グロブリン定常領域配列に関連するさらなる開示のために本願明細書に引用された参考文献を参照。 30

【 0 1 6 3 】

例 2 - ヒト化抗TF抗体の発現および精製

部分的なヒト化および完全ヒト化LCおよびHCクローンを発現ベクタにクローニングした。プラスミドtKMC180を用いて、ヒト 鎖に融合させたLC変異体を発現させ、pJRS 355またはpLAM 356ベクタを用いて、ヒトIgG1またはIgG4に融合させたHC変異体を発現させた。それから、前記HCおよびLCクローンの一部の組み合わせを、COS細胞にコトランスフェクトした。COS細胞に一時的に発現させたIgGを、ELISAによって完全IgGの産生およびTFへの結合についてアッセイした。これらの特定のベクタに関連する開示については、公開済み米国特許出願第20030190705号および本願明細書に引用した参考文献を参照。 40

【 0 1 6 4 】

前記抗TF重および軽可変領域の最終的な完全ヒト化形態 (HC08およびLC09の組み合わせ) を、メガ発現ベクタ (pSUN34、図 2 参照) と呼ばれるベクタにクローニングし、IgG発現のためにCHOおよびNSO細胞へトランスフェクトした。安定にトランスフェクトされ、IgG4 またはIgG1 ヒト化抗TF抗体を産生する細胞株をクローニングした。その後、特定の安定な細胞株を用いて、分析に十分な量のヒト化抗TFを作製した。得られたヒト化バージョンは約100%ヒト由来である (前記CDR配列を考慮しない場合)。前記ヒト化IgG4 バージョン (pSUN35により産生された) はhFATと命名され (humanized IgG Four Anti-Tissue Factor 50

antibody、ヒト化IgG4抗組織因子抗体)、IgG1 パージョン (pSUN34により産生された) はhOAT (humanized IgG One Anti-Tissue Factor antibody、ヒト化IgG1抗組織因子抗体)と命名されている。cH36のこれらの完全ヒト化パージョンは、癌および炎症性疾患などの慢性徴候の治療が意図される。

【0165】

(HC08およびLC09)を発現するNS0細胞株の一つ(OAT-NSO-P10A7)を解凍して、15mLの試験管の中で10% FBS を添加したIMDM培地10mL中に広げ、遠心分離した。細胞ペレットを新鮮培地10mLに再懸濁させ、T25フラスコに移して、5%CO₂中37℃でインキュベートした。中空ファイババイオリアクタに播種するのに十分な数の細胞を調製するために、前記細胞を増量して合計6x10⁸個の細胞を得た。バイオリアクタを製造者の指示マニュアルの通りセットした。収穫された細胞をペレット状にして、35%FBSを含有するIMDM 60mLの中に再懸濁させ、前記バイオリアクタのキャピラリー外空間に注入した。グルコースおよび乳酸塩の濃度を毎日監視して、前記の収穫物を遠心分離してプールした。前記の収穫された物質を、ELISAアッセイによって、抗TF抗体濃度について検査した。その後、抗TF抗体(hFAT)を含有したプールされたサンプルを精製し、後述の通り分析した。

10

【0166】

A. rタンパク質Aセファロース・ファーストフロークロマトグラフィ

組換えヒト化抗TFモノクローナル抗体は、2本の軽鎖と2本の重鎖からなっている。重鎖はマウス可変領域(上述のとおり未変化またはヒト化)とヒトIgG1またはIgG4 Fc領域の融合体であるが、軽鎖はマウス可変領域(上述のとおり未変化またはヒト化)およびヒト領域を含有する。ヒトIgG Fc領域がタンパク質Aまたは組換えタンパク質A(rタンパク質A)に高親和性を有することは十分に確立されている。

20

【0167】

ヒト化抗TF抗体(hFAT)を含有する収穫物プールに、サンプル1mlに対して0.08mlの1 M Tris-HCl、pH 8.0を加えることによって、pH8.0 ± 0.1に調整した。それから、前記サンプルを低タンパク質結合0.22ミクロンフィルタ(たとえば、Nalge Nunc International, Cat. No. 167-0020から入手した、ポリエーテルスルホン膜を有するNalgene社製滅菌ディスプレイ組組織培養フィルタユニット)を通してろ過する。サンプルの用途にしたがって、rタンパク質Aカラム(ファルマシア社製)を、5総容量の20 mM Tris-HCl、pH 8.0で洗浄し、培養液のタンパク質など、未結合の物質を除去する。前記の収穫培地ウシ血清を大量に含有するため、段階的なpH勾配洗浄を用いて、前記から無からウシIgGを除去した。段階的なpH勾配は、バッファA(100mM酢酸ナトリウム)中のバッファB(100mM酢酸)の相対パーセントを上げることによって実現した。典型的なpH段階的洗浄には、20%、40%、および60%のバッファBを用いた。前記カラムを100%バッファBで溶出し、A₂₈₀に基づいて分画を収集した。プールされた分画に1M Tris 塩基を加えてpH8.5に調整した。

30

【0168】

B. Qセファロース・ファーストフロークロマトグラフィ

陰イオン交換クロマトグラフィは、その電荷にしたがってタンパク質を分離するには大変有効である。rタンパク質Aカラムから溶出しpH調整したサンプルを、2倍の容量の水で希釈し、pHを調べて8.5に調整した。それから、そのサンプルを20 mM Tris-HCl、pH 8.5で平衡化したQセファロース・ファーストフロー 5mL(1.6 x 2.5 cm)に装填し、前記カラムを(1)5総容量の20 mM Tris-HCl、pH 8.5、および(2)4総容量の100mM NaClを含有する20 mM Tris-HCl、pH 8.5で洗浄した。それから、前記IgGタンパク質を総容量の500 mM NaClを含有する20 mM Tris-HCl、pH 8.5で溶出した。前記タンパク質のピークをプールして、超ろ過装置を用いてバッファをPBSに交換した。

40

【0169】

50

例3：アカゲザルにおける敗血性ショックモデル

このモデルでは、アカゲザルに敗血性ショックを誘発するために、グラム陰性細菌 (Taylor et al.,

J. Clin. Invest. 79:918-825 (1987))、生大腸菌を注入した。大腸菌によって誘発されたショックは、凝固および炎症の両方を活性化させ、最終的に死に至る。本願発明の抗TF抗体が生大腸菌で処理されたアカゲザルの寿命を延ばす能力を、Taylor et al., supraに記載の敗血性ショックのアカゲザルモデルを用いて調べた。体重3乃至5kgのアカゲザルを研究の前に一晩絶食させ、実験当日の朝、塩酸ケタミン14 mg/kgを筋肉内投与して固定化した。それから、ペントバルビタールナトリウムを、経皮カテーテルから橈側皮静脈に投与し(最初は2 mg/kg、約20乃至45分ごとに6時間、追加量を投与し続ける)、軽度の外科麻酔状態を維持した。大腿静脈を無菌で露出させ、採血とゲンタマイシン投与のために後肢1本にカニューレを挿入した。ゲンタマイシンは、30分間の静脈注入により投与した。大腸菌注入の最後(t=2時間)に、9 mg/kgを注入して投与した。大腸菌注入の6時間後、4.5 mg/kgを注入して投与した。第1日の後、3日間毎日1回、追加のゲンタマイシン(4.5 mg/kg, i.m.)を投与した。各サルを温度コントロールされた加熱パッドに体側が接触するように配置し、直腸温度を監視した。動物には経口挿管して、自発的な呼吸ができるようにした。

10

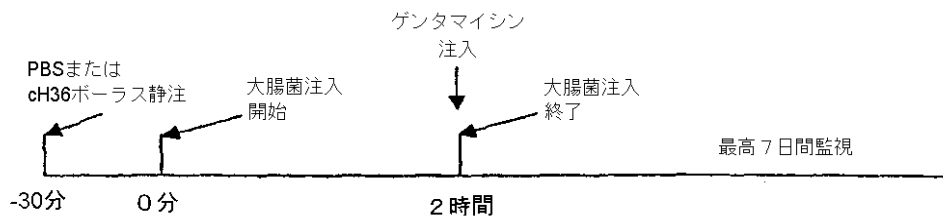
【0170】

大腸菌086:K61H株(ATCC 33985)を、注射の12時間より前に新たに調整した。各サルに、 4×10^{10} CFU/kgの大腸菌を2時間静脈注入した。対照群のサルには大腸菌の注入より30分前にPBSを投与した。処理群のサルは、大腸菌の注入より30分前に抗組織因子抗体(cH36、必要であればPBSで希釈)のボラス投与を受けた(注入スケジュール時間表を参照)。

20

【0171】

抗TF抗体および大腸菌投与の時間表



30

【0172】

すべてのサルを連続8時間監視し、最高7日間まで毎日観察した。観察点は以下の通りである。生存時間は監視して毎時間記録、温度は、最初の8時間は毎時間、その後最高7日間まで一日一回測定して記録した。

【0173】

血液サンプルは、表3に示すとおり、T = -0.5*、0**、1、2、4、6、24時間の時点において採取した。これは、血液学的な参照、および炎症性サイトカインの分析のために行われた。(*T = -0.5、cH36または食塩水対照の注射直前 ; **T = 0、大腸菌注入の直前だが、cH36または食塩水対照の注射から30分後)。

40

【0174】

【表3】

血液サンプル採取スケジュール

時間点	血液学	分析用血漿
第1日; t = -0.5 時間 (テスト物質または賦形剤の注入直前)	X	X
第1日; t = 0 時間 (処理から 30 分後、大腸菌注入直前)	X	X
第1日; 1 時間 (大腸菌注入後)	X	X
第1日; 2 時間 (大腸菌注入後)	X	X
第1日; 4 時間 (大腸菌注入後)	X	X
第1日; 6 時間 (大腸菌注入後)	X	X
第1日; 24 時間 (大腸菌注入後)	X	X
全血容積/時点	1.0 ML	1.8 ML
抗凝固剤	EDTA	クエン酸ナトリウム

10

【0175】

この研究の結果を表4および図7A乃至Dに示す。抗TF抗体cH36は、10 mg/kgのボラス静脈注入として投与した場合(図4)、アカゲザルを大腸菌誘発性敗血症性ショックから順調に防御する一方で、炎症性サイトカインIL-8および1を減少させ、より少ない程度ではあるがIL-6およびTNF-を減少させた(図7A乃至D)。

20

【0176】

【表4】

アカゲザルにおける大腸菌誘発性敗血症ショックへのcH36の防御作用

処理	体重 (kg)	性別	生存時間 (時間)	平均生存時間 (時間)
食塩水	3.6	F	8	16
	4.5	M	24	
Sunol-cH36 (10mg/kg)	3.1	F	>168	>111
	4.0	M	54	

30

【0177】

例4: ヒヒの急性肺損傷モデル

A. 急性肺損傷は、敗血症の罹患および死亡の重要な原因である。グラム陰性敗血症に感染した患者は、急性呼吸窮迫症候群および多臓器不全の罹患率が高い。活性部位不活化因子VIIaで組織因子機能を遮断すると、ヒヒにおいて敗血症誘発性急性肺損傷およびその他の臓器損傷を抑制することが示されている(Welty-Wolf, K. et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med.

40

164:1988 (2001)参照)。急性呼吸器窮迫症候群(ARDS)の重大な病理生理学的特徴は、外因性凝固の局部的活性化および線維素溶解の阻害である。損傷が進行すると、これらのかく乱が微小血管、消化器官、および肺の肺胞の空間における線維素の沈着を引き起こし、それが毛細血管閉塞およびヒアリン膜形成を生じる。炎症細胞におけるTF、トロンピン、および線維素シグナル変化などの外因軽凝固経路の成分が流通し、血管の透過性を上昇させる。凝血原および線維素も、補体活性、炎症促進性サイトカインの産生、線維素溶解の阻害、および損傷肺のリモデリングを含む損傷におけるその他の腫瘍イベントを促進す

50

る。敗血症誘発TF発現は、肺における外因系凝固カスケードを活性化させ、凝血原環境を引き起こし、その結果線維素沈着を生じて炎症を増強することが確立されている。外因系凝固のイベントの開始を阻害することによって、肺における炎症促進イベントおよび障害された線維素ターンオーバーへの作用が修正され、実験的ARDSの最中に重度の構造的および機能的損傷の進行を防ぐことができるかもしれない。最近の研究で、TF因子VIIa複合体における凝固の開始を、第VIIa因子を阻害する活性部位 (FVIIai) またTF経路阻害因子 (TFPI) で抑制すると、敗血症における線維素沈着および炎症が減少し、それにより、ヒヒにおける急性肺損傷 (ALI) およびその他の臓器損傷を抑制するということが実証された。

【0178】

敗血症誘発ALIモデルのためのモデルがヒヒにおいて確立されている。Welty-Wolf, K. et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164:1988

10

(2001)参照。このモデルでは、血流の亢進および全身性炎症応答は、死滅大腸菌の初回刺激注入によって予め活性化させられている。12時間後、生大腸菌の2次投与を行い、敗血症およびARDSを有するヒヒに類似する肺および腎不全を誘発させる。このモデルを用いて、FCIIaiおよびTFPIによるTF機能の阻害によって、全身性炎症応答が減少し、組織における線維素沈着が低減し、および肺および腎損傷が抑制されることが示された。

【0179】

このモデルでは、一晩絶食させた成体ヒヒ (Papio cyanocephalus) をケタミンの筋肉内投与 (20-25 mg/kg) で鎮静させ、挿管した。ケタミン (3乃至10 mg/kg/h) およびジアゼパム (2時間ごとに0.4-0.8 mg/kg) によって、重度の鎮静状態を維持した。動物は、従量式人工呼吸器で機械的に呼吸させ (21% O₂)、呼吸測定の前に断続的なパンクロニウム (4mg 静脈投与) で麻痺させた。血流力学の監視のために、留置動脈経路および肺動脈カテーテルを大腿部切開によって配置した。すべての動物が、約10⁹ CFU/kg の加熱死大腸菌086:K61H (ATCC 33985) を t = 0hの時点で60分間注入として投与され、12時間後に生大腸菌が投与された。敗血症は、t = 12hの時点で、生大腸菌10¹⁰ CFU/kg を50mLの容量にして60分間欠けて注入することによって誘発させた。ゲンタマイシン (3 mg/kg i.v.) およびセフトジジム (1 gm i.v.) を、生大腸菌注入の完了から60分後に投与した。肺毛細血管楔入圧 (PCWP) を8乃至12mmHgに維持し、血圧を支えるために、必要に応じて流動体を与えた。ドーパミンは、平均動脈圧 (MAP) が流動体にもかかわらず65mmHg未満に下がる低血圧の場合に使用した。48時間後 (生細菌注入から36時間後)、動物に強く麻酔をかけ、KCl注入によって屠殺した。心拍数 (HR)、体温、動脈血圧、肺動脈圧、呼吸パラメタ、および流動体の摂取を含む生理学的パラメタを毎時間記録した。報告された熱希釈法、中心静脈圧 (CVP)、PCWP、動脈および混合静脈血ガス、酸素飽和度、酸素含有量およびヘモグロビン (Hgb) によって、心拍出量 (CO) を、6時間ごとに測定した。尿カテーテル排出量は6時間ごとに測定し、流動体バランスは全静脈内流動体摂取量から尿排出量を差し引いて計算した。

20

30

【0180】

各介入の処理有効率の評価は、後述の肺損傷の生理学的、組織学的、および生化学的エンドポイントを用いて、薬物処理された動物の応答を賦形剤処理された動物の応答と比較して行われた。

40

- ・ 生理学的エンドポイントは、肺胞と動脈のO₂量の差 (AaDo₂)、肺系コンプライアンス (CL)、肺動脈圧、肺静脈抵抗性 (PVR)、および組織W/D比として評価した。2次エンドポイントは流動体容積所要量、血清HCO₃、一定PaCO₂におけるV_E、尿排出量、クレチニン、および全身性DO₂、VO₂およびVCO₂である。
- ・ 分析された病理的エンドポイントは、肺、腎、副腎、およびその他の組織における線維素沈着を含む、組織全体の外観および質的光学顕微鏡分析である。
- ・ 生化学的エンドポイントは、組織ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 量、総組織および洗浄タンパク質、ならびに洗浄LDHである。肺および小腸の浮腫は湿潤/乾燥重量で測定した。

血液サンプルは、0、12、13、18、24、36、および48時間経過時点で採取した。血漿 (ク

50

エン酸血から)と血清を分離し、-80 で保存した。血漿サンプルを、ELISAキット (RアンドDシステムズ社、ミネソタ州ミネアポリス) を用いてインターロイキン (IL) 6およびIL 8についてアッセイした。

【0181】

表5に実験プロトコルをまとめる。

【0182】

【表5】

実験プロトコル

時間 (時間)	0	6	12	14	18	124	30	36	42	48		
熱死大腸菌	X											
生大腸菌			X									
抗生物質				X								
賦形剤または薬物				X	X	X	X	X	X	X		
研究*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
屠殺										X		
*研究には、詳細な方法に概説した、血清、血漿、尿および生理学的測定が含まれる。												

10

20

【0183】

遮断は、cH36 Fab には抗体の合計投与量3.5 mg/kg、およびcH36には5.25 mg/kgを用いて行った。テスト用物質の静脈内装填投与 (cH36 Fabについては1.8 mg/kg またはcH36については2.7 mg/kg) は、生細菌の注入から2時間後に開始した。生細菌の注入時点で抗生物質を投与し、その後、cH36 Fab については50 mcg/kg/h、またはcH36については75 mcg/kg/hの一定速度での34時間注入を行った。

【0184】

【表6】

実験デザイン

群	処理	動物番号
1	敗血症 + 賦形剤	5
2	敗血症 + cH36 Fab (合計 3.5 mg/kg, 装填 1.8 mg/kg, 50 mcg/kg/時間 34 時間注入)	2
3	敗血症 + Sunol-cH36 (合計 5.25 mg/kg, 装填 2.7 mg/kg, 75 mcg/kg/時間 34 時間注入)	5

30

40

【0185】

cH36のボラス投与とその後の注入による遮断によって、炎症促進性サイトカインIL-8の全身性発現が減少し、IL-6についてはより少ない程度に減少し (図11A乃至B)、大腸菌を投与したヒビに部分的な腎および肺防御を提供した。暫定的な分析では、cH36投与は平均肺動脈圧、肺系コンプライアンス (図8A乃至B)、および肺胞-動脈酸素勾配の上昇を減少させることが示唆されている。ここまで調査した動物の腎は、剖検では見かけ上全体的に正常であって、前記腎のミエロペルオキシダーゼ量は低いままであって (図9A)、尿排出量は実験中維持されていた。処理動物の小腸の湿/乾燥比は、cH36処理動物の浮腫より

50

も小さい徴候を示す対照動物よりも有意に低かった (図9B)。

【0186】

これらのデータは、TFを標的としたSunol-cH36による凝固遮断が、グラム陰性敗血症における炎症および臓器損傷の進行を抑制することを示している。さらに、これらのデータは、ヒトにおいて抗凝固剤によってARDSを制御する新しい戦略を初めて示している。

【0187】

B. 以下のデータはさらに、cH36およびcH36-Fabが敗血症ヒトの肺損傷を抑制するのに有用であることを示す。

簡単に説明すると、本例のこのパートの目的は、肺における凝固促進-繊維溶解バランスおよび炎症へのSunol-cH36およびcH36-Fabの作用を確認し、それらをヒトの実験的敗血症モデルにおいてALIの構造およびガス交換異常と関連づけることである。上述のセクションAを参照。

【0188】

すべてのヒト (Papio cyanocephalus) は、機械的に呼吸させ (21% O₂)、麻酔して、生大腸菌 (1-2 x 10¹⁰ CFU/kg) 敗血症発病の12時間前に、熱死大腸菌 (1 x 10⁹CFU/kg) を静脈内に投与した。以下の表7に示されるとおり、研究デザインには3つのヒト群から構成された。1番目の群のヒト (n=6) には賦形剤 (PBS) を投与し、対照とした。2番目の群の動物 (n=3) には、cH36-Fabを注射した (合計3.5 mg/kg、ポラス装填投与量は1.8 mg/kg、その後、50 mcg/kg/hを34時間一定に注入)。3番目の群の動物 (n=6) には、cH36を投与した (合計5.25 mg/kg、ポラス装填投与量は2.7 mg/kg、その後、75 mcg/kg/hを34時間一定に注入)。薬物の静脈内装填投与 (cH36 Fabについては1.8 mg/kg またはcH36については2.7 mg/kg) は、生細菌の注入から2時間後 (14時間経過時点) に開始した。生細菌の注入時点で抗生物質を投与し、その後、cH36 Fab については50 mcg/kg/h、またはcH36については75 mcg/kg/hで、48時間経過時点の実験終了時まで一定に注入を行った。14時間経過時点で抗生物質を投与した。処理有効率の評価は、肺損傷の生理学的、組織学的、および生化学的パラメータを用いて、処理された動物の応答を対照の応答と比較して行われた。

【0189】

【表7】

実験デザイン

群	処理	ヒト番号
1	敗血症 + 賦形剤	6
2	敗血症 + cH36 Fab (合計 3.5 mg/kg, 装填 1.8 mg/kg, 50 mcg/kg/時間 34 時間注入)	3
3	敗血症 + Sunol-cH36 (合計 5.25 mg/kg, 装填 2.7 mg/kg, 75 mcg/kg/時間 34 時間注入)	6

【0190】

上述のデータから、cH36で処理された動物は敗血症に対するハイパーダイナミックな全身応答が低めであると結論することができる。

【0191】

本例における実験を行うために、以下の「材料および方法」を必要に応じて用いた。それらは、指示されるとおり、本願開示の他の箇所でも用いた。

【0192】

C. 材料および方法

機械的に呼吸させ (21% O₂) 麻酔したヒト (Papio cyanocephalus) に、生大腸菌 (1-2 x 10¹⁰ CFU/kg) 敗血症発病の12時間前に、熱死大腸菌 (1 x 10⁹CFU/kg) を静脈内に投

10

20

30

40

50

与した。薬物の静脈内装填投与（cH36 Fabについては1.8 mg/kg またはcH36については2.7 mg/kg）は、生細菌の注入から2時間後（14時間）に開始した。生細菌の注入時点で抗生物質を投与し、その後、cH36-Fab については50 mcg/kg/h、またはcH36については75 mcg/kg/hで一定に注入した。抗体の合計投与量は、cH36 Fab については3.5 mg/kg、およびcH36については5.25mg/kgだった。処理の開始はグラム陰性敗血症の発症後だった。なぜなら、本願発明者らは以前、TF遮断は救済戦略として有効だということを示しているからである。初期の研究がFabと比べて完全抗体の方が有効性が大きく有害作用がないことを示唆していたため、未処理敗血症対照とcH36完全抗体で処理した敗血症動物を比較した。表7に実験群を示す。統計学的解析には、生理学的データ用にはANOVA、ならびに生化学的およびBALデータ用にはt検定またはマン・ホイットニー-Uを使用した。データは平均t標準誤差として表し、p値を示す。

10

【0193】

動物の取り扱いには適切なガイドラインに従って行われた。前記の動物は処理群と敗血症対照群に無作為に分けられた。一晚絶食させた後、各動物にケタミン（20乃至25 mg/kg）を筋肉内投与して沈静化させた。ケタミン（3乃至10 mg/kg/h）およびジアゼパム（2時間ごとに0.4-0.8 mg/kg）によって、重度の鎮静状態を維持した。動物は、従量式人工呼吸器で呼吸させ、呼吸測定の前に断続的なバンクロニウム（4mg 静脈投与）で麻痺させた。FiO₂は0.21、1回換気量は12 ml/kg、呼気終末陽圧は2.5 cm H₂Oであって、動脈PCO₂を40 mmHgに維持できるように速度を調節した。血流力学の監視のために、留置動脈経路および肺動脈カテーテルを大腿部切開によって配置した。前記動物は、生大腸菌注入開始（14時間）から2時間後に、硫酸ゲンタマイシン（3 mg/kg iv）およびセフトジジム（1 gm iv）を投与された。前記動物は、肺毛細血管楔入圧（PCWP）を8乃至12mmHgを維持するのに十分な速度で静脈大量注入（乳酸リンゲル液）して維持した。必要に応じてドーパミンを使用し、平均動脈圧を60mmHgに維持した。48時間後（生細菌注入から36時間後）、動物に強く麻酔をかけ、KCl注入によって屠殺した。予め規定された早期終了の基準には、低血圧（ドーパミンおよび十分なPCWPにも関わらずMAPが60mmHg未満になったとき）、低酸素血症（F102が40%を越えるのに必要）、または難治性代謝性アシドーシス（pH < 7.10 で正常PaCO₂）が含まれた。実験プロトコルは、上述の表5に示されるものと同じである。

20

【0194】

心拍数（HR）、体温、動脈血圧、肺動脈圧、呼吸パラメタ、および流動体の摂取を含む生理学的パラメタを毎時間記録した。熱希釈法、中心静脈圧（CVP）、PCWP、動脈および混合静脈血ガス、酸素飽和度、酸素含有量およびヘモグロビン（Hgb）によって、心拍出量（CO）を、6時間ごとに測定した。尿カテーテル排出量は6時間ごとに測定し、流動体バランスは全静脈内流動体摂取量から尿排出量を差し引いて計算した。

30

【0195】

血液サンプルは、0、12、13、18、24、36、および48時間経過時点で採取した。全血において、完全血球算定を行った（Sysmex-1000 血球計算板、シスメックス社、イリノイ州ロンググロブ）。血漿（クエン酸血から）と血清を分離し、-80 で保存した。フィブリノゲンの測定には、ST4機械式凝固測定装置（ダイアグノスティカ・スタゴ社、ニュージャージー州パーシッパニー）を用いた。プロトロンビン時間（PT）および活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）を2回測定し、抗トロンビン（ATHI）活性はMDA凝固分析装置（オーガノン・テクニカ社、ノースカロライナ州ダラム）で色素産生性アッセイによって測定し、キットの標準の%で表した。ELISAを用いて、血漿およびBAL中の血漿トロンビン-抗トロンビン（TAT）複合体を測定した（デイド・ベーリング社、イリノイ州ディアフィールド）。血液およびBAL中のcH36およびcH36-Fab値をSunol Molecular（ミラマー社、フロリダ州）によって測定した。血清サンプルを、ELISAキット（RアンドDシステムズ社、ミネソタ州ミネアポリス）を用いてインターロイキン1（IL、1）、IL-6およびIL、8、TNF受容体-1（TNFR-1）についてアッセイした。血中クレアチニンは標準的な臨床技術を用いて測定した。

40

【0196】

50

組織の収集は以下の通り生検によって行った。前記実験後、胸部を開いて左主気管支を結紮して、左肺を取り出した。左上葉に0.9%食塩水240mLを使用してBALを行った。左下葉から採取した肺組織サンプルを手動で膨らませ、4%パラホルムアルデヒドに浸して光学顕微鏡検査を行った。湿/乾重量測定のために、左肺の残りからサンプル4体を大きい血管および肺構造を避けるように注意しながらランダムに取り出した。肺、腎、肝、小腸、心、および副腎から採取したさらなるサンプルを液体窒素で瞬間凍結させて、-80 で保存した。右肺全体を、15分間かけて固定圧力30cmで、2%グルタルアルデヒドの0.85M カコジル酸ナトリウムバッファ溶液 (pH 7.4) を用いて、膨張固定させた。腎、肝、小腸、心、および副腎から採取したさらなる組織を、4%パラホルムアルデヒドに浸して固定した。4体の小腸サンプルを、湿/乾重量測定のためのランダムに選択した。

10

【0197】

肺ホモジネートのミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性およびタンパク質濃度、ならびにBAL液のタンパク質および乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) を上述のとおり測定した (Am J Resp Crit Care Med 1998;157;938)。MPO活性は、吸収量/分/組織の湿重量gを単位とする変化量として表した。LDH値は、1Lあたりの単位活性 (U/L) として表した。

以下の例の重要な目的は、肺の凝固促進因子-線維溶解バランスおよび炎症へのcH36およびcH36-Fabの作用を決定することであった。さらに、これらのパラメータと、ヒヒの実験的敗血症におけるALIの構造異常およびガス交換異常との相関をとることも目的である。

【0198】

D. 結果： cH36処理は、大腸菌敗血症を罹患するヒヒにおけるフィブリノゲン欠乏を抑制する。

20

簡単に説明すると、cH36処理は、フィブリノゲン欠乏およびTAT複合退形成を減少させた。これは凝固のTF活性化の障害と一致する。敗血症対照では、フィブリノゲンは初期値の約50%まで減少したが、cH36で処理された動物では、平均フィブリノゲン値は基底値を下回ることはなかった (図10A、敗血症対照に対して $p < 0.01$)。PTの上昇は、敗血症対照では進行性凝固障害の間に認められ、処理動物でも前記薬物注入の薬理学的作用中に認められた。cH36-Fab 処理動物3頭のPTおよびフィブリノゲン値も比較のために示す。cH36-Fab 処理動物における減少値を完全抗体で処理された動物と比較すると、Fab断片のTF親和性がより低いことが示唆される (図10A、B)。PTTは両方の群で上昇し、有意差はなかった。両方の群において、生細菌の注入後TAT複合体が上昇し、14時間経過時点をピークとして、その後減少した。cH36で処理された動物は、ピークTAT値が低く、減少速度もより速かった (図10D、 $p < 0.01$)。TAT複合体形成における差違は、ATIII値の差違によるものではなかった。なぜなら、これら2つの群においてATIIIは同様に減少し、実験の終了時まで初期値の35乃至40%になった。

30

【0199】

E. 結果： SunoI-cH36 による処理で敗血症誘発性急性肺損傷が減少する。

cH36 は確立された大腸菌敗血症を有するヒヒにおけるALIを低減し、敗血症誘発性のガス交換における異常、肺高血圧、および肺系の伸展性の欠失が減少した。これらの生理学的データを、図8A乃至Cに示す。肺動脈酸素勾配 (AaDO₂, mmHg) は、両群とも、死滅細菌の注入後に上昇し、12時間経過時点における生細菌性敗血症の発症後、敗血症対照群では進行性に悪化した。敗血症対照動物と比較して、cH36による処理によって、敗血症の間のガス交換の進行性の悪化を抑制した ($p = 0.001$ 、図8A)。前記敗血症対照群の動物1頭は、生細菌敗血症の発症後、進行性の低酸素血症のために酸素補給を要した。cH36処理群の動物1頭も酸素を要したが、18乃至22時間の間だけであって、酸素負荷は次第に向上し、酸素補給を減衰させて大気にもどした。前記実験の終了時、前記動物のAaDO₂は、熱死または生細菌の注入前に測定した初期値に回復した。平均肺動脈圧 (PAM, mmHg) における敗血症誘発性の上昇はcH36 によって低減したが (未治療敗血症対照に対して $p < 0.0001$ 、図8B)、肺血管抵抗性に差はなく、このことから、これは前記処理動物の心拍出量への作用によるものだと示唆される。cH36は、敗血症対照動物に見られる肺系の伸展性 (Cst in mL/cm H₂O) の低下も抑制した ($p < 0.01$ 、図8C)。両方の群において、PaCO₂を35乃至4

40

50

5 mmHgの正常範囲内に制御したが、敗血症対照では分時換気量 (V_E , 1/min, $p=0.015$) が20%高かったにもかかわらず $PaCO_2$ はわずかに高かった ($P=0.03$)。このことから、cH36は死腔では敗血症誘発性の上昇を低減したことを示唆した (表7)。

【0200】

解剖時、敗血症対照動物の肺は密度が高く出血していた。cH36で処理した動物の肺の全体的な外観は改善されており、一部の動物では正常の未損傷ヒヒの肺と同一の外観だった。2つの群において肺の湿/乾重量に有意差はなく、敗血症対照 6.32 ± 0.66 に対してcH36処理動物 5.57 ± 0.34 であった ($p=NS$ 、正常参照値の範囲は4.6乃至5.0)。BALタンパク質およびLDHも、2つの群の間に有意差はなかった。BALタンパク質は、敗血症対照では 1.0 ± 0.3 に対してcH36処理動物では 1.0 ± 0.4 、およびLDHは敗血症対照では 23.9 ± 10.6 に対してcH36処理動物では 10.6 ± 3 だった。ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性 (OD/分/g 湿重量) で測定した好中球の蓄積は、cH36処理動物では40%超減少した ($p=0.07$)。

10

【0201】

肺の組織学検査では、cH36で処理された敗血症動物において予防を示した。敗血症対照動物の肺では、肺胞中核が厚くなり、斑点状の肺胞浮腫および出血、ならびにマクロファージおよびPMNを有する肺胞下炎症性細胞浸潤を有した。処理動物の肺は肺胞中核構造が改善され、肺胞PMN浸潤が減少し、肺胞浮腫が少なく、肺胞出血は認められなかった。

【0202】

例5: cH36による処理は、敗血症における腎機能を改善し臓器損傷を減少させる

本例を実行するために用いる材料および方法は既述のとおりである。たとえば、例4を参照。

20

【0203】

cH36による処理は、敗血症における腎機能を改善した。生大腸菌注入後のcH36処理動物の尿排出量を未処理対照と比較したところ、有意に高くなった ($p < 0.001$)。これは、蘇生の差によるものではなかった。なぜなら、2つの群の流動体バランスおよび全身の血行力学が類似しているためだった。血中pHおよび血漿 $[HCO_3^-]$ は、未処理動物では低く (両方とも $p < 0.0001$)、値は敗血症対照における代謝性と呼吸性の混合性アシドーシスと一致した。実験の終了時の血清クレアチニンは2つの群において差はなく、処理群において変動があったが、それは防御されない動物が1頭存在したためだった。

【0204】

図13A乃至C参照 (対照およびcH36抗体の平均尿排出量 (13A)、平均血液pH (13B)、および血清重碳酸塩値 (13C) を示す)。

30

【0205】

解剖時の未処理動物の腎臓は膨潤し出血していたが、cH36処理動物よりも正常に見えた。未処理動物の腎臓のH&E染色断片には、急性尿細管壊死 (ATN) および糸球体損傷が斑点状から広範囲の領域にわたって認められた。処理動物の腎臓には、数カ所のATNの小病巣を除き、正常な腎臓構造が認められた。処理動物の腎臓のMPO値は有意に減少した ($p=0.01$)。

【0206】

その他の臓器損傷もcH36処理動物では改善した。未処理動物の副腎は膨潤して出血しており、小腸は全体的に浮腫を帯びていた。反対に、副腎および小腸はcH36で処理された動物ではほとんど正常な外観だった。cH36で処理した敗血症動物の小腸の湿/乾重量は減少した (Sunol-cH36 で処理した動物では 6.46 ± 0.62 、対して未処理敗血症対照動物では 9.70 ± 1.05 , $p = 0.01$)。組織学では、小腸の浮腫に改善が確認された。副腎も、敗血症から保護され、鬱血および出血が減少し、細胞損傷の範囲も著しく小さくなった。肺および腎における好中球含有量の減少に加えて、cH36処理は、肝臓におけるPMN含有量を有意に減少させ ($p=0.05$)、組織学は幹細胞への損傷の減少を示した。

40

【0207】

例6: cH36処理で、敗血症誘発性貧血が減少した

本例を実行するために用いる材料および方法は既述のとおりである。たとえば、例4を

50

参照。

【0208】

両方の群の動物が、生大腸菌の注入後、好中球減少症、血小板減少症、および貧血を発症した（下記の表8を参照）。両方の群でヘモグロビン（Hgb）が減少したが、c1436で処理した敗血症動物では有意に高かった（48時間経過時点で 8.1 ± 0.7 に対して 10.8 ± 0.8 g/dL、 $p < 0.0001$ ）。血小板は未処理動物でより迅速に減少したが（ $p < 0.0001$ ）、この差の臨床的な有意性は明らかではない。すべての動物が、生大腸菌の注入後、進行性の血小板減少症を発症し、実験の終了時点における平均血小板数は両方のグループとも約30,000以下だった。注入後（ $t = 14$ 時間）、両方の群の白血球数の最低数は約1,000乃至1,500（ $\times 10^3 / \mu\text{L}$ ）だったが、実験終了時までには基準値まで徐々に増加した（処理動物では $12,680 \pm 2,012$ 、対して未処理動物では $10,500 \pm 1,336$ 、 $p = 0.07$ ）。2頭の敗血症対照動物が自己限定性血尿を生じた。両方の群のほとんどの動物に、研究のある時点で吸引に伴う血染性分泌物が認められたが、cH36処理動物には有意な出血の臨床的なエビデンスは認められず、いずれの群にも重症なまたは致命的な出血性の合併症は生じなかった。

10

【0209】

【表8】

時間 (時間)	0	12	18	24	36	48	p 値
Hgb (g/dL)							
敗血症	112±0.3	10.610.3	10.410.5	10410.8	8.7±0.8	8.1 ±0.7	
cH36	12.1 10.5	11.8 ± 0.4	12210.5	12.4 ± 0.6	10.9 ± 0.8	10.8 ± 0.8	<0.0001
cH36Fa b	11.7±0.3	11.5±0.5	125±0.8	11.4 0.3	11.3±0.4	9_6±0.1	
血小板							
敗血症	194±15	126±12	59±7	33±5	24±5	26±9	
cH36	206 t 15	167 ± 16	110 1 13	64 ± 12	40 t 4	30 ± 4	<0.0001
cH36 Fab	197 t 8	146 1 4	87 ± 10	31 1 5	21 ± 4	25	
心拍数(回/分)							
敗血症	95 ± 6	116 1 10	125 ± 9	129±9	125 ± 5	127 ± 16	
cH36	84 ± 3	101 ± 4	135 ± 13	123 ± 11	105112	99 ± 9	<0.01
cH36 Fab	75 ± 7	89 ± 9	107± 14	109 ± 9	98 ± 15	98 ± 9	
MAP (mmHg)							
敗血症	111± 2	10412	99±9	102 ± 7	79 ± 10	78 ± 13	
cH36	102± 3	93 ± 3	97 ± 5	92:t 6	78t9	86 ± 5	NS
cH36 Fab	108 ± 4	85 ± 4	89 ± 9	78 ± 8	89±4	63 ± 4	
CO/kg							
敗血症	0.16± 0.01	0.20 ± 0.02	0.2310.04	0.22 t 0.03	0.22 t 0.04	0.23 ± 0.02	
CH36	0.15 ±0.01	0.18±0.01	0.16 ± 0.02	0.16 0.02	0.15 0.02	0.19 ±0.01	<0.0001
cH36Fa b	0.12±0.01	0.14±0.01	0.12±0.01	0.15 0.01	0.14±0.01	0_14±0.02	
Do2/kg							
敗血症	23.2 t 2.2	28.1 ± 3.1	28.6 ±4.1	26.2 ± 2 0	22.7 ± 243	20.1 ± 12	
cH36	23.8 t 1.8	28.0± 1.0	23.8 12.4	24.9 ± 3.5	23.1 t 26	24.6 t 2.1	NS
cH36Fa b	18.1±1.6	21.8±2.1	19.5 1.8	20.9±2.7	21.1±1.8	16.4±1.4	
V_{o2}/kg							
敗血症	5 4 ± 0.8	6.3 1 1.4	6.7 1 0.6	6.8 ± 1.3	5.7 ± 0.6	5.6 ± 0.7	
cH36	5.6±0.4	6.6±0.2	6.2±0.4	5.6±0.7	6.1±0.6	6.2±0.3	NS

10

20

30

40

cH36Fa	4.0±0.3	4.2±0.2	3.710.4	4.6±0.3	3.7±0.2	4.2±0.2	
b							
SVR*kg							
敗血症	56602±545	41539±5049	35290±49	37788±567	30713±91	26161±5750	
	9		41	5	52		
cH36	50833t	37936 ± 895	49953	±46811	±37432	±36058	±
	3782		8998	6290	3612	4362	'''
cH36	69095	±43890	±52763	±39545	±46570	±32243	±
Fab	2475	5700	7023	7126	5101	8576	
PCWP							
敗血症	10±1	11±1	10±1	11±1	12 t1	11±1	
cH36	10±0	10±0	9±1	911	11 t2	911	NS
cH36Fa	12 t0	14±1	1011	10±1	11±1	12±2	
b							
Ve							
敗血症	3.5±0.3	3.5±0.2	3.8±0.2	4.210_2	50±0.5	5.1±0.4	
cH36	3.7±0.1	3.9±0.2	4.0±0.2	43±0.2	44±0.3	4.3±0.2	=0.015

【 0 2 1 0 】

臨床的および組織学的評価を行い、抗組織因子の注射によって、これらのマウスの関節リウマチの発症が阻害されたことを確認した。

【 0 2 1 1 】

上述の例および考察から、cH36で処理された動物は敗血症に対するハイパーダイナミックな全身応答が低めであるということが明らかになった。平均動脈圧 (MAP)、PCWP、体血管抵抗*kg (SVR*kg)、VO2、およびDO2を含む、ほとんどの全身的な血行力学的測定値は、cH36による処理では変化しなかった (表8)。両方の群において、静脈輸液およびドーパミン注入に反応して、低血圧が生じた。12頭のうち9頭の動物が、前記プロトコルの終了予定時点まで生存した。総じて、cH36で処理した敗血症動物は、生細菌敗血症の発症後、高心拍出量が低く、心拍出量 (CO/kg) にさらなる上昇はなく、実験終了時点における頻脈は小さく、体血管抵抗性*kg (SVR*kg) は高かった (たとえば表7)。たとえば、処理動物は未処理対照と同様にドーパミンおよび輸液サポートが必要で、MAPおよびSVRは2つの群の間で検出可能な差はなかった。生存はエンドポイントとして使われることを意図されておらず、動物は48時間経過時点においてすべて屠殺した。3頭の敗血症動物をcH36-Fab で処理し、完全抗体とFab断片の違いについて評価した。予想通り、前記完全抗体は前記Fab断片よりも効果的であることが多かった。

【 0 2 1 2 】

例7： 炎症促進性サイトカイン値へのcH36の影響

サイトカイン値を、すでに上述されている血清およびBAL液中で測定した (たとえば例5)。循環血液中では、cH36処理によってIL-8は減少したが (p<0.01、図12)、IL-1、またはTNFR-1への検出可能な作用はなかった。BAL液では、cH36によってIL-6、IL-8およびTNFR-1の上昇は減少した。BALサイトカイン値を、下記の表9に示す。本願発明者らは、処理動物および未処理動物の血清またはBALの可溶性トロンボモジュリン (sTM) も測定したが、差は認められなかった。データは、TF-FVIIa複合体上のFX結合部位を遮断するためのSunol-cH36を用いた凝固の阻害が、肺胞のコンパートメント中の炎症促進性サイトカイン値への作用によって、少なくとも部分的に急性肺損傷を減少させたことを示す。これは

、局所サイトカイン産生および/または肺胞上皮全体の循環からのタンパク質漏出への作用だと考えられる。

【0213】

【表9】

BAL サイトカイン値

	敗血症対照	Sunol-cH36	値	cH36-Fab
IL-6 mL	600+ 269	506 ± 522	0.05	1159 ± 435
IL-8 mL	1081± 448	224 ±176	0.037	1478 ± 755
IL-1 .g mL	6.9 ± 1.5	7.9± 3.1	NS	8.5 f 1.8
TNFR1 mL	294 ±126	107 ± 31	0.09	167 f_93
sTM (ng/mL)	1.67 ± 0.54	10.9±0.11	NS	2.17 ± 0.72

【0214】

例4乃至7の結果の一部を以下のようにまとめることができる。

平均動脈圧 (MAP)、酸素消費量 (VO_2/kg)、および酸素輸送量 (DO_2/kg) を含む、ほとんどの全身的な血行力学的測定値は、cH36による処理では変化しなかった (表8)。平均肺毛細血管楔入圧 (PCWP) は、敗血症対照動物の方がわずかに高かったが ($p<0.01$)、両方のグループとも本研究の設定パラメータの範囲内だった。耐血管抵抗*kg (SVR*kg) は処理動物の方がわずかに高かった ($p< 0.05$ 、表3)。両方の群において、静脈輸液およびドーパミン注入にตอบสนองして、低血圧が生じた。12頭のうち9頭の動物が、前記プロトコルの終了予定時点まで生存した。2頭の敗血症対照動物が、ALIの予定終了時点の前に、難治性低酸素血症および呼吸性アシドーシスで死亡した。1頭は30時間経過時点、もう1頭は38時間経過時点だった。H36群の動物1頭は防御されず、難治性低酸素血症および代謝性アシドーシスで36時間経過時点で死亡した。その動物の場合、防御の欠如は低薬物値に関連していた。総じて、cH36で処理した敗血症動物は、生細菌敗血症の発症後、高心拍出量性が低く、心拍出量 (CO/kg) にさらなる上昇はなく、実験終了時点における頻脈は小さく、1kgあたりの体血管抵抗性 (SVR*kg) は高かった (表7)。

【0215】

例8：cH36-Fab (Fab断片) を有するヒヒの処理

3頭の敗血症動物をcH36-Fab で処理し、完全抗体とFab断片の使用の違いを探した。一般的な処理プロトコルは、すでに上述されている手順に従った。前記群は詳細な統計分析のためには小さすぎるが、そのデータから、Fab断片が、高TAT値および敗血症対照に類似したフィブリノゲン欠乏を有する、凝固の敗血症誘発性活性化の減少に効果を有することが示唆された。しかし、その効果は完全抗体を用いた場合の結果と比べると小さかった。相応して、ガス交換 (AaDO₂)、肺高血圧 (PAM)、および肺伸展性 (Cst) の一貫した向上性は、完全cH36抗体で処理された動物よりも小さかった。生化学的には、肺MPO値は敗血症対照と類似していた。理論に拘束されることは望まないが、cH36およびそのFab断片の間の作用の差は、前記動物モデルにおける前記Fab断片のTFへの低親和性によるものであろう。

【0216】

例9： ヒト組織因子を発現するトランスジェニックマウスにおけるコラーゲン誘発性関節炎の抗組織因子阻害

コラーゲン誘発性関節炎 (CIA) は、マウスの感受性株にII型コラーゲンで免疫して誘発させた、関節リウマチの確立された実験モデルである。関節リウマチの病因における免疫が介在した機序に加えて、組織因子によって始まる凝固カスケードの活性化もこの疾患の進行に関連していると考えられている。凝固の活性化によって生じる罹患関節の線維素沈着は、滑膜の肥厚および関節炎症に関与すると考えられている。抗組織因子抗体での処理が関節リウマチの発症を抑制するかどうかを調べるために、マウスにcH36を注射する。

【0217】

CIAを誘発するために、7乃至12週齢のマウスの尾部の付け根に、完全フロインドアジュバントに乳化させたII型コラーゲン100 μ gを皮下注射し、第21日に不完全フロインドアジュバントに乳化させたII型コラーゲン100 μ gを追加注射する。追加注射の直前に、マウスに抗組織因子抗体0.3mgを静脈注射する（対照群にはPBSを注射する）。その後、抗組織因子抗体（0.3 mg）を、毎週、研究が終わるまで注射する（対照群にはPBSを注射する）。

【0218】

動物の足の赤みおよび膨潤について評価し、臨床的なスコアは一週間に3回割り当てられた。臨床的な重篤度のスコアは、以下の通りである。親指以外の膨潤した各指に1点（最高4点）、足根骨または手根骨の関節に1点、および中足骨または中手骨の関節に1点であって、後足に最高6点、ならびに前足に5点である。足は1本ずつ点数化され、マウス1匹あたりの積算臨床関節スコアは最大22点になりうる。

10

【0219】

本願仮出願は、2001年10月29日に提出された米国仮出願USSN 60/343,306号の優先権を主張する、2001年11月21日に提出された米国出願第09/990,586号に関連する、公開済み米国特許出願第20030190705号に関連する情報を有する。米国特許出願第09/990,586号は、米国出願第08/814,806号（現在は米国特許第5,986,065号）の分割出願である、米国出願第09/293,854号（現在、米国特許第6,555,319号）に関連し、米国出願第10/230,880は米国出願第09/990,586号の優先権を主張する。米国出願第10/230,880号、09/990,586号、60/343,306号、および米国特許第5,986,065号ならびに6,555,319号の開示は、それぞれ引用により援用される。さらに、公開済み米国特許出願第20030190705号の開示も引用により援用される。

20

【0220】

本願仮出願はさらに、2003年6月19日に提出された米国仮出願第60/480,254号に関連する。本仮出願の開示は引用により援用される。

【0221】

本願発明は、その好ましい実施態様に関して詳細に記述されている。しかし、当業者が本願開示を考慮した上で、本願発明の精神および範囲から逸脱しなければ、改変および変更が可能であるということは明らかであろう。本願明細書に開示されたすべての参考文献は、引用により本願明細書に援用される。

30

【図面の簡単な説明】

【0222】

【図1】 1Aおよび1Bはマウス抗組織因子抗体H36.D2.B7の軽鎖および重鎖可変領域の核酸（配列番号1および3）およびアミノ酸配列（配列番号2および4）を示し、その超可変領域（CDR、相補性決定領域）には下線が施されている（単一下線は核酸配列、2重下線はアミノ酸配列）。

【図2】 ヒト化抗TF IgG1抗体発現ベクター（pSUN-34）のプラスミドマップを示す。

【図3】 図3A乃至Dは抗TF抗体の部分および完全ヒト化軽鎖（LC）可変領域の配列である（配列番号82-128）。図3Aは、完全ヒト化LCフレームワークの代表であるLC-09と命名された配列を示す（配列番号110-113）。cH36およびLC-09軽鎖CDR配列は図3B乃至Dに示される（それぞれ配列番号126-128）。

40

【図4】 図4A乃至Dは抗TF抗体の部分および完全ヒト化重鎖（HC）可変領域の配列である（配列番号129-190）。図4Aは、完全ヒト化HCフレームワークの代表であるHC-08と命名された配列を示す（配列番号161-164）。cH36およびLC-08重鎖CDR配列は図4B乃至Dに示される（それぞれ配列番号185-190）。

【図5】 図5A乃至BはIgG1抗組織因子抗体（hOAT）のヒト定常領域を示す配列であって、図5Aはヒト軽鎖定常領域（配列番号191）を示し、図5BはヒトIgG1重鎖定常領域（配列番号192）を示す。これらの図はhOAT（IgG1）定常領域アミノ酸配列を示す。

【図6】 図6A乃至BはIgG4抗組織因子抗体（hFAT）のヒト定常領域を示す配列であって、図6Aはヒト軽鎖定常領域（配列番号193）を示し、図6BはヒトIgG4重鎖定常領域（配

50

列番号194)を示す。

【図7】 図7A乃至Dは、致死性敗血症モデルの生大腸菌注入後のアカゲザルにおける、血漿IL-6およびIL-8(図7A乃至B)濃度(図7A乃至B)、またはIL-1 およびTNF-濃度の変化を示すグラフである。

【図8】 図8A乃至CはcH36が敗血症誘発性急性肺損傷(ALI)を減少させることを示すグラフである。図中、AaDO₂はmmHg、時間は時間、肺系伸展性(Cst)は水ml/cm、および肺動脈圧(PAM)はmmHgである。

【図9】 図9A乃至Bはヒヒにおける腎ミエロペルオキシダーゼ(A)および小腸乾/湿重量比(B)を示すグラフである。

【図10】 図10A乃至DはヒヒにおいてcH36が敗血症および関連症状を減少させることを示すグラフである。cH36は敗血症誘発性凝固障害を減少させる(フィブリノゲンはmg/DL、時間は時間、部分プロトロンビン時間(PPT)は秒、およびTATはmg/L)。

【図11】 図11A乃至Bは、血清IL-8(A)およびIL-6(B)の上昇がcH36での処理によって減少することを示すグラフである。

【図12】 気管支肺胞清掃IL-8、IL-6、およびTNFR1値がcH36での処理によって減少することを示すグラフである。

【図13】 図13A乃至Cは、対照およびcH36抗体で処理されたヒヒにおける平均尿排出量(13A)、平均血中pH(13B)、および血清炭酸水素塩値(13C)を示すグラフである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> JIAO, JIN-AN
WONG, HING C.
EGAN, JACK O.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR
TREATING COAGULATION
RELATED DISORDERS

<130> TNA-009.01

<140> 11/311,702
<141> 2005-12-19

<150> PCT/US04/017900
<151>
2004-06-04

<150>
60/538,892
<151>
2004-01-22

<150>
60/480,254
<151>
2003-06-19

<160>

10

20

30

40

50

196

<170>

Patent In Ver. 3.3

<210> 1

<211>

321

<212>

DNA

10

<213>

Mus musculus

<220>

<221>

CDS

<222>

(1)..(321)

<400> 1

20

gac att cag

atg acc cag tct cct gcc tcc cag tct gca tct ctg gga 48

Asp Ile Gln

Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

gaa agt gtc

acc atc aca tgc ctg gca agt cag acc att gat aca tgg 96

30

Glu Ser Val

Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Asp Thr Trp

20

25

30

tta gca tgg

tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct cag ctc ctg att 144

40

Leu Ala Trp

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile

35

40

45

tat gct gcc

acc aac ttg gca gat ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu

Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe

50

Ser Gly

50

55

60

agt gga tct ggc aca aaa ttt tct ttc aag

atc agc agc cta cag gct

240

Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys

Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65

70

75

80

10

gaa gat ttt gta aat tat tac tgt caa caa

gtt tac agt tct cca ttc

288

Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln

Val Tyr Ser Ser Pro Phe

85

90

95

20

acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg

aaa

321

Thr Phe Gly Ala

Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100

105

30

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala

Ser Leu Gly

40

1

5

10

15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala

Ser Gln Thr Ile Asp Thr Trp

50

20
25
30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile

35
40
45

10

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu
Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
Ser Gly

50

55
60

Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys
Ile Ser Ser Leu Gln Ala

20

65
70
75
80

Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln
Val Tyr Ser Ser Pro Phe

85
90
95

30

Thr Phe Gly Ala
Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100
105

40

<210> 3
<211> 351
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (351)

<400> 3

50

gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag
ctg gtg aag cct ggg gct

48

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

1

5

10

15

10

tca gtg cag gta tcc tgc aag act tct ggt
tac tca ttc act gac tac

96

Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

20

aac gtg tac tgg gtg agg cag agc cat gga
aag agc ctt gag tgg att

144

Asn Val Tyr Trp Val Arg Gln Ser His Gly
Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

30

gga tat att gat cct tac aat ggt att act
atc tac gac cag aac ttc

192

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Ile Thr
Ile Tyr Asp Gln Asn Phe

50

55

60

aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag
tct tcc acc aca gcc ttc

240

Lys Gly Lys Ala

Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr
Ala Phe

65

70

75

80

40

50

atg cat ctc aac agc ctg aca tct gac gac
tct gca gtt tat ttc tgt

288

Met His Leu

Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

10

gca aga gat

gtg act acg gcc ctt gac ttc tgg ggc caa ggc acc act 336

Ala Arg Asp Val Thr Thr

Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly

Thr Thr

100

105

110

20

ctc aca gtc tcc tca

351

Leu Thr Val

Ser Ser

115

<210> 4

<211>

117

<212>

PRT

<213>

Mus musculus

30

<400> 4

Glu Ile Gln

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

1

5

10

15

40

Ser Val Gln

Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

50

Asn Val Tyr
Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35
40
45

Gly Tyr Ile
Asp Pro Tyr Asn Gly Ile Thr Ile Tyr Asp Gln Asn Phe
50

10

55 60

Lys Gly Lys Ala
Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr
Ala Phe

65
70
75
80

20

Met His Leu
Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85
90
95

Ala Arg Asp Val Thr Thr
Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
Thr Thr

30

100
105
110

Leu Thr Val
Ser Ser
115

40

<210> 5
<211> 7
<212>
PRT
<213>
Mus musculus

<400> 5
Leu Ala Ser

50

Gln Thr Ile Asp

1

5

<210> 6

<211> 7

<212>

PRT

<213>

Mus musculus

10

<400> 6

Ala Ala Thr

Asn Leu Ala Asp

1

5

<210> 7

<211> 9

<212>

PRT

<213>

Mus musculus

20

<400> 7

Gln Gln Val

Tyr Ser Ser Pro Phe Thr

1

5

30

<210> 8

<211> 6

<212>

PRT

<213>

Mus musculus

40

<400> 8

Thr Asp Tyr

Asn Val Tyr

1

5

<210> 9

<211> 17

50

<212>

PRT

<213>

Mus musculus

<400> 9

Tyr Ile Asp Pro

Tyr Asn Gly Ile Thr Ile Tyr Asp Gln Asn Phe Lys

1

5

10

15

Gly

10

<210> 10

<211> 8

<212>

PRT

<213>

Mus musculus

<400> 10

Asp Val Thr

Thr Ala Leu Asp Phe

1

5

30

<210> 11

<211> 21

<212>

DNA

<213>

Mus musculus

<400> 11

ctggcaagtc

agaccattga t

21

40

<210> 12

<211> 21

<212>

DNA

<213>

Mus musculus

50

<400> 12
 gctgccacca
 acttggcaga t
 21

<210> 13
 <211> 28
 <212>
 DNA
 <213>
 Mus musculus

10

<400> 13
 caacaagttt
 acagttctcc attcacgt
 28

20

<210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>
 Mus musculus

<400> 14
 actgactaca
 acgtgtac
 18

30

<210> 15
 <211> 51
 <212>
 DNA
 <213>
 Mus musculus

<400> 15
 tatattgatc
 cttacaatgg tattactatc tacgaccaga acttcaaggg c
 51

40

<210> 16
 <211> 24
 <212>
 DNA
 <213>

50

Mus musculus

<400> 16
 gatgtgacta
 cggcccttga cttc
 24

<210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 17
 gcacctccag atgttaactg ctc
 23

20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

30

<400> 18
 gaartavccc ttgaccaggc

20

<210> 19
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

40

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 19
 ggaggcggcg gttctgacat tgtgmtgwcw

50

cartc
35

<210> 20
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220> 10
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 20
atttcaggcc cagccggcca tggccgargt
ycarctkcar caryc
45

<210> 21
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
oligonucleotide 20
30

<400> 21
cccgggccac catgkccccw rctcagytyc
tkg
33

<210> 22
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 40

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 22
cccgggccac catggratgs agctgkgتما
tsctc
35 50

<210> 23	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:	
Synthetic	10
oligonucleotide	
<400> 23	
atatactcgc gacagctaca ggtgtccact	
ccgagatcca gctgcagcag tc	
52	
<210> 24	
<211> 31	20
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial	
Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 24	
gacctgaatt ctaaggagac tgtgagagtg g	
31	30
<210> 25	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial	
Sequence: Synthetic	40
oligonucleotide	
<400> 25	
ttaattgata tccagatgac ccagtctcc	
29	
<210> 26	
<211> 45	50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 26

taatcgttcg aaaagtgtac ttacgtttca gctccagctt
ggtcc
45

10

<210> 27

<211> 23

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

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

20

1

5

10

15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys

30

20

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
Gln Leu Leu Ile Tyr

40

1

5

10

15

<210> 29

<211> 23

50

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

1

5

10

15

10

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 30

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
Gln Leu Leu Ile Tyr

1

5

10

15

30

<210> 31

<211> 32

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
Ser Gly Thr Lys Phe Ser

40

1

5

10

15

Phe Lys Ile

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys

20

25

50

30

<210> 32
 <211> 10
 <212>
 PRT 10
 <213>
 Mus musculus

<400> 32
 Phe Gly Ala
 Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 1
 5
 10 20

<210> 33
 <211> 32
 <212>
 PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 Ser Gly Thr Asp Phe Ser 30

1
 5
 10
 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 Thr Tyr Tyr Cys
 20

25 40
 30

<210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens 50

<400> 34

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5
10

<210> 35

<211> 30

10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

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

1
5
10
15

20

Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

20
25
30

<210> 36

30

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

1
5
10
15

40

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

20
25
30

50

<210> 37
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 37
 Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
 Ser Thr Thr Ala Phe Met His

10

1
 5
 10
 15

Leu Asn Ser
 Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20
 25
 30

20

<210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 38
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 Ser

30

1
 5
 10

40

<210> 39
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
 Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

50

1
5
10
15

Leu Ser Ser
Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20
25
30

10

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 40
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser

1
5
10

30

<210> 41
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

40

<400> 41
tttcgtacgt cttgtcccag atccagctgc
agcagtc
37

<210> 42
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

<400> 42

agcgaattct gaggagactg tgacagtgg
gccttgccc cag
43

10

<210> 43

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Synthetic
primer

20

<400> 43

gtgaggcaga gccctggaaa ggccttgag
tgattgg
38

<210> 44

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

<400> 44

ccaatccact caaggccctt tccagggtc
tgctcac
38

40

<210> 45

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

50

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

<400> 45
gcatctcaac agcctgagat ctgaagacac
tgcagtttat ttctgtg
47

10

<210> 46
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

20

<400> 46
ctgcagtgtc ttcagatctc aggctgttga
gatgcatgaa ggc
43

<210> 47
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

<400> 47
gtcttcagat ctcaggctgc tgagctccat
gaaggctgtg gtg
43

40

<210> 48
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic

50

primer

<400> 48
 tacgactcac tatagggcga attgg
 25

<210> 49
 <211> 43
 <212> DNA 10
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Synthetic
 primer

<400> 49
 ctggtgacaa gtctaccagc acagcctaca
 tggagctcag cag 20
 43

<210> 50
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic 30
 primer

<400> 50
 ctgctgagct ccatgtaggc tggctggta
 gacttgtaa cag
 43

<210> 51 40
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 primer

<400> 51 50

gcactgaagc cccaggcttc accagctcac ctccagactg
ctgcagc
47

<210> 52

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

<400> 52

ctggggcttc agtgcgggta tcctgcaagg
cttctggta ctattcac
49

20

<210> 53

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

30

<400> 53

tcgtacgtct tgtcccagat ccagctggtg
cagtctggag gtgagc
46

<210> 54

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

<400> 54

gcactgaagc cccaggcttc ttcacctcac
ctccagactg cacc

50

44

<210> 55

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

10

<400> 55

gcagtctgga cctgagctga agaagcctgg gg
32

<210> 56

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

20

<400> 56

ccccaggctt cttcagctca ggtccagact gc
32

30

<210> 57

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

40

<400> 57

gctggcag tctggacctg aggtgaagaa
gcc
33

<210> 58

50

<211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 primer

<400> 58 10
 ggcttctca cctcagggtcc agactgcacc
 agc
 33

<210> 59
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 primer

<400> 59
 gcagtctgga cctgagctgg tgaagcctgg
 ggcttc
 36 30

<210> 60
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 primer 40

<400> 60
 gaagccccag gcttcaccag ctcagggtcca
 gactgc
 36

<210> 61
 <211> 30
 <212> DNA 50

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

<400> 61

cagtctggac ctgaggtggt gaagcctggg
30

10

<210> 62

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

20

<400> 62

cccaggcttc accacctcag gtccagactg
30

<210> 63

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

<400> 63

ttcgaaaagt gtacttacgt ttgatctcca
gcttgggtccc ag
42

40

<210> 64

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

50

Sequence: Synthetic
 primer

<400> 64
 accggtgata tccagatgac ccagtctcc
 29

<210> 65

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 primer

<400> 65
 ggtagcatg gtatctgcag aaaccaggg
 29

20

<210> 66

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 primer

30

<400> 66
 ccctggttc tgcagatacc atgctaacc
 29

<210> 67

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 primer

<400> 67
 tacgactcac tatagggcga attgg

50

25

<210> 68

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

10

<400> 68

ccacagatgc agacagggag gcaggagact g
31

<210> 69

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

20

<400> 69

ttcgaagagt gtacttacgt ttgatctcca
gcttggtagc agcaccgaac g
51

30

<210> 70

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

40

<400> 70

cctgtctgca tctgtgggag atagggtcac
catcacatgc 40

<210> 71

50

<211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 primer

<400> 71 10
 gatctccagc ttggtaccct gaccgaacgt
 gaatgg
 36

<210> 72
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 primer

<400> 72
 gtaggctgct gatcgtgaaa gaaaagtctg
 tgccagatcc
 40 30

<210> 73
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 primer 40

<400> 73
 cacgatcagc agcctacagc ctgaagattt
 tgtaaattat tactgtc
 47

<210> 74
 <211> 45
 <212> DNA 50

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Synthetic

primer

<400> 74

gcagcctaca gcctgaagat ttgcaactt
attactgtca acaag
45

10

<210> 75

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic

primer

<400> 75

cttggtgaca gtaataagtt gcaaaatctt
caggctgtag gctgc
45

20

<210> 76

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic

primer

<400> 76

cagcagccta cagcctgaag atttgcaaa ttattactgt
caac
44

30

40

<210> 77

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

50

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

<400> 77

gttgacagta ataatttgca aaatcttcag
gctgtaggct gctg
44

10

<210> 78

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

20

<400> 78

cagtggatct ggcacaaagt tttctttcac
gatcagcagc
40

<210> 79

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

<400> 79

gctgctgatc gtgaaagaaa actttgtgcc
agatccactg
40

40

<210> 80

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

50

Sequence: Synthetic
primer

<400> 80
ctgcagaaac cagggcaatc tcctcagctc
ctg
33

<210> 81 10
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
primer

<400> 81 20
caggagctga ggagattgcc ctggtttctg
cag
33

<210> 82
<211> 23
<212> PRT
<213> Mus musculus 30

<400> 82
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala
Ser Leu Gly

1
5
10
15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys 40
20

<210> 83
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 83 50

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
Gln Leu Leu Ile Tyr

1
5
10
15

<210> 84
<211> 32
<212> PRT
<213> Mus musculus

10

<400> 84
Gly Val Glu Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
Ser Gly Thr Lys Phe Ser

1
5
10
15

20

Phe Lys Ile
Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys

20
25
30

30

<210> 85
<211> 10
<212>
PRT
<213>
Mus musculus

40

<400> 85
Phe Gly Ala
Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

1
5
10

<210> 86
<211> 23

50

<212>

PRT

<213>

Artificial Sequence

<220>

<223>

Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

10

<400> 86

Asp Ile Gln

Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys

20

20

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

30

<400> 87

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro

Gln Leu Leu Ile Tyr

1

5

10

15

40

<210> 88

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

50

Sequence: Synthetic
peptide

<400> 88

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
Ser Gly Thr Lys Phe Ser

1
5
10
15

10

Phe Lys Ile

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys

20
25
30

20

<210> 89

<211> 10

<212>

PRT

<213>

Artificial Sequence

30

<220>

<223>

Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 89

Phe Gly Ala

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1
5
10

40

<210> 90

<211> 23

<212>

PRT

<213>

Artificial Sequence

50

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 90

Asp Ile Gln

Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 91

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro

Gln Leu Leu Ile Tyr

1

5

10

15

<210> 92

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 92

Gly Val Pro Ser Phe Ser Gly Ser Gly Ser

10

20

30

40

50

Gly Thr Lys Phe Ser Phe

1
5
10
15

Lys Ile Ser
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys

20
25
30

10

<210> 93

<211> 10

<212>

PRT

<213>

Artificial Sequence

20

<220>

<223>

Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 93

Phe Gly Ala

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1
5
10

30

<210> 94

<211> 23

<212>

PRT

<213>

Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 94

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

50

1
5
10
15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

10

<210> 95
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

20

<400> 95
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
Gln Leu Leu Ile Tyr

1
5
10
15

30

<210> 96
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

40

<400> 96
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
Ser Gly Thr Lys Phe Ser

1
5
10

50

15

Phe Lys Ile
Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys

20

25

30

10

<210> 97

<211> 10

<212>

PRT

<213>

Artificial Sequence

20

<220>

<223>

Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 97

Phe Gly Gln

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1

5

10

30

<210> 98

<211> 23

<212>

PRT

<213>

Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 98

Asp Ile Gln

Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly

1

50

5
10
15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 99 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 99 20

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
Gln Leu Leu Ile Tyr

1
5
10
15

<210> 100 30

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Synthetic
peptide

<400> 100 40

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
Ser Gly Thr Lys Phe Ser

1
5
10
15

Phe Lys Ile

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys

50

20
25
30

<210> 10

101

<211> 10

<212>

PRT

<213>

Artificial Sequence

<220>

<223>

Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide 20

<400> 101

Phe Gly Gln

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1

5

10

30

<210>

102

<211> 23

<212>

PRT

<213>

Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide 40

<400>

102

Asp Ile Gln

Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly

1

5

10

50

15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 103

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
Gln Leu Leu Ile Tyr

20

1

5

10

15

<210> 104

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 104

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
Ser Gly Thr Asp Phe Ser

40

1

5

10

15

Thr Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
Phe Val Asn Tyr Tyr Cys

20

50

25

30

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 105

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

20

1

5

10

<210> 106

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 106

Asp Ile Gln

Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

40

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 107

<211> 15

50

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 107

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln
Leu Leu Ile Tyr

10

1

5

10

15

<210> 108

<211> 32

20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 108

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
Ser Gly Thr Asp Phe Ser

30

1

5

10

15

Thr Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
Thr Tyr Tyr Cys

40

20

25

30

<210> 109

50

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 109
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

10

1
 5
 10

<210> 110
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 110
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 Ala Ser Val Gly

30

1 5
 10
 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

40

<210> 111
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 peptide

50

<400> 111

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
Gln Leu Leu Ile Tyr

1

5

10

15

10

<210> 112

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence: Synthetic

peptide

20

<400> 112

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
Ser Gly Thr Asp Phe Ser

1

5

10

15

30

Thr Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
Thr Tyr Tyr Cys

20

25

30

40

<210> 113

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence: Synthetic

peptide

50

<400> 113

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1

5

10

<210> 114

10

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 114

20

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

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

30

20

<210> 115

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

40

<400> 115

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
Gln Leu Leu Ile Tyr

1

5

10

50

15

<210> 116

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

10

<400> 116

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
Ser Gly Thr Asp Phe Ser

1

5

10

15

20

Thr Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
Asn Tyr Tyr Cys

20

25

30

30

<210> 117

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

40

<400> 117

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1

5

10

50

<210> 118

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

10

<400> 118

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

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

20

<210> 119

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

30

<400> 119

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln
Leu Leu Ile Tyr

1

5

10

15

40

<210> 120

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

50

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 120
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
Ser Gly Thr Lys Phe Ser

1
5 10
10
15

Thr Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
Asn Tyr Tyr Cys

20
25
30 20

<210> 121
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence 30

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 121
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 40
5
10

<210> 122
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220> 50

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 122

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

1 5
10
15

10

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 123

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Synthetic
peptide

<400> 123

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
Gln Leu Leu Ile Tyr

1
5
10
15

30

<210> 124

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 124

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
Ser Gly Thr Lys Phe Ser

50

1
5
10
15

Thr Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
Asn Tyr Tyr Cys

20
25
30

10

<210> 125
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 125
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

30

1
5
10

<210> 126
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

40

<400>
126
Leu Ala Ser
Gln Thr Ile Asp Thr Trp Leu Ala

1
5
10

50

<210>	
127	
<211> 7	
<212>	
PRT	
<213>	
Mus musculus	
<400>	
127	10
Ala Ala Thr	
Asn Leu Ala Asp	
1	
5	
<210>	
128	
<211> 9	
<212>	20
PRT	
<213> Mus	
musculus	
<400>	
128	
Gln Gln Val	
Tyr Ser Ser Pro Phe Thr	
1	
5	30
<210>	
129	
<211> 30	
<212>	
PRT	
<213>	
Mus musculus	
	40
<400>	
129	
Glu Ile Gln	
Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1	
5	
10	
15	
Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr	50

20
25
30

<210> 130
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

10

<400> 130
Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
Glu Trp Ile Gly

1
5
10

20

<210> 131
<211> 32
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 131
Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
Ser Thr Thr Ala Phe Met His

1
5
10
15

30

Leu Asn Ser
Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20
25
30

40

<210> 132
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

50

<400> 132

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
Ser

1
5
10

<210> 133

10

<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 133

20

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

1
5
10
15

Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

30

20
25
30

<210> 134

<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 134

Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
Glu Trp Ile Gly

1 5

50

10

<210> 135

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

10

<400> 135

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
Ser Thr Thr Ala Phe Met His

1

5

10

15

20

Leu Asn Ser

Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

30

30

<210> 136

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

40

<400> 136

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser

1

5

50

10

<210> 137

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

10

<400> 137

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

1

5

10

15

20

Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

20

25

30

<210> 138

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

30

<400> 138

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

40

1

5

10

<210> 139

<211> 32

<212> PRT

50

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 139

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
Ser Thr Thr Ala Phe Met His

10

1
5
10
15

Leu Asn Ser
Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20
30

25

20

<210> 140

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 140

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser

40

1
5
10

<210> 141

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

50

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 141

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

1

10

5

10

15

Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

20

25

30

20

<210> 142

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

30

<400> 142

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

1

5

10

40

<210> 143

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

50

<400> 143

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
Ser Thr Thr Ala Phe Met His

1

5

10

15

Leu Asn Ser

10

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

30

20

<210> 144

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

30

<400> 144

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser

1

5

10

40

<210> 145

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 145

50

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

1
5
10
15

Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

10

20
25
30

<210> 146
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 146
Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu
Glu Trp Ile Gly

1
5
10

30

<210> 147
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

40

<400> 147
Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
Ser Thr Thr Ala Phe Met Glu

1
5

50

10

15

Leu Ser Ser

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

30

10

<210> 148

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial

Sequence: Synthetic

peptide

<400> 148

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

Ser

1

5

10

30

<210> 149

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial

Sequence: Synthetic

peptide

<400> 149

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu

Leu Val Lys Pro Gly Ala

1

5

10

50

15

Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

20

25

30

<210> 150

10

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 150

20

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

1

5

10

<210> 151

30

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 151

40

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

1

5

10

15

Leu Ser Ser

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20

50

25
30

<210> 152	
<211> 11	
<212> PRT	10
<213> Artificial Sequence	

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 152	
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser	
Ser	20

1
5
10

<210> 153	
<211> 30	
<212> PRT	30
<213> Artificial Sequence	

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 153	
Gln Met Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Glu	
Leu Val Lys Pro Gly Ala	40

1
5
10
15

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala
 Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

20	
25	50

30

<210> 154

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

10

<400> 154

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

1

5

10

20

<210> 155

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

30

<400> 155

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

1

5

10

15

40

Leu Ser Ser

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

30

50

<210> 156

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

10

<400> 156

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser

1

5

10

20

<210> 157

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

30

<400> 157

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

1

5

10

15

40

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

20

25

30

<210> 158

50

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 peptide

 <400> 158 10
 Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu
 Glu Trp Ile Gly

 1
 5
 10

 <210> 159 20
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 peptide

 <400> 159 30
 Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
 Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

 1
 5
 10
 15

 Leu Ser Ser
 Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg 40

 20
 25
 30

 <210> 160
 <211> 11 50

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 160

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser

10

1

5

10

<210> 161

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 161

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

30

1

5

10

15

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

20

25

30

40

<210> 162

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

50

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 162
Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
Trp Ile Gly

1
5 10
10

<210> 163
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide 20

<400> 163
Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1
5
10 30
15

Leu Ser Ser
Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20
25
30

40

<210> 164
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220> 50

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 164

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser

1 5
10

10

<210> 165

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

20

<400> 165

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

1 5
10
15

30

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

20
25
30

<210> 166

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 166

Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu

50

Glu Trp Ile Gly

1
5
10

<210> 167

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 167

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

20

1
5
10
15

Leu Ser Ser

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20
25
30

30

<210> 168

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Synthetic
peptide

<400> 168

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser

50

1
5
10

<210> 169
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence 10

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 169
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
Val Lys Arg Pro Gly Ala 20

1
5
10
15

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

20 25 30

<210> 170
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic 40
peptide

<400> 170
Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu
Glu Trp Ile Gly

1
5
10

<210> 171

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

10

<400> 171

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

1

5

10

15

20

Leu Ser Ser

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

30

30

<210> 172

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

40

<400> 172

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser

1

5

10

50

<210> 173
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 peptide 10

<400> 173
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
 Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1
 5
 10 15

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala 20
 Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

20
 25
 30

<210> 174
 <211> 14
 <212> PRT 30
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 174
 Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu
 Glu Trp Ile Gly 40

1
 5
 10

<210> 175
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 50

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Synthetic
peptide

<400> 175

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

10

1

5

10

15

Leu Ser Ser

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

20

30

<210> 176

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence: Synthetic

peptide

<400> 176

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser

40

1

5

10

<210> 177

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

50

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 177

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

1

10

5

10

15

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

20

25

30

20

<210> 178

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

30

<400> 178

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

1

5

10

40

<210> 179

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic

50

peptide

<400> 179

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

1

5

10

15

10

Leu Ser Ser

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

30

20

<210> 180

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence: Synthetic

peptide

30

<400> 180

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser

1

5

10

40

<210> 181

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence: Synthetic

peptide

50

<400> 181

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

1

5

10

15

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

10

20

25

30

<210> 182

<211> 14

<212> PRT

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 182

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

30

1

5

10

<210> 183

<211> 32

<212> PRT

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 183

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

50

1
5
10
15

Leu Ser Ser
Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20
25
30

10

<210> 184
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
peptide

<400> 184
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser

30

1
5
10

<210>
185
<211> 5
<212>
PRT
<213>
Mus musculus

40

<400>
185
Asp Tyr Asn
Val Tyr
1
5

50

<210> 186 <211> 17 <212> PRT <213> Mus musculus	
<400> 186 Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Ile Thr Ile Tyr Asp Gln Asn Phe Lys 1 5 10 15 Gly	10 20
<210> 187 <211> 8 <212> PRT <213> Mus musculus	
<400> 187 Asp Val Thr Thr Ala Leu Asp Phe 1 5	
<210> 188 <211> 5 <212> PRT <213> Artificial Sequence	40
<220> <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	50

peptide

<400>

188

Asp Tyr Asn

Val Tyr

1

5

10

<210>

189

<211> 17

<212>

PRT

<213>

Artificial Sequence

<220>

<223>

20

Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400>

189

Tyr Ile Asp

Pro Tyr Asn Gly Ile Thr Ile Tyr Asp Gln Asn Leu Lys

1

5

10

15

30

Gly

<210> 190

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 190

Asp Val Thr Thr Ala Leu

Asp Phe

50

1
5

<210> 191
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 191 10
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

20
25

30

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

35
40
45

30

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 40

65
70
75
80

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

85
90

50

95

Pro Val Thr Lys
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105

<210> 192

10

<211> 332

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 192

Glu Phe Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
Ser

1

5

20

10

15

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys

20

25

30

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

30

Trp Asn Ser Gly Ala

Leu

35

40

45

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

Gly Leu

50

40

55

60

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

Ser Ser Ser Leu Gly Thr

65

70

75

80

50

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
Pro Ser Asn Thr Lys Val

85
90
95

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

100
105
110

10

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
Leu Phe

115
120
125

20

Pro Pro Lys Pro Lys
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
130

135
140

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
Asp Pro Glu Val Lys Phe

145
150
155

30

160

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
Asn Ala Lys Thr Lys Pro

165
170
175

40

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
Val Val Ser Val Leu Thr

180
185

190

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
Glu Tyr Lys Cys Lys Val

50

195
200
205

Ser Asn Lys Ala
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

210

215

220

10

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

225

230

235

240

Asp Glu Leu

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

245

250

255

20

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

260

265

270

30

Glu Asn Asn Tyr Lys

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

275

280

285

Phe Phe Leu

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

290

295

300

40

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

Glu Ala Leu His Asn His

305

310

315

320

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

50

Gly Lys

325

330

<210> 193

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 193

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile

Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1

5

10

15

20

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

30

35

40

45

Ser Gly Asn

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50

55

60

40

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

50

85
90
95

Pro Val Thr Lys
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100
105

10

<210> 194
<211> 329
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 194
Glu Phe Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
Cys

20

1
5
10
15

Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys

20
25
30

30

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
Trp Asn Ser Gly Ala
Leu

35 40
45

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

40

50
55
60

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
Ser Ser Ser Leu Gly Thr

65 70
75
80

50

Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
Pro Ser Asn Thr Lys Val

85
90
95

Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

100
105
110

10

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

115
120
125

Pro Lys

20

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

130

135
140

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
Val Gln Phe Asn Trp Tyr

145
150
155
160

30

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
Thr Lys Pro Arg Glu Glu

165
170
175

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
Val Leu Thr Val Leu His

40

180
185
190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
Lys Val Ser Asn Lys

195

50

200

205

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln

210

215

220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 Pro Ser Gln Glu Glu Met

10

225

230

235

240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro

245

20

250

255

Ser Asp Ile Ala Val

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

260

265

270

30

Tyr Lys

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

275

280

285

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val

290

295

40

300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

His Asn His Tyr Thr Gln

305

310

315

320

Lys Ser Leu

50

Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210>

195

<211> 14

<212>

PRT

10

<213>

Mus musculus

<400>

195

Trp Val Arg

Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly

1

5

10

20

<210>

196

<211> 14

<212>

PRT

<213>

Homo sapiens

30

<400>

196

Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu

Glu Trp Ile Gly

1

5

10

【 図 1 A 】

A H36D3.B7 抗組織因子軽鎖可変領域

```

G A C A T T C A G A T G A C C C A G T C T C C T G C C T C C C A G T G C A T C T C T G G G A G A A G T G T C A C C A T C A C A T G C
5 D I Q M T Q S P A S Q S A S L G E S V T I T C
C T G C A A G T C A G A C C A T T G A T A C A T G T T A C A T G T A T C A G C A G A A C C A G G G A A A T C T C C T C A G T T C
L A S Q T I D T W L A W Y Q Q K P G K S P Q L
C T G A T T A T G T G C C C A C C A A T T G G C A G A T G G G T C C C A T C A A G T T C A G T G C A G T G G A T C T G G C A C A
L I Y A A A T N L A D G V P S R F S G S G S G T
10 A A A T T T C T T C A G A T C A G C C C T A C A G C T A C A G C T G A G A T T T T G T A A T T A T T A C T G T C A C A C A G T T T A C
K F S F K I S S L Q A E D F V N Y Y C Q Q V Y
A G T T C C A T T C A C G T T C G G T G T G G A C C A A G C T G G A G C T G A A A
S S P F T F G A G T K L E L K

```

【 図 1 B 】

B H36D3.B7 抗組織因子重鎖可変領域

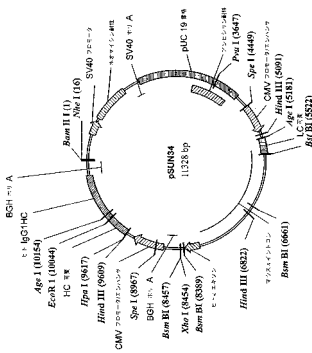
```

G A G A T C C A G T G C A G C A G T G G A C C T G A G T G G T G A A G C C T G G G G C T T C A G T G C A G G T A T C C T T G C A A G
E I Q L Q Q S G P E L V K P G A S V Q V S C K
A C T T C G T T A C T A T T C A C T A C T A C A C G T G A C T G G T G A G G C A G C C A T G G A A A G A G C C T T G A G
T S G Y S F T D Y N V Y W V R Q S H G K S L E
T G G A T T G G A T A T T G A T C C T T A C A A T G G T A T T A C T A T C A C C A C C A G A A C T T C A A G G G C A A G G C C A C A
W I G Y I D P Y N G I T I Y D Q N F K G K A T
T T G A C T G T T G A C A A G T T T C C A C C A C A C A C G C C T T C A T G C A T C T C A C A G C C T G A C A T C T G A C G A C T C T G C A
L T V D K S S T T A F M H L N S L T S D D S A
G T T A T T T C T G C A A G A G A T G A C T A C G G C C C T T G A C T T C T G G G C C A A G C C A C C A C C A C T T C A C A G T C
V Y F C A R D V T T A L D F W G Q G T I L T V
T C C T C A
S S

```

下線部はCDR領域 (単一下線部は核酸配列、2重下線部はアミノ酸配列)

【 図 2 】



【 図 3 】

- 1. 一文字コードのアミノ酸配列
- 2. フレームワーク4 (FR4) 可変領域の最後の残基のすぐ後は、HOATまたはhFATの定常領域の最初の残基である。

```

FR1 (22 AA) FR2 (15 AA) FR3 (12 AA) FR4 (9 AA)
5 D I Q M T Q S P A S Q S A S L G E S V T I T C
C T G C A A G T C A G A C C A T T G A T A C A T G T T A C A T G T A T C A G C A G A A C C A G G G A A A T C T C C T C A G T T C
L A S Q T I D T W L A W Y Q Q K P G K S P Q L
C T G A T T A T G T G C C C A C C A A T T G G C A G A T G G G T C C C A T C A A G T T C A G T G C A G T G G A T C T G G C A C A
L I Y A A A T N L A D G V P S R F S G S G S G S G T
10 A A A T T T C T T C A G A T C A G C C C T A C A G C T A C A G C T G A G A T T T T G T A A T T A T T A C T G T C A C A C A G T T T A C
K F S F K I S S L Q A E D F V N Y Y C Q Q V Y
A G T T C C A T T C A C G T T C G G T G T G G A C C A A G C T G G A G C T G A A A
S S P F T F G A G T K L E L K

```

FIG. 3A

```

20 H36の軽鎖CDR配列
CGR1 (11 AA) CGR2 (7 AA) CGR3 (3 AA)
A A S Q T I D T W L A W Y Q Q K P G K S P Q L
A A S Q T I D T W L A W Y Q Q K P G K S P Q L
A A S Q T I D T W L A W Y Q Q K P G K S P Q L

```

FIG. 3B

FIG. 3C

FIG. 3D

【 図 4 】

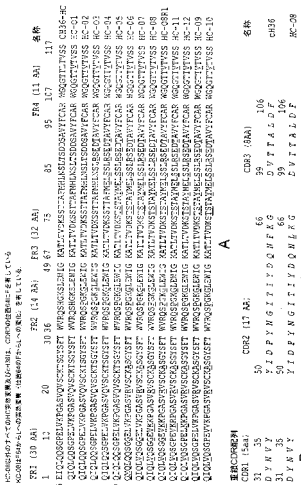
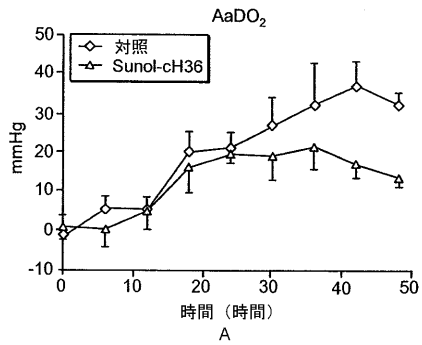
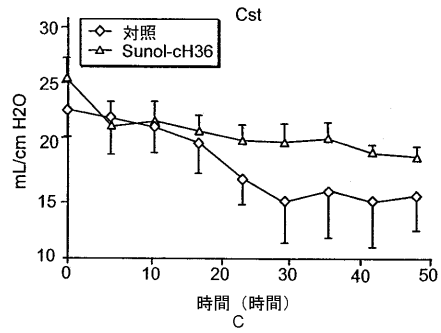


FIG. 4

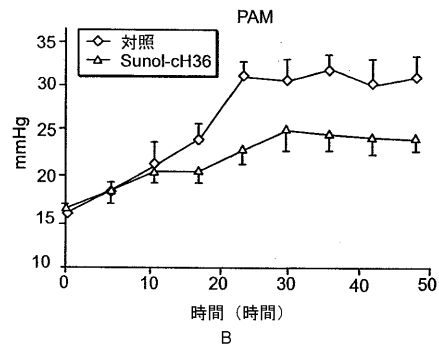
【図 8 A】



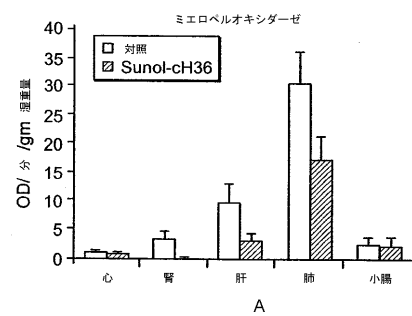
【図 8 C】



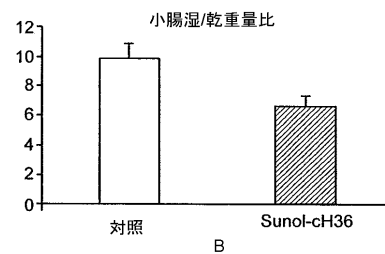
【図 8 B】



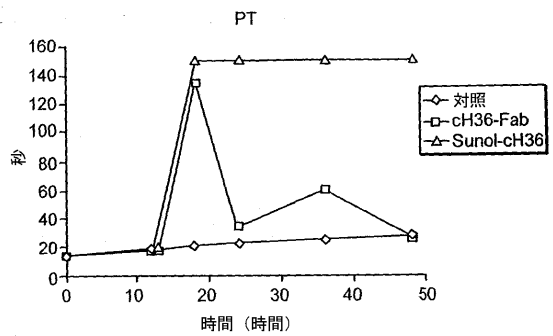
【図 9 A】



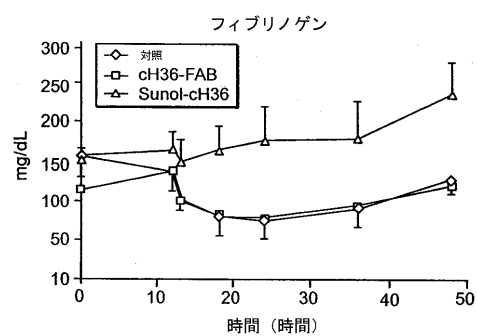
【図 9 B】



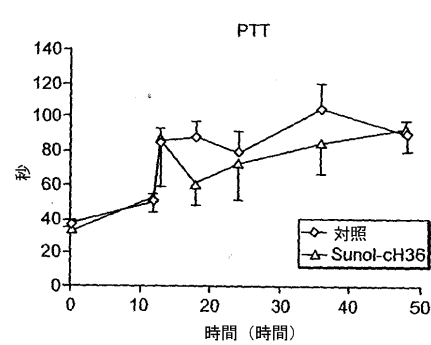
【図 10 B】



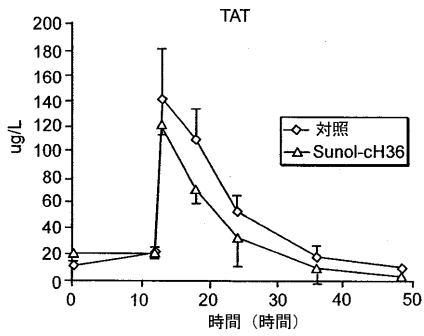
【図 10 A】



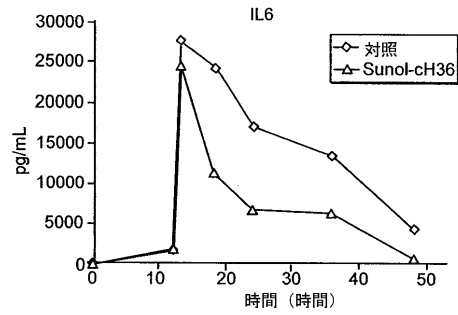
【図 10 C】



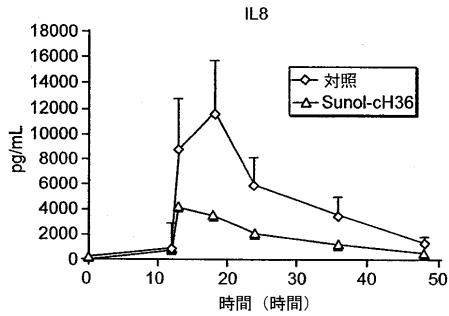
【图 1 0 D】



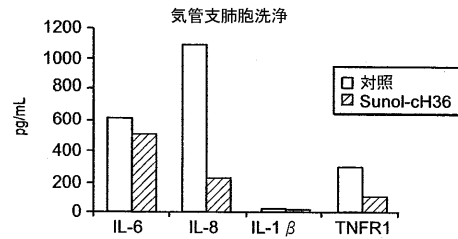
【图 1 1 B】



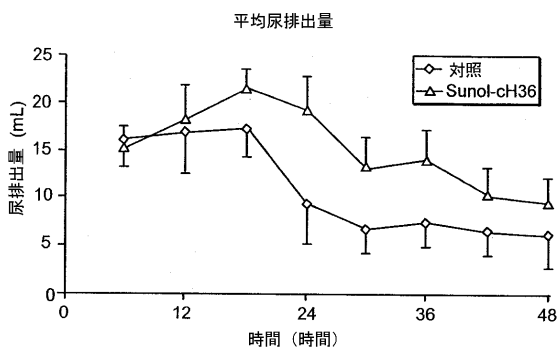
【图 1 1 A】



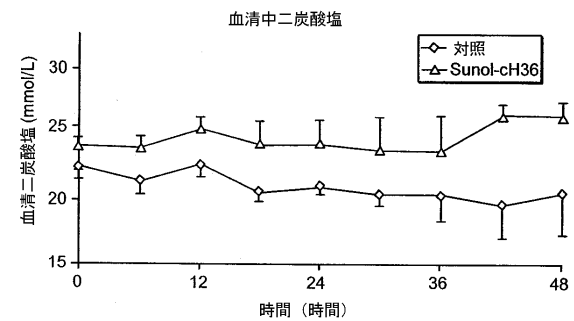
【图 1 2】



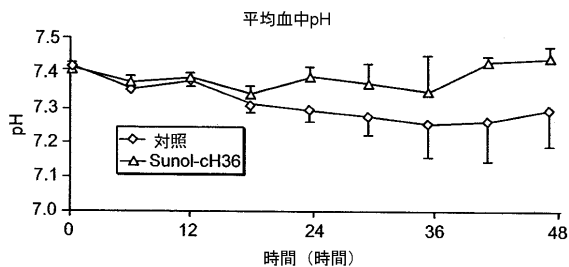
【图 1 3 A】



【图 1 3 C】



【图 1 3 B】



フロントページの続き

(72)発明者 イーガン, ジャック, オー.
アメリカ合衆国 フロリダ州 33324 プランテーション ジャカランダ ドライブ 373

審査官 平林 由利子

(56)参考文献 国際公開第03/037911(WO, A1)
国際公開第03/029295(WO, A1)
田口修, 週刊医学のあゆみ, 2003 Mar, 別冊(3月), p.24-6
HITE, R.D. et al, Acute Respiratory Distress Syndrome. Pharmacological Treatment Options In Development. , Drugs, 2001, Vol.61, No.7, p.897-907
TAYLOR, F.B. et al, Lethal E. coli septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody, Circ Shock, 1991, Vol.33, No.3, p.127-34

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
A61K 39/00-39/44
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	用于治疗与病症相关的凝血的组合物和方法		
公开(公告)号	JP5114055B2	公开(公告)日	2013-01-09
申请号	JP2006517186	申请日	2004-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	数据诺克斯墨 唐纳士公司		
申请(专利权)人(译)	Tanox公司公司油墨.		
当前申请(专利权)人(译)	基因泰克, 油墨.		
[标]发明人	チャオチンアン ワンヒンシー イーガンジャックオー		
发明人	チャオ, チン-アン ワン, ヒン, シー. イーガン, ジャック, オー.		
IPC分类号	A61K39/395 A61P11/00 A61K A61K39/40 A61K39/42 C07K16/00 C07K16/36 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/04 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 C07K16/36 C07K2317/24 C07K2317/55		
FI分类号	A61K39/395.ZNA.N A61P11/00		
优先权	60/480254 2003-06-19 US 60/538892 2004-01-22 US		
其他公开文献	JP2006528130A JP2006528130A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于预防或治疗哺乳动物中的败血症, 败血症相关症状或炎性疾病的方法。在一个实施方案中, 该方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的人源化抗体, 嵌合抗体或其片段, 其特异性结合组织因子 (TF) 以形成复合物。抑制因子X或因子IX与所述复合物的结合, 并且其中所述给药足以预防或治疗所述哺乳动物的败血症。本发明具有广泛的有用应用, 包括败血症, 与败血症有关的疾病和诸如关节炎的炎性疾病。

表2A (序列番号35、195、38及び198、それぞれの配列順)

名称	HC-FR1 (30 aa)					
	1	10	20	30	36	45
CH36-HC	EIQLQQSGPELVKPGASVQVSKTSGYSFT WVRQSHGKSLWIG					
ヒト-HC	Q	V	G	VK	R	A P G
	000042					023960

表2B (配列番号37-40、それぞれの配列順)

Names	HC-FR3 (32 aa)				HC-FR4 (11 aa)	
	67	75	85	95	107	117
CH36-HC	KATLIVDKSSITAFMHLNSLTSDDSAVYFCAR				WGQGTTLTVSS	
ヒト-HC	TS Y E S R E T				V	
	037010					000049