

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-515740  
(P2014-515740A)

(43) 公表日 平成26年7月3日(2014.7.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/44 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/44 Z N A	4 B O 2 4
<b>C07K 16/46 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/46	4 B O 6 4
<b>C12P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	4 C O 8 5
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 B	4 H O 4 5
<b>A61P 7/04 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 J	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-501575 (P2014-501575)  
 (86) (22) 出願日 平成24年3月27日 (2012. 3. 27)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年9月2日 (2013. 9. 2)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/055397  
 (87) 国際公開番号 W02012/130834  
 (87) 国際公開日 平成24年10月4日 (2012. 10. 4)  
 (31) 優先権主張番号 61/469, 207  
 (32) 優先日 平成23年3月30日 (2011. 3. 30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503385923  
 ベーリンガー インゲルハイム インター  
 ナショナル ゲゼルシャフト ミット ベ  
 シュレンクテル ハフツング  
 ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲル  
 ハイム アム ライン ビンガー シュト  
 ラーセ 1 7 3  
 (74) 代理人 110001508  
 特許業務法人 津国  
 (74) 代理人 100078662  
 弁理士 津国 肇  
 (74) 代理人 100131808  
 弁理士 柳橋 泰雄  
 (74) 代理人 100119079  
 弁理士 伊藤 佐保子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗凝固薬の解毒剤

(57) 【要約】

本発明は、抗凝固薬、特にダビガトランに対する抗体分子、及びこのような抗凝固薬の解毒剤としてのそれらの使用に関する。

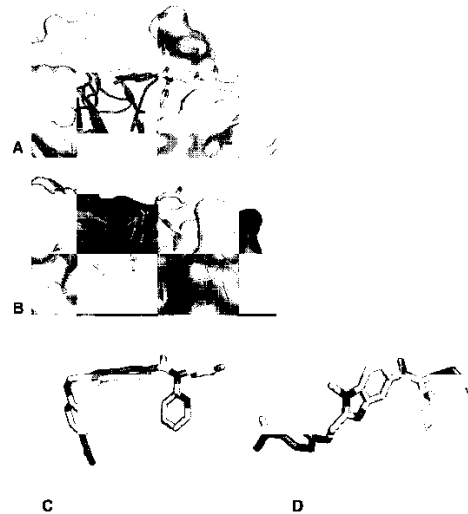


Figure 11

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ダビガトランに対する抗体分子であって、配列番号 1、7、13、19、25、31、37、43、49、55、61、及び 67 からなる群より選択される CDR 1、配列番号 2、8、14、20、26、32、38、44、50、56、62、及び 68 からなる群より選択される CDR 2、並びに配列番号 3、9、15、21、27、33、39、45、51、57、及び 63 からなる群より選択される CDR 3 を有する重鎖可変ドメインと、配列番号 4、10、16、22、28、34、40、46、52、58、及び 64 からなる群より選択される CDR 1、配列番号 5、11、17、23、29、35、41、47、53、59、及び 65 からなる群より選択される CDR 2、並びに配列番号 6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、及び 69 からなる群より選択される CDR 3 を有する軽鎖可変ドメインとを含む、抗体分子。

10

**【請求項 2】**

配列番号 1 の CDR 1、配列番号 2 の CDR 2 及び配列番号 3 の CDR 3 を有する重鎖可変ドメインと、配列番号 4 の CDR 1、配列番号 5 の CDR 2 及び配列番号 6 の CDR 3 を有する軽鎖可変ドメインとを含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

**【請求項 3】**

配列番号 7 の CDR 1、配列番号 8 の CDR 2 及び配列番号 9 の CDR 3 を有する重鎖可変ドメインと、配列番号 10 の CDR 1、配列番号 11 の CDR 2 及び配列番号 12 の CDR 3 を有する軽鎖可変ドメインとを含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

20

**【請求項 4】**

配列番号 13 の CDR 1、配列番号 14 の CDR 2 及び配列番号 15 の CDR 3 を有する重鎖可変ドメインと、配列番号 16 の CDR 1、配列番号 17 の CDR 2 及び配列番号 18 の CDR 3 を有する軽鎖可変ドメインとを含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

**【請求項 5】**

配列番号 19 の CDR 1、配列番号 20 の CDR 2 及び配列番号 21 の CDR 3 を有する重鎖可変ドメインと、配列番号 22 の CDR 1、配列番号 23 の CDR 2 及び配列番号 24 の CDR 3 を有する軽鎖可変ドメインとを含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

**【請求項 6】**

配列番号 25 の CDR 1、配列番号 26 の CDR 2 及び配列番号 27 の CDR 3 を有する重鎖可変ドメインと、配列番号 28 の CDR 1、配列番号 29 の CDR 2 及び配列番号 30 の CDR 3 を有する軽鎖可変ドメインとを含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

30

**【請求項 7】**

配列番号 31 の CDR 1、配列番号 32 の CDR 2 及び配列番号 33 の CDR 3 を有する重鎖可変ドメインと、配列番号 34 の CDR 1、配列番号 35 の CDR 2 及び配列番号 36 の CDR 3 を有する軽鎖可変ドメインとを含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

**【請求項 8】**

配列番号 37 の CDR 1、配列番号 38 の CDR 2 及び配列番号 39 の CDR 3 を有する重鎖可変ドメインと、配列番号 40 の CDR 1、配列番号 41 の CDR 2 及び配列番号 42 の CDR 3 を有する軽鎖可変ドメインとを含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

40

**【請求項 9】**

配列番号 43 の CDR 1、配列番号 44 の CDR 2 及び配列番号 45 の CDR 3 を有する重鎖可変ドメインと、配列番号 46 の CDR 1、配列番号 47 の CDR 2 及び配列番号 48 の CDR 3 を有する軽鎖可変ドメインとを含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

**【請求項 10】**

配列番号 49 の CDR 1、配列番号 50 の CDR 2 及び配列番号 51 の CDR 3 を有する重鎖可変ドメインと、配列番号 52 の CDR 1、配列番号 53 の CDR 2 及び配列番号 54 の CDR 3 を有する軽鎖可変ドメインとを含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

**【請求項 11】**

配列番号 55 の CDR 1、配列番号 56 の CDR 2 及び配列番号 57 の CDR 3 を有す

50

る重鎖可変ドメインと、配列番号58のCDR1、配列番号59のCDR2及び配列番号60のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

【請求項12】

配列番号61のCDR1、配列番号62のCDR2及び配列番号63のCDR3を有する重鎖可変ドメインと、配列番号64のCDR1、配列番号65のCDR2及び配列番号66のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

【請求項13】

配列番号67のCDR1、配列番号68のCDR2及び配列番号9のCDR3を有する重鎖可変ドメインと、配列番号64のCDR1、配列番号65のCDR2及び配列番号69のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

10

【請求項14】

配列番号70の重鎖可変ドメインと、配列番号71の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

【請求項15】

配列番号72の重鎖可変ドメインと、配列番号73の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

【請求項16】

配列番号74の重鎖可変ドメインと、配列番号75の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

【請求項17】

配列番号76の重鎖可変ドメインと、配列番号77の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

20

【請求項18】

配列番号78の重鎖可変ドメインと、配列番号79の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

【請求項19】

配列番号80の重鎖可変ドメインと、配列番号81の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

【請求項20】

配列番号82の重鎖可変ドメインと、配列番号83の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

30

【請求項21】

配列番号84の重鎖可変ドメインと、配列番号85の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

【請求項22】

配列番号86の重鎖可変ドメインと、配列番号87の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

【請求項23】

配列番号88の重鎖可変ドメインと、配列番号89の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

40

【請求項24】

配列番号90の重鎖可変ドメインと、配列番号91の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

【請求項25】

配列番号92の重鎖可変ドメインと、配列番号93の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

【請求項26】

配列番号92の重鎖可変ドメインと、配列番号94の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1に記載の抗体分子。

【請求項27】

50

軽鎖可変ドメインが配列番号 97 の定常ドメインに融合されている、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 28】

重鎖可変ドメインが配列番号 98 の定常ドメインに融合されている、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 29】

配列番号 95 の重鎖と、配列番号 96 の軽鎖とを含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 30】

配列番号 99 の重鎖と、配列番号 100 の軽鎖とを含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 31】

配列番号 99 の重鎖と、配列番号 101 の軽鎖とを含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 32】

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、抗体のフラグメント、特に Fab、Fab'、若しくは  $F(ab')_2$  フラグメント、一本鎖抗体、特に一本鎖可変フラグメント (scFv)、小モジュール免疫薬 (SMIP)、ドメイン抗体、ナノボディ、ダイアボディ、又は設計されたアンキリンリピートタンパク質 (DARPin) である、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 33】

医薬に使用するための、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 34】

抗凝固治療の副作用の治療若しくは予防に使用するための、及び / 又は抗凝固薬の過剰投与をリバーズするための、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 35】

副作用が出血事象である、請求項 34 に記載の抗体分子。

【請求項 36】

抗凝固治療の副作用、又は抗凝固治療での過剰投与事象を処置又は予防する方法であって、それを必要とする患者に請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の抗体分子の有効量を投与することを含む、方法。

【請求項 37】

請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の抗体分子を製造する方法であって、  
 (a) 発現コントロール配列と機能的に結合した前記抗体分子をコードする 1 つ以上の核酸を含む宿主細胞を提供すること、  
 (b) 前記宿主細胞を培養すること、及び  
 (c) 細胞培養物から抗体分子を回収すること  
 を含む、方法。

【請求項 38】

請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の抗体又はその医薬組成物を含む、キット。

【請求項 39】

(a) 請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の抗体又はその医薬組成物；  
 (b) 容器；及び  
 (c) ラベル  
 を含む、キット。

【請求項 40】

請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の抗体、及びダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はそれらの薬学的に許容しうる塩を含む、キット。

【請求項 41】

ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はそれらの薬学的に許容しうる塩で処置されている患者におけるダビガトラン又はダビガトランの 1-O-アシルグルクロニドを中和又は部分的に中和するための方法であって、請求項 1

10

20

30

40

50

～ 3 2 のいずれか一項に記載の抗体又はその医薬組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 4 2】

患者におけるダビガトラン又はダビガトランの 1 - 0 - アシルグルクロニドを中和又は部分的に中和するための方法であって：

( a ) 患者がダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はそれらの薬学的に許容しうる塩で処置されていたこと、及び患者によって取り込まれた量を確認すること；

( b ) 凝固若しくは血液凝固の試験又はアッセイを行う前に、請求項 1 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の抗体でダビガトラン又は 1 - 0 - アシルグルクロニドを中和すること、ここでダビガトラン又はダビガトランの 1 - 0 - アシルグルクロニドは試験又はアッセイの結果の正確な読み出しを妨害するであろう；

( c ) 患者から採取されたサンプルで凝固若しくは血液凝固の試験又はアッセイを行って、ダビガトランもダビガトランの 1 - 0 - アシルグルクロニドも存在しない場合の血餅形成レベルを測定すること；並びに

( d ) 患者における血餅形成と分解との間の適切なバランスを達成するために、患者に投与されるダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はそれらの薬学的に許容しうる塩の量を調整すること

を含む、方法。

【請求項 4 3】

ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はそれらの薬学的に許容しうる塩で処置されている患者の血漿中のダビガトラン又はダビガトランの 1 - 0 - アシルグルクロニドの濃度を低下させるための方法であって、患者におけるダビガトラン又は 1 - 0 - アシルグルクロニドの活性を中和するリバーシブル剤を投与する工程を含む、方法。

【請求項 4 4】

ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はそれらの薬学的に許容しうる塩で処置されている患者におけるダビガトラン又はダビガトランの 1 - 0 - アシルグルクロニドの抗凝固作用をリバーシブルする方法であって、患者におけるダビガトラン又は 1 - 0 - アシルグルクロニドの活性を中和するリバーシブル剤を投与する工程を含み、ここで患者が致命的と考えられる大量出血をしているか、若しくは血行動態の悪化に向かっているか、又は患者が緊急の医療措置を必要としている、方法。

【請求項 4 5】

凝固能力障害又は外傷により出血を経験しているか、又は出血のリスクがある患者におけるダビガトラン又はダビガトランの 1 - 0 - アシルグルクロニドの活性をリバーシブル又は低下させるための方法であって、

( a ) 患者の中に存在するダビガトラン又はダビガトランの 1 - 0 - アシルグルクロニドの量を測定する工程；

( b ) 患者において測定されたダビガトラン又はダビガトランの 1 - 0 - アシルグルクロニドの活性をリバーシブル又は低下させるのに有効な量の薬剤を投与する工程；及び

( c ) 患者のトロンビン凝固時間をモニタリングして、ダビガトラン又はダビガトランの 1 - 0 - アシルグルクロニドの活性のリバーシブル又は低下が達成されたことを確認する工程を含む、方法。

【請求項 4 6】

リバーシブル剤がダビガトランに対する抗体分子である、請求項 4 3 ～ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はそれらの薬学的に許容しうる塩で処置されている患者において使用するための、ダビガトラン又はダビガトランの 1 - 0 - アシルグルクロニドの活性を中和するリバーシブル剤であって、患者が致命的と考えられる大量出血をしているか、若しくは血行動態の悪化に向かっている

10

20

30

40

50

か、又は患者が緊急の医療措置を必要としている、リバーシ剤。

【請求項 48】

ダビガトランに対する抗体分子である、請求項 47 に記載のリバーシ剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬の分野、特に抗凝固治療の分野に関する。

【0002】

背景の情報

抗凝固薬は、血液凝固を防止する物質である；すなわち、抗凝固薬は、血液が凝固するのを妨げる。抗凝固薬は、血栓性障害のための薬物療法としてのヒトの治療、例えば易罹患者における深部静脈血栓、肺塞栓、心筋梗塞及び脳卒中の一次予防並びに二次予防に広く使用されている。

10

【0003】

重要なクラスの経口抗凝固薬、例えばワルファリンを含むクマリンは、ビタミン K の効果を拮抗することによって作用する。第二のクラスの化合物は、アンチトロンビン III 又はヘパリンコファクター III などのコファクターを介して間接的に血液凝固を阻害する。これには、アンチトロンビン III を介して主に第 X a 因子（及び低い程度にはトロンビン）の阻害を触媒するいくつかの低分子量ヘパリン製品（ベミパリン、セルトパリン、ダルテパリン、エノキサパリン、ナドロパリン、バルナパリン、レビパリン、チンザパリン）が挙げられる。より小さなオリゴ糖鎖（フォンダパリヌクス、イドラパリヌクス）は、アンチトロンビン III を介して第 X a 因子だけを阻害する。ヘパリノイド（ダナバロイド、スロデキシド、デルマトン硫酸）は、両方のコファクターを介して作用し、第 X a 因子及びトロンビンの両方を阻害する。第三のクラスは、血液凝固の直接阻害剤に相当する。直接第 X a 因子阻害剤には、アピキサバン、エドキサバン、オタミキサバン、リバロキサバンが挙げられ、直接トロンビン阻害剤には、二価ヒルジン（ビバリルジン、レピルジン、デシルジン）、並びに一価化合物であるアルガトロバン及びダビガトランが挙げられる。

20

【0004】

血液凝固は出血を止める生物学的メカニズムなので、抗凝固治療の副作用は、望まれない出血事象であり得る。従って、抗凝固薬に関連するこのような出血事象が起こったときにそれを止めることができる解毒剤を提供することが望ましい（Zikria and Ansell, Current Opinion in Hematology 2009, 16(5): 347-356）。これを達成するための一方法は、投与後に患者の中に存在する抗凝固化合物の活性を中和することによる。

30

【0005】

抗凝固薬の現在入手可能な解毒剤は、プロタミン（ヘパリンの中和用）、及びワルファリンのようなビタミン K アンタゴニストを中和するためのビタミン K である。新鮮凍結血漿及びリコンビナント第 V III a 因子もまた、低分子量ヘパリン処置下の患者であって、大外傷又は重度出血を患っている患者において、非特異的解毒剤として使用されている（Lauritzen, B. et al, Blood, 2005, 607A-608A.）。ヘパリン又は低分子量ヘパリン解毒剤としてのプロタミンフラグメント（米国特許第 6, 624, 141 号）及び小型合成ペプチド（米国特許第 6, 200, 955 号）；並びにトロンビン阻害剤用の解毒剤としてのトロンビンムテイン（米国特許第 6, 060, 300 号）も報告されている。プロトロンビンの中間体及び誘導体は、ヒルジン及び合成トロンビン阻害剤に対する解毒剤として報告されている（米国特許第 5, 817, 309 号及び第 6, 086, 871 号）。直接第 X a 因子阻害剤については、不活性第 X a 因子アナログが解毒剤として提案されている（国際公開公報第 2009042962 号）。さらに、リコンビナント第 V III a 因子が、フォンダパリヌクス及びイドラパリヌクスなどの間接アンチトロンビン III 依存性第 X a 因子阻害剤の効果をリバーシ（reverse）するのに使用されている（Bijsterveld, NR et al, Circulation, 2002, 106: 2550-2554; Bijsterveld, NR et al, British J. of

40

50

Haematology, 2004 (124): 653-658)。抗凝固薬をリバーズする方法の総説は、Schulman and Bijsterveld, Transfusion Medicine Reviews 2007, 21(1): 37-48に提供されている。

【0006】

国際公開公報第2011089183号には、ダビガトランに結合し、ダビガトランの活性を中和し得る抗体が開示されている。

【0007】

抗凝固治療についての改良された解毒剤、特に特異的解毒剤がこれまでのところ開示されていないダビガトランのような直接トロンビン阻害剤のための解毒剤を提供する必要性がある。

【0008】

発明の簡単な概要

一態様では、本発明は、抗凝固薬の活性を中和できる抗体分子に関する。

【0009】

さらなる態様では、抗体分子は、抗凝固薬に対する結合特異性を有する。

【0010】

さらなる態様では、抗凝固薬は、直接トロンビン阻害剤、第Xa因子阻害剤、又はビタミンKアンタゴニストである。

【0011】

さらなる態様では、抗凝固薬は、ダビガトラン、アルガトロバン、メラガトラン、キシメラガトラン、ヒルジン、ビパリルジン、レピルジン、デシルジン、アピキサバン、オタミキサバン、エドキサバン、リパロキサバン、デフィプロチド、ラマトロバン、アンチトロンビンIII、又はドロトレコギンアルファである。

【0012】

別の態様では、本発明は、ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、及び/又はダビガトランのO-アシルグルクロニドに対する抗体分子に関する。

【0013】

さらなる態様では、本発明は、ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、及び/又はダビガトランのO-アシルグルクロニドに対する抗体分子であって、ヒトにおける減少した免疫原性を有する抗体分子に関する。

【0014】

さらなる態様では、本発明は、ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、及び/又はダビガトランのO-アシルグルクロニドに対する抗体分子であって、改善された物理化学的特性、特に、改善された水性溶媒溶解性を有する抗体分子に関する。

【0015】

さらなる態様では、本発明は、ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、及び/又はダビガトランのO-アシルグルクロニドに対する抗体分子であって、改善された宿主細胞生産性を有する抗体分子、特に、改善された生産収率をもたらす抗体分子に関する。

【0016】

さらなる態様では、抗体分子は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、抗体のフラグメント、特にFab、Fab'、若しくはF(ab')<sub>2</sub>フラグメント、一本鎖抗体、特に一本鎖可変フラグメント(scFv)、ドメイン抗体、ナノボディ(nanobody)、ダイアボディ(diabody)、又はDARPinである。

【0017】

さらなる態様では、本発明は、医薬に使用するための上記抗体分子に関する。

【0018】

さらなる態様では、本発明は、抗凝固治療の副作用の治療又は予防に使用するための上記抗体分子に関する。

【0019】

10

20

30

40

50

さらなる態様では、副作用は出血事象である。

【0020】

さらなる態様では、本発明は、抗凝固治療の副作用の処置又は予防の方法であって、それを必要とする患者に上記抗体分子の有効量を投与することを含む方法に関する。

【0021】

別の態様では、本発明は、容器及びラベルと一緒に前記抗体分子を含むキットに関する。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】トロンビン凝固時間アッセイを用いて、ダビガトランの濃度の増加とともに凝固時間の増加が見られた。濃度200nMは、ベースラインに対して約5倍の凝固時間延長をもたらした。この濃度を第1及び第2セットの実験に使用した。最終セットの実験には濃度500nM(治療濃度を超える)を使用した。

10

【図2】ダビガトランに対する4種の異なる抗体(A~D)はすべて、ヒト血漿でのダビガトランの凝固時間延長を中和した。ヒト血漿でのベースライン凝固は10.9秒であり、200nMのダビガトランを血漿と一緒にプレインキュベーションしたところ、凝固は51秒に延長した。200nMのダビガトランと一緒にプレインキュベーションした血漿に各抗体を添加し、さらに5分間インキュベーションした。次に、トロンビンを添加することによってトロンビン凝固時間を開始させた。各抗体は、ダビガトランの凝固時間を異なる程度にリバーズすることができた。最高濃度の溶液が、抗凝固活性の最大のリバーズをもたらした。

20

【図3】200nMのダビガトランと一緒にプレインキュベーションしたヒト血漿に、漸増濃度のポリクローナル抗体(抗体D)を添加した作用を測定した。ベースライン凝固時間は11秒であり、ダビガトランの添加は、凝固を63.7秒に延長した。次に、抗体の漸増希釈物が、ダビガトランによるトロンビン凝固時間延長のリバーズに対して及ぼす作用を試験した。最低濃度は、トロンビン凝固時間を43.9秒に短縮した。より高濃度は、トロンビン凝固時間をベースラインレベルにまで完全に短縮させ、ダビガトランの抗凝固作用の完全な中和をもたらした。非特異的ウサギポリクローナル抗体(四角)の添加は、ダビガトランの抗凝固作用のリバーズに対して効果を有しなかった。

【図4】500nMのダビガトランと一緒にプレインキュベーションしたヒト血漿に、漸増濃度のポリクローナル抗体(抗体D)を添加した作用を測定した。ベースライン凝固時間は10.9秒であり、このより高濃度のダビガトランの添加は、凝固を111.7秒に延長した(約10倍の増加)。抗体又は原液の1:2希釈溶液の作用は、ダビガトランによるトロンビン凝固時間延長を濃度依存的にリバーズした。最高濃度もまた、トロンビン凝固時間をベースラインレベルにまで完全にリバーズし、治療濃度をはるかに超えるダビガトランの抗凝固作用を完全に中和した。

30

【図5】マウスモノクローナル抗体(クローン22)は、ヒト血漿及びヒト全血でのダビガトランの抗凝固作用をリバーズする。30nMのダビガトランと一緒にプレインキュベーションしたヒト血漿又は全血に、漸増濃度のマウス抗体を添加した。1.5~2U/mLのトロンビンを添加することによってアッセイを開始し、凝固時間を測定した。100%のダビガトラン活性は、化合物の存在下及び非存在下の凝固時間の差と定義した。抗体は、ダビガトランを介した凝固時間延長を用量依存的に阻害した。

40

【図6】クローン22抗体から作成したマウスFabは、ヒト血漿でのダビガトランの抗凝固作用をリバーズする。7nMのダビガトランと一緒にプレインキュベーションしたヒト血漿に、漸増濃度のマウスFabを添加した。インタクトな抗体もまた、ポジティブコントロールとして試験した。0.4U/mLのトロンビンを添加することによってアッセイを開始し、凝固時間を測定した。100%阻害は、ダビガトランを介した凝固時間の増加を完全に遮断することと定義した。Fabは、ヒト血漿中で、ダビガトランにより誘導される凝固時間延長を用量依存的に阻害した。

【図7】マウスモノクローナル抗体(クローン22)は、ヒト血漿でのダビガトランアシ

50



ルグルクロニドの抗凝固作用をリバーすする。7 nMのダビガトランアシルグルクロニド又はダビガトランと一緒にプレインキュベーションしたヒト血漿に、漸増濃度のマウス抗体を添加した。0.4 U/mLのトロンビンを添加することによってアッセイを開始し、凝固時間を測定した。100%阻害は、化合物を介した凝固時間の増加を完全に遮断することと定義した。抗体は、ヒト血漿中で、ダビガトランアシルグルクロニドにより誘導される凝固時間延長を用量依存的に阻害した。

【図8】選択したキメラ抗体は、トロンビン凝固時間アッセイにおいて、ダビガトラン活性を阻害する。7 nMのダビガトランと一緒にプレインキュベーションしたヒト血漿に、漸増濃度の抗体を添加した。インタクトな抗体もまた、ポジティブコントロールとして試験した。0.4 U/mLのトロンビンを添加することによってアッセイを開始し、凝固時間を測定した。100%阻害は、ダビガトランを介した凝固時間の増加を完全に遮断することと定義した。抗体は、ヒト血漿中で、ダビガトランにより誘導される凝固時間延長を用量依存的に阻害した。

【図9】Fab VH5c/Vk18 (配列番号99及び配列番号100)及びVH5c/Vk21 (配列番号99及び配列番号101)は、トロンビン凝固時間血漿アッセイにおいて、ダビガトラン活性を阻害する。アッセイは、上記のように実施した。

【図10】Fab VH5c/Vk18 (配列番号99及び配列番号100)及びVH5c/Vk21 (配列番号99及び配列番号101)は、血漿及び全血トロンビン凝固時間アッセイにおいて、ダビガトラン活性を阻害する。アッセイは、上記のように実施した。

【図11】Fab-ダビガトラン複合体の結晶構造。A:ダビガトランとの複合体におけるFab 18/15 (国際公開公報第2011089183号)の結晶構造。B:ダビガトランとの複合体におけるFab VH5c/Vk18 (配列番号99及び配列番号100)の結晶構造。C:Fab 18/15を含む結晶構造で見られるダビガトランのコンフォメーション。D:VH5c/Vk18を含む結晶構造で見られるダビガトランの展開したコンフォメーション。

【図12】CDR (左のパネル)又は全Fv領域 (右のパネル)を含む(A)Fab 18/15 (B)Fab VH5c/Vk18及び(C)Fab VH5c/Vk21について計算した空間的凝集傾向(SAP)。

【図13】対応するFab発現構築物でトランスフェクションしたCHO細胞のフェドバッチラン(fed batch runs)からの(A)Fab 18/15 (B)Fab VH5c/Vk18及び(C)Fab VH5c/Vk21の力価。

【0023】

発明の詳細な説明

一態様では、本発明は、抗凝固薬の活性を中和できる抗体分子に関する。

【0024】

抗体(免疫グロブリン、略してIgとしても公知である)は、脊椎動物の血液又は他の体液中に見られ得るガンマグロブリンタンパク質であり、細菌及びウイルスなどの異物を特定及び中和するために免疫系によって使用される。抗体は、典型的には、基本構造ユニットで作られており、それぞれが2本の大きな重鎖及び2本の小さな軽鎖を有し、例えば、1個のユニットを有するモノマー、2個のユニットを有するダイマー又は5個のユニットを有するペントマーを形成する。抗体は、抗原として公知の他の分子又は構造に非共有相互作用によって結合することができる。この結合は、抗体が高親和性で特定の構造だけに結合するという意味で特異的である。抗体によって認識される抗原の独特な部分は、エピトープ又は抗原決定基と呼ばれる。エピトープに結合する抗体の部分は、時にパラトープと呼ばれ、抗体のいわゆる可変ドメイン、又は可変領域(Fv)に位置する。可変ドメインは、フレームワーク領域(FR)によって空間的に離れた3個のいわゆる相補性決定領域(CDR)を含む。

【0025】

本発明の文脈において、CDRへの参照は、Chothia(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 1987, 196: 901-917)及びKabat(E.A. Kabat, T.T. Wu, H. Bilofsky, M. Reid-Miller

10

20

30

40

50

and H. Perry, Sequence of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda (1983))の定義に基づく。

【0026】

当該技術により、抗体がさらに開発されており、医学及び工学における多用途の道具になっている。従って、本発明の文脈において、「抗体分子」又は「抗体」という用語（本明細書において同義語として使用される）は、例えば2本の軽鎖及び2本の重鎖、又はラクダ科の種のように2本の重鎖だけを含む、自然界に見出されうる抗体を含むだけではなく、抗原への結合特異性及び免疫グロブリンの可変ドメインとの構造類似性を有する少なくとも1個のパラトープを含むすべての分子もさらに包含する。

【0027】

従って、本発明の抗体分子は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、抗体のフラグメント、特にFv、Fab、Fab'、又はF(ab')<sub>2</sub>フラグメント、一本鎖抗体、特に一本鎖可変フラグメント(scFv)、小モジュール免疫薬(Small Modular Immunopharmaceutical)(SMIP)、ドメイン抗体、ナノボディ、ダイアボディでありうる。

【0028】

ポリクローナル抗体は、異なるアミノ酸配列を有する抗体分子の集合を表し、当技術分野で周知のプロセスにより抗原で免疫処置した後に、脊椎動物の血液から得ることができる。

【0029】

モノクローナル抗体(mAb又はmOAb)は、アミノ酸配列が同一の単一特異性抗体である。それらは、ハイブリドーマ技術によって、特異的抗体を産生するB細胞と骨髄腫(B細胞ガン)細胞の融合体のクローンを意味するハイブリッド細胞系(ハイブリドーマと呼ばれる)から製造することができる(Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975;256:495-7.)。あるいは、モノクローナル抗体は、ホスト細胞でのリコンビナント発現によって製造することができる(Norderhaug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I. (May 1997). "Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells." J Immunol Methods 204 (1): 77-87; 下記も参照されたい)。

【0030】

ヒトに適用するために、マウスのような他の種に本来は由来する抗体の免疫原性を減少させることが望ましいことが多い。これは、キメラ抗体の構築によって、又は「ヒト化」と呼ばれるプロセスによって行うことができる。この文脈において、「キメラ抗体」は、別の種(例えば、ヒト)に由来する配列部分(例えば、定常ドメイン)と融合したある種(例えば、マウス)に由来する配列部分(例えば、可変ドメイン)を含む抗体であると理解される。「ヒト化抗体」は、非ヒト種に本来は由来する可変ドメインを含む抗体であって、その可変ドメインの全体的な配列がヒト可変ドメインの配列により密接に類似するように、あるアミノ酸が突然変異された抗体である。抗体をキメラ化及びヒト化する方法は、当技術分野において周知である(Billetta R, Lobuglio AF. "Chimeric antibodies". Int Rev Immunol. 1993;10(2-3):165-76; Riechmann L, ClarkM, Waldmann H, Winter G (1988). "Reshaping human antibodies for therapy". Nature: 332:323.)。

【0031】

さらに、例えば、ファージディスプレイによって、又はトランスジェニック動物を使用してヒトゲノムに由来する配列に基づき抗体を作り出すための技術が開発されている(国際公開公報第90/05144号; D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths and G. Winter (1991) "By-passing immunisation. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." J.Mol.Biol., 222, 581-597; Knappik et al., J. Mol. Biol. 296: 57-86, 2000; S. Carmen and L. Jermutus, "Concepts in antibody phage display". Briefings in Functional Genomics and Proteomics 2

10

20

30

40

50

002 1(2):189-203; Lonberg N, Huszar D. "Human antibodies from transgenic mice". *Int Rev Immunol*. 1995;13(1):65-93.; Brueggemann M, Taussig MJ. "Production of human antibody repertoires in transgenic mice". *Curr Opin Biotechnol*. 1997 Aug;8(4):455-8. )。このような抗体は、本発明の文脈において「ヒト抗体」である。

#### 【0032】

本発明の抗体分子には、Fab、Fab'、又はF(ab')<sub>2</sub>フラグメントのような、抗原結合特性を保持する免疫グロブリンのフラグメントも挙げられる。このようなフラグメントは、免疫グロブリンのフラグメント化によって、例えばタンパク質分解によって、又はこのようなフラグメントのリコンビナント発現によって得ることができる。例えば、免疫グロブリンの分解は、通常の技術によって、例えばパイン若しくはペプシン（国際公開公報第94/29348号）、又はエンドプロテイナーゼLys-C（Kleemann, et al, *Anal. Chem.* 80, 2001-2009, 2008）を使用して達成することができる。抗体のパイン又はLys-C分解によって、典型的には、それぞれが単一の抗原結合部位を有する2つの同一の抗原結合フラグメント（いわゆるFabフラグメント）及び残余のFcフラグメントが製造される。ペプシン処理によってF(ab')<sub>2</sub>が生産される。宿主細胞でのリコンビナント発現によってFab分子を製造する方法を下記により詳細に概説する。

10

#### 【0033】

免疫グロブリンの可変ドメイン又はこのような可変ドメインに由来する分子を異なる分子事情に配置するために、多数の技術が開発されている。それらもまた、本発明による「抗体分子」と見なすべきである。一般に、これらの抗体分子は、免疫グロブリンと比較してサイズが小さく、単一のアミノ酸鎖を含み得るか、又は数本のアミノ酸鎖から構成され得る。例えば、一本鎖可変フラグメント(scFv)は、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の可変領域が短いリンカー、通常はセリン(S)又はグリシン(G)で一緒に結合されている融合体である（国際公開公報第88/01649号；国際公開公報第91/17271号；Huston et al; *International Reviews of Immunology*, Volume 10, 1993, 195 - 217）。「単一ドメイン抗体」又は「ナノボディ」は、単一のIg様ドメインに抗原結合部位を有する（国際公開公報第94/04678号；国際公開公報第03/050531号、Ward et al., *Nature*. 1989 Oct 12;341(6242):544-6; Revets et al., *Expert Opin Biol Ther.* 5(1):111-24, 2005）。同一又は異なる抗原に対して結合特異性を有する1つ以上の単一ドメイン抗体と一緒に結合されてもよい。ダイアボディは、2個の可変ドメインを含む2本のアミノ酸鎖からなる二価抗体分子である（国際公開公報第94/13804号、Holliger et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jul 15;90(14):6444-8）。抗体様分子の他の例は、免疫グロブリンスーパーファミリー抗体である（IgSF；Srinivasan and Roeske, *Current Protein Pept. Sci.* 2005, 6(2): 185-96）。異なる考え方が、定常ドメインCH1を持たない一本鎖ヒンジ及びエフェクタードメインに結合したFvドメインを含む、いわゆる小モジュール免疫薬(SMIP)につながっている（国際公開公報第02/056910号）。

20

30

#### 【0034】

さらなる態様では、本発明の抗体分子は、免疫グロブリン可変ドメインに匹敵するある一定の結合特異性及び親和性を有する限り、免疫グロブリン可変ドメインとわずかな構造関連性だけさえ有してもよいし、このような関係を全く有しなくてもよい。このような非免疫グロブリン「抗体模倣物」は、時に「足場タンパク質」と呼ばれ、プロテインA、リポカリン、フィブロネクチンドメイン、アンキリンコンセンサスリピートドメイン、及びチオレドキシンの遺伝子に基づくものであってもよい（Skerra, *Current Opinion in Biotechnology* 2007, 18(4): 295-304）。本発明の文脈における好ましい実施態様は、設計されたアンキリンリピートタンパク質（Designed Ankyrin Repeat Protein）である（DARPin；Steiner et al., *J Mol Biol.* 2008 Oct 24;382(5): 1211-27; Stumpp MT, Amstutz P. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2007 Mar;10(2):153-9）。

40

#### 【0035】

50

抗体分子は、その抗体分子の特性に所望の影響を与える他の分子実体に融合されてもよいし（融合タンパク質として）、別の方法で結合されてもよい（共有結合又は非共有結合により）。例えば、特に一本鎖抗体又はドメイン抗体の場合、抗体分子の薬物動態特性、例えば血液などの体液中での安定性を改善することが望ましいことがある。これに関して、特に循環中でのこのような抗体分子の半減期を延長するために多数の技術が開発されており、例えば、PEG化（国際公開公報第98/25971号；国際公開公報第98/48837号；国際公開公報第2004081026号）、抗体分子を、アルブミンのような血清タンパク質に対して親和性を有する別の抗体分子と融合させるか若しくは別の方法で共有結合させること（国際公開公報第2004041865号；国際公開公報第2004003019号）、又はアルブミン若しくはトランスフェリンのような血清タンパク質の全部又は一部との融合タンパク質として抗体分子を発現させること（国際公開公報第01/79258号）が挙げられる。

10

## 【0036】

さらなる態様では、抗体分子は、抗凝固薬に対する結合特異性を有する。「結合特異性」は、抗体分子が、構造的に無関係の分子よりも抗凝固薬に対して有意に高い結合親和性を有することを意味する。

## 【0037】

親和性は、抗体分子上の単一の抗原結合部位と単一のエピトープとの間の相互作用である。親和性は、結合定数  $K_A = k_{ass} / k_{diss}$ 、又は解離定数  $K_D = k_{diss} / k_{ass}$  によって表される。

20

## 【0038】

本発明の一態様では、抗体は、例えば、表面プラズモン共鳴分析によって測定される場合に、 $0.1 \text{ pM} \sim 100 \text{ } \mu\text{M}$ 、好ましくは  $1 \text{ pM} \sim 100 \text{ } \mu\text{M}$ 、好ましくは  $1 \text{ pM} \sim 1 \text{ } \mu\text{M}$  の範囲の  $K_D$  値の親和性で抗凝固薬に結合する（Malmqvist M., "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics.", *Curr Opin Immunol.* 1993 Apr;5(2):282-6.）。抗体親和性はまた、結合平衡除外アッセイ（kinetic exclusion assay）（KinExA）技術を用いて測定することもできる（Darling, R.J., and Brault P-A., "Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions." *ASSAY and Drug Development Technologies.* 2004, Dec 2(6): 647-657.）。

30

## 【0039】

抗体分子の結合親和性は、親和性成熟として公知のプロセスによって高めることができる（Marks et al., 1992, *Biotechnology* 10:779-783; Barbas, et al., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*91:3809-3813; Shier et al., 1995, *Gene* 169:147-155）。従って、親和性成熟抗体もまた、本発明に包含される。

## 【0040】

本発明のさらなる態様では、抗体分子は、抗凝固薬の活性を中和できる。すなわち、抗凝固薬は、抗体分子に結合すると、もはやその抗凝固活性を発揮することができないか、又は有意に減少した大きさでこの活性を発揮する。好ましくは、抗凝固活性は、抗体が結合すると、問題の当該抗凝固薬にとって適切な活性アッセイで、特にエカリン凝固時間又はトロンビン凝固時間などの、トロンビン感受性の凝固アッセイで測定される場合に、少なくとも2倍、5倍、10倍又は100倍減少する（H. Bounameaux, Marbet GA, Lammle B, et al. "Monitoring of heparin treatment. Comparison of thrombin time, activated partial thromboplastin time, and plasma heparin concentration, and analysis of the behaviour of antithrombin III". *American Journal of Clinical Pathology* 1980 74(1): 68-72.）。

40

## 【0041】

本発明の抗体分子を製造するために、当業者は、当技術分野で周知の多様な方法より選択することができる（Norderhaug et al., *J Immunol Methods* 1997, 204 (1): 77-87; Kipriyanow and Le Gall, *Molecular Biotechnology* 26: 39- 60, 2004; Shukla et al.,

50

2007, J. Chromatography B, 848(1): 28-39)。

【 0 0 4 2 】

抗凝固薬は、上記に概説するように当技術分野において周知である。本発明のさらなる態様では、抗凝固薬は、直接トロンピン阻害剤、第 X a 因子阻害剤、又はビタミン K アンタゴニストである。ビタミン K アンタゴニストの例は、ワルファリンを含むクマリンである。主に第 X a 因子の間接阻害剤の例は、アンチトロンピン III の活性化を介して作用するヘパリン群の物質であり、それらには、いくつかの低分子量ヘパリン製品（ベミパリン、セルトパリン、ダルテパリン、エノキサパリン、ナドロパリン、パルナパリン、レビパリン、チンザパリン）、ある種のオリゴ糖（フォンダパリヌクス、イドラパリヌクス）、ヘパリノイド（ダナパロイド、スロデキシド、デルマタン硫酸）、及び直接第 X a 因子阻害剤（アピキサパン、オタミキサパン、リパロキサパン）が挙げられる。トロンピン阻害剤の例には、二価ヒルジン（ビパリルジン、レピルジン、デシルジン）、並びに一価化合物アルガトロバン及びダビガトランが挙げられる。

10

【 0 0 4 3 】

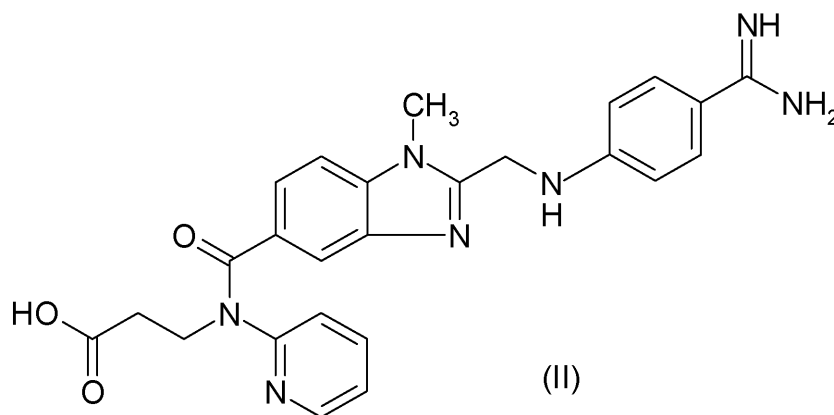
従って、さらなる態様では、抗凝固薬は、ダビガトラン、アルガトロバン、メラガトラン、キシメラガトラン、ヒルジン、ビパリルジン、レピルジン、デシルジン、アピキサパン、エドキサパン、オタミキサパン、リパロキサパン、デフィプロチド、ラマトロバン、アンチトロンピン III、又はドロトレコギンアルファである。

【 0 0 4 4 】

本発明の文脈における好ましい抗凝固薬は、化学式 (II) :

20

【 化 1 】



30

を有するダビガトラン (CAS 211914-51-1、N-[2-(4-アミノフェニルアミノメチル)-1-メチル-1H-ベンゾイミダゾール-5-イルカルボニル]-N-(2-ピリジル)-アラニン) である。

【 0 0 4 5 】

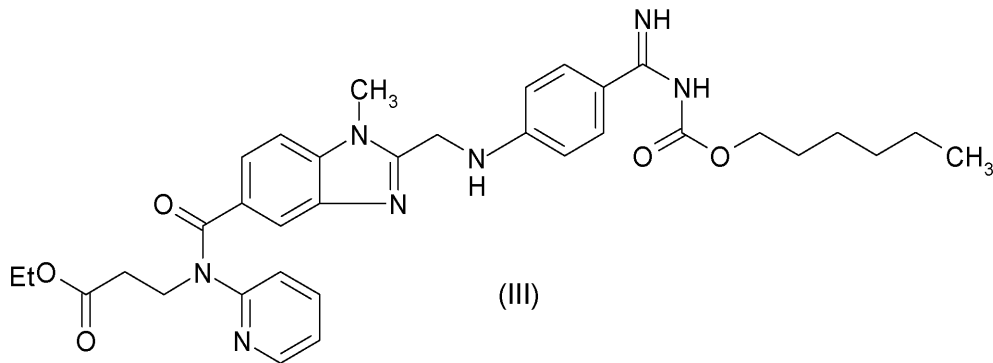
ダビガトランは、トロンピン阻害作用及びトロンピン時間延長作用を有する化合物を 1-メチル-2-[N-(4-アミノフェニル)-アミノメチル]-ベンゾイミダゾール-5-イル-カルボン酸-N-(2-ピリジル)-N-(2-ヒドロキシカルボニルエチル)-アミドの名称で開示している国際公開公報第 98/37075 号から公知である。Huel et al. J Med Chem 2002, 45 (9): 1757-66 も参照されたい。

40

【 0 0 4 6 】

ダビガトランは、式 (III) :

## 【化 2】



10

のプロドラッグとして適用される。

## 【0047】

式 III の化合物（名称ダビガトランエテキシラート、CAS 211915-06-9；エチル 3-[(2-{[4-(ヘキシルオキシカルボニルアミノ-イミノ-メチル)-フェニルアミノ]-メチル}-1-メチル-1H-ベンゾイミダゾール-5-カルボニル)-ピリジン-2-イル-アミノ]-プロピオナート）は、体内に入った後で活性化化合物（II）に変換される。ダビガトランエテキシラートの好ましい多形体は、ダビガトランエテキシラートメシラートである。

20

## 【0048】

ダビガトランの主な適用は、深部静脈血栓の術後予防、確立した深部静脈血栓の処置及び心房細動を有する患者における発作の予防である（Eriksson et al., Lancet 2007, 370 (9591): 949-56; Schulman S et al, N Engl J Med 2009, 361 (24): 2342-52; Connolly S et al., N Engl J Med 2009, 361 (12): 1139-51; Wallentin et al., Lancet 2010, 376 (9745): 975-983）。

## 【0049】

ヒトの体内では、カルボキシラート部分のグルクロン酸抱合がダビガトランの主なヒト代謝経路である（Ebner et al., Drug Metab. Dispos. 2010, 38(9):1567-75）。それは、1-O-アシルグルクロニド（アノマー）の形成をもたらす。1-O-アシルグルクロニドは、わずかに加水分解されてアグリコンになるのに加えて、水溶液中で非酵素的アシル転移を受けて、2-O-アシルグルクロニド、3-O-アシルグルクロニド、及び4-O-アシルグルクロニドを形成し得る。精製1-O-アシルグルクロニド及びその異性体性転位生成物を用いた実験により、ダビガトランと比較して活性化部分トロンボプラスチン時間の延長効力が等しいことが明らかになった。

30

## 【0050】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトラン及びダビガトランエテキシラートの両方に結合する。

## 【0051】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトラン及びダビガトランのO-アシルグルクロニド、特にダビガトランの1-O-アシルグルクロニドの両方に結合する。

40

## 【0052】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトランの2-O-アシルグルクロニド、3-O-アシルグルクロニド、及び4-O-アシルグルクロニドにさらに結合する。

## 【0053】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトラン及びダビガトランのO-アシルグルクロニド、特にダビガトランの1-O-アシルグルクロニドの活性を中和できる。

## 【0054】

以下において、配列番号についての言及は、表1及び配列表（特に示されない限り、これは本出願の一部である）の配列番号を指す。

50

## 【0055】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトランに対する結合特異性を有し、配列番号1、7、13、19、25、31、37、43、49、55、61、及び67からなる群より選択されるCDR1、配列番号2、8、14、20、26、32、38、44、50、56、62、及び68からなる群より選択されるCDR2、並びに配列番号3、9、15、21、27、33、39、45、51、57、及び63からなる群より選択されるCDR3を有する重鎖可変ドメインと、配列番号4、10、16、22、28、34、40、46、52、58、及び64からなる群より選択されるCDR1、配列番号5、11、17、23、29、35、41、47、53、59、及び65からなる群より選択されるCDR2、並びに配列番号6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、及び69からなる群より選択されるCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む。

10

## 【0056】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトランに対する結合特異性を有し、配列番号1のCDR1、配列番号2のCDR2及び配列番号3のCDR3を有する重鎖可変ドメインと、配列番号4のCDR1、配列番号5のCDR2及び配列番号6のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む。

## 【0057】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトランに対する結合特異性を有し、配列番号7のCDR1、配列番号8のCDR2及び配列番号9のCDR3を有する重鎖可変ドメインと、配列番号10のCDR1、配列番号11のCDR2及び配列番号12のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む。

20

## 【0058】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトランに対する結合特異性を有し、配列番号13のCDR1、配列番号14のCDR2及び配列番号15のCDR3を有する重鎖可変ドメインと、配列番号16のCDR1、配列番号17のCDR2及び配列番号18のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む。

## 【0059】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトランに対する結合特異性を有し、配列番号19のCDR1、配列番号20のCDR2及び配列番号21のCDR3を有する重鎖可変ドメインと、配列番号22のCDR1、配列番号23のCDR2及び配列番号24のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む。

30

## 【0060】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトランに対する結合特異性を有し、配列番号25のCDR1、配列番号26のCDR2及び配列番号27のCDR3を有する重鎖可変ドメインと、配列番号28のCDR1、配列番号29のCDR2及び配列番号30のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む。

## 【0061】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトランに対する結合特異性を有し、配列番号31のCDR1、配列番号32のCDR2及び配列番号33のCDR3を有する重鎖可変ドメインと、配列番号34のCDR1、配列番号35のCDR2及び配列番号36のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む。

40

## 【0062】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトランに対する結合特異性を有し、配列番号37のCDR1、配列番号38のCDR2及び配列番号39のCDR3を有する重鎖可変ドメインと、配列番号40のCDR1、配列番号41のCDR2及び配列番号42のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む。

## 【0063】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトランに対する結合特異性を有し、配列番号43のCDR1、配列番号44のCDR2及び配列番号45のCDR3を有する重鎖可

50

変ドメインと、配列番号46のCDR1、配列番号47のCDR2及び配列番号48のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む。

【0064】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトランに対する結合特異性を有し、配列番号49のCDR1、配列番号50のCDR2及び配列番号51のCDR3を有する重鎖可変ドメインと、配列番号52のCDR1、配列番号53のCDR2及び配列番号54のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む。

【0065】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトランに対する結合特異性を有し、配列番号55のCDR1、配列番号56のCDR2及び配列番号57のCDR3を有する重鎖可変ドメインと、配列番号58のCDR1、配列番号59のCDR2及び配列番号60のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む。

10

【0066】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトランに対する結合特異性を有し、配列番号61のCDR1、配列番号62のCDR2及び配列番号63のCDR3を有する重鎖可変ドメインと、配列番号64のCDR1、配列番号65のCDR2及び配列番号66のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む。

【0067】

本発明の別の態様では、抗体分子は、ダビガトランに対する結合特異性を有し、配列番号67のCDR1、配列番号68のCDR2及び配列番号69のCDR3を有する重鎖可変ドメインと、配列番号64のCDR1、配列番号65のCDR2及び配列番号69のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む。

20

【0068】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号70の重鎖可変ドメインと、配列番号71の軽鎖可変ドメインとを含む。

【0069】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号72の重鎖可変ドメインと、配列番号73の軽鎖可変ドメインとを含む。

【0070】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号74の重鎖可変ドメインと、配列番号75の軽鎖可変ドメインとを含む。

30

【0071】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号76の重鎖可変ドメインと、配列番号77の軽鎖可変ドメインとを含む。

【0072】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号78の重鎖可変ドメインと、配列番号79の軽鎖可変ドメインとを含む。

【0073】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号80の重鎖可変ドメインと、配列番号81の軽鎖可変ドメインとを含む。

40

【0074】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号82の重鎖可変ドメインと、配列番号83の軽鎖可変ドメインとを含む。

【0075】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号84の重鎖可変ドメインと、配列番号85の軽鎖可変ドメインとを含む。

【0076】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号86の重鎖可変ドメインと、配列番号87の軽鎖可変ドメインとを含む。

【0077】

50



本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号 88 の重鎖可変ドメインと、配列番号 89 の軽鎖可変ドメインとを含む。

【0078】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号 90 の重鎖可変ドメインと、配列番号 91 の軽鎖可変ドメインとを含む。

【0079】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号 92 の重鎖可変ドメインと、配列番号 93 の軽鎖可変ドメインとを含む。

【0080】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号 92 の重鎖可変ドメインと、配列番号 94 の軽鎖可変ドメインとを含む。

10

【0081】

本発明の別の態様では、前記軽鎖可変ドメインのいずれか 1 つは、配列番号 97 の定常ドメインに融合されている。

【0082】

本発明の別の態様では、前記重鎖可変ドメインのいずれか 1 つは、配列番号 98 の定常ドメインに融合されている。

【0083】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号 95 の重鎖と、配列番号 96 の軽鎖とを含む。

20

【0084】

特定の態様では、本発明は、ダビガトランに対する抗体であって、水媒体中での高い溶解性、及び低い凝集傾向を有する抗体に関する。

【0085】

本発明の別の態様では、抗体分子は、s c F v 分子である。この形式では、本明細書に開示された可変ドメインは、適切なリンカーペプチドで互いに融合されてもよい。その構築物は、N 末端から C 末端にかけて（重鎖可変ドメイン） - （リンカーペプチド） - （軽鎖可変ドメイン）、又は（軽鎖可変ドメイン） - （リンカーペプチド） - （重鎖可変ドメイン）の順序でこれらの要素を含み得る。

【0086】

30

s F v 構築物をコードする核酸を、宿主細胞（イー・コリイ（*E. coli*）、ピキアパストリス（*Pichia pastoris*）、又は哺乳動物細胞株、例えば CHO 若しくは NS0 など）でリコンビナント発現させて、機能的 s c F v 分子を得るプロセスは、当技術分野において公知である（例えば、Rippmann et al., *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64(12): 4862-4869; Yamawaki et al., *J. Biosci. Bioeng.* 2007, 104(5): 403-407; Sonoda et al., *Protein Expr. Purif.* 2010, 70(2): 248-253 を参照されたい）。

【0087】

特に、本発明の s c F v 抗体分子は、以下のように製造することができる。構築物は、W3110、TG1、BL21、BL21 (DE3)、HMS174、HMS174 (DE3)、MM294 のような異なる *E. coli* 株において誘導性プロモーターのコントロール下で発現させることができる。このプロモーターは、lacUV5、tac、T7、trp、trc、T5、araB より選択することができる。培養培地は、好ましくは、Wilmsら、2001 (Wilms et al., *Biotechnology and Bioengineering* 2001, 73(2): 95-103)、DeLisaら、1999 (DeLisa et al., *Biotechnology and Bioengineering* 1999, 65(1): 54-64) に従って十分に定義されているものか、又は同等のものである。しかしながら、バッチ培地、並びに / 又はイソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン及びバリンなどのアミノ酸を含む流加培地、又はダイズペプトン若しくは酵母抽出物などの複合培地成分の補充が有益であり得る。発酵のためのプロセスは、フェドバッチモードで行う。条件：温度 20 ~ 40、pH 5.5 ~ 7.5、DO は 20% よりも高く保つ。初期炭素源の消費後に、培養物に上記流加培

40

50

地（又は同等物）を供給する。発酵槽中で40～100g/Lの乾燥細胞重量に達したときに、使用されるプロモーター系に対応する適切な誘導物質（例えば、IPTG、ラクトース、アラビノース）で培養物を誘導する。誘導は、パルス完全誘導として、若しくはそれぞれの誘導物質を発酵槽中に長時間供給することによる部分誘導として、又はそれらの組み合わせのいずれかで行うことができる。生産期は、少なくとも4時間持続すべきである。細胞は、ボウル遠心分離機、管状ボウル遠心分離機又はディスクスタック遠心分離機での遠心分離によって回収し、培養上清は廃棄する。

#### 【0088】

E. coli細胞塊を、4～8倍量の溶解緩衝液（リン酸緩衝液又はトリス緩衝液、pH7～8.5）中に再懸濁する。細胞溶解は、好ましくは、高圧ホモジナイズに続いて、ボウル遠心分離機、管状ボウル遠心分離機又はディスクスタック遠心分離機での遠心分離によるペレットの回収によって行う。scFv封入体を含むペレットを、20mMトリス、150mM NaCl、5mM EDTA、2M尿素、0.5%トリトンX-100（pH8.0）で2～3回洗浄した後に、20mMトリス、150mM NaCl、5mM EDTA（pH8.0）を使用して洗浄段階を2回行う。最後に、scFv封入体を、ボウル遠心分離機、管状ボウル遠心分離機又はディスクスタック遠心分離機での遠心分離によって回収する。scFv封入体の可溶化は、6Mグアニジン-HCl又は8～10mM尿素などのカオトロピック剤を含む100mMグリシン/NaOH、5mM EDTA、20mMジチオトレイトール（pH9.5～10.5）中で行うことができる。30～60分間インキュベーションした後に、溶液を遠心分離し、その後の再フォールディングのためにターゲットタンパク質を含む上清を回収する。再フォールディングは、好ましくは、フェドバッチモードで、タンパク質溶液を再フォールディング緩衝液中で1:10～1:50希釈して0.1～0.5mg/mlの最終タンパク質濃度にするによって行われる。再フォールディング緩衝液は、50～100mMトリス及び/又は50～100mMグリシン、50～150mM NaCl、1～3M尿素、0.5～1Mアルギニン、例えばシステイン/シスチン又は酸化/還元型グルタチオンなどの2～6mMの酸化還元系（pH9.5～10.5）を含む。4で24～72時間インキュベーションした後に、再フォールディング溶液を、場合により0.22µmフィルターを使用してろ過し、希釈し、pHをpH7.0～8.0に調整する。タンパク質を、結合モードの陽イオン交換クロマトグラフィー（例えば、Toyopearl GigaCap S-650M、SPセファロースFF又はSHyperCel（商標））によりpH7.0～8.5で分離する。分離を、漸増するNaClの直線勾配によって行う。ターゲットタンパク質を含む画分をプールし、次に非結合モードの陰イオン交換カラム（例えば、Toyopearl GigaCap Q-650M、Q-セファロースFF、QHyperCel（商標））で分離した後に、陽イオン交換の仕上げ工程（例えば、SPセファロースHP）を行う。最低90%の純度レベルのターゲットタンパク質を含む画分をプールし、PBS中、ダイアフィルトレーション又はサイズ排除クロマトグラフィーによって製剤化する。製造されたscFv分子の同一性及び製品品質を、還元SDS-PAGEによって分析し、その場合scFvは、約26kDaの1本の主バンドで検出することができる。scFvの特性決定のためのさらなるアッセイには、質量分析、RP-HPLC及びSE-HPLCが挙げられる。

#### 【0089】

本発明の別の態様では、抗体分子は、Fab分子である。その形式では、上に開示された可変ドメインは、好ましくはヒト起源の免疫グロブリン定常ドメインにそれぞれ融合されてもよい。従って、重鎖可変ドメインは、CH<sub>1</sub>ドメイン（いわゆるFdフラグメント）に融合されてもよいし、軽鎖可変ドメインは、CLドメインに融合されてもよい。

#### 【0090】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号99の重鎖と、配列番号100の軽鎖とを含む。好ましくは、抗体分子は、Fab分子である。

#### 【0091】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号99の重鎖と、配列番号101の軽鎖と

10

20

30

40

50

を含む。好ましくは、抗体分子は、F a b分子である。

【0092】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号99の重鎖と、配列番号100の軽鎖とからなるF a b分子である。

【0093】

本発明の別の態様では、抗体分子は、配列番号99の重鎖と、配列番号101の軽鎖とからなるF a b分子である。

【0094】

E. coli、Pichia pastoris、又は哺乳動物細胞株（例えば、CHO又はNS0）のような宿主細胞でこのような重鎖及び軽鎖を発現させるために、F a b構築物をコードする核酸を使用することができる。これらの鎖を適切にフォールディング、会合、及びジスルフィド結合させて、F dフラグメント及び軽鎖を含む機能的F a b分子にする方法は、当技術分野において公知である（Burtet et al., J. Biochem. 2007, 142(6), 665-669; Ning et al., Biochem. Mol. Biol. 2005, 38: 204-299; Quintero-Hernandez et al., Mol. Immunol. 2007, 44: 1307-1315; Willems et al. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2003;786:161-176.）。

【0095】

特に、本発明のF a b分子は、以下のようにCHO細胞で製造することができる。無血清培地中に懸濁状態で成長しているCHO - DG44細胞（Urlaub, G., Kas, E., Carothers, A.M., and Chasin, L.A. (1983). Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. Cell 33, 405-412.）に、Lipofectamine（商標）及びPlus（商標）試薬（Invitrogen）を製造業者の説明書に従って使用して、F a b分子の重鎖及び軽鎖をコードする発現構築物をトランスフェクションする。48時間後に、200 µg/mLの抗生物質G418を含有し、ヒポキサンチン及びチミジンを含まない培地中で細胞を選択に供し、安定的にトランスフェクションされた細胞集団を作成する。続いて、メトトレキサート（MTX）を漸増濃度（最大100又は400 nM）で培養培地に添加することによって、これらの安定トランスフェクタントを遺伝子増幅に供する。細胞が適応したら、それらを10～11日間フェドバッチ発酵に供し、F a bタンパク質材料を製造する。

【0096】

化学的に定義された無血清培養培地中でCHO - DG44細胞及びその安定トランスフェクタントの懸濁培養物をインキュベーションする。播種用保存培養物を2～3日毎にそれぞれ細胞 $3 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 個/mLの播種密度で継代培養する。細胞を振盪フラスコ中、Multitron HTインキュベーター（Infors）で5% CO<sub>2</sub>、37 及び120 rpmで成長させる。フェドバッチ実験のために、細胞を振盪フラスコの中で抗生物質もMTXも含まないBI独自の生産培地中に細胞 $3 \times 10^5$ 個/mLで播種する。培養物を120 rpmで37 及び5% CO<sub>2</sub>にて攪拌し、細胞数が増加するにつれてCO<sub>2</sub>をその後2%に減少させる。細胞数、生存率、pH、グルコース及び乳酸濃度を含む培養パラメーターを毎日測定し、必要に応じて炭酸塩を使用してpHをpH 7.0に調整する。BI独自の栄養溶液を24時間毎に添加する。異なる時点で上清からサンプルを採取し、ELISAによってF a b産物濃度を測定する。10～11日後に、細胞培養液を遠心分離によって回収し、精製研究室に移送する。

【0097】

F a b分子を、フェドバッチ培養の上清からクロマトグラフィー及びろ過によって精製する。一次捕捉工程として、アフィニティークロマトグラフィー、例えばプロテインG又はプロテインLを適用する。あるいは、低結合親和性及び低結合能の場合、F a bを、分子のpIを利用する陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX）によって捕捉する。さらなる直交精製工程によって、宿主細胞タンパク質及び混入物、例えばDNA又はウイルスを除去する。

【0098】

製造された F a b 分子の同一性及び製品品質を、電気泳動法、例えば S D S - P A G E によって分析し、それによって約 5 0 kDa の 1 本の主バンドとして F a b を検出することができる。F a b 産物の特性決定のためのさらなるアッセイには、質量分析、等電点電気泳動及びサイズ排除クロマトグラフィーが挙げられる。結合活性を B I A c o r e 分析によって追跡する。

#### 【 0 0 9 9 】

細胞培養上清中の F a b 又は完全長 I g G 分子の定量を、サンドイッチ酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) により行う。完全長 I g G は、ヒト - F c フラグメント ( J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s ) 及びヒト 軽鎖に対して産生された抗体 ( ペルオキシダーゼ標識されたもの、Sigma ) を使用して検出することができる。F a b フラグメントを、ヤギポリクローナル抗ヒト I g G ( H 及び L、Novus ) によって固定化し、ヒト I g G に対して産生されたヒツジポリクローナル抗体 ( ペルオキシダーゼ標識されたもの、The Binding Site ) によって検出する。

10

#### 【 0 1 0 0 】

F a b 分子はまた、酵素的切断によって完全長抗体分子から作成することができる。このアプローチの利点は、堅調かつ効率的な発酵及び精製のためのプラットホームプロセスであって、所望の製品品質でのスケールアップ及び高収量に修正可能なプラットホームプロセスが適用可能であることである。精製のために、リコンビナントプロテイン A 樹脂を使用するアフィニティークロマトグラフィーを一次捕捉工程として使用することができ、それにより通常は高い純度が得られる。

20

#### 【 0 1 0 1 】

この目的のために、F a b 配列をコードする重鎖を、ヒト I g G 抗体分子の F c 領域に融合する。次に、得られた発現構築物を、無血清培地中に懸濁状態で成長している C H O - D G 4 4 細胞にリポフェクションを用いてトランスフェクションする。4 8 時間後に、2 0 0 µg/mL の抗生物質 G 4 1 8 を含有しヒポキサンチン及びチミジンを含まない培地中で細胞を選択に供し、安定的にトランスフェクションされた細胞集団を作成する。続いて、メトトレキサート ( M T X ) を漸増濃度 ( 最大 1 0 0 又は 4 0 0 nM ) で培養培地に添加することによって、これらの安定トランスフェクタントを遺伝子増幅に供する。細胞が適応したら、それらを 1 0 ~ 1 1 日間フェドバッチ発酵に供し、I g G タンパク質材料を製造する。

30

#### 【 0 1 0 2 】

I g G タンパク質を、リコンビナントプロテイン A - アフィニティークロマトグラフィーを使用することによって培養上清から精製する。次に、所望の中和 F a b フラグメントを得るために、ヒンジ領域内で I g G を切断するパピンの存在下で完全長 I g G をインキュベーションし、それによって 2 本の F a b フラグメント及び F c 部分を放出させる。

#### 【 0 1 0 3 】

F a b 分子を、アフィニティークロマトグラフィー、例えばプロテイン G 又はプロテイン L によって単離する。あるいは、低結合親和性及び低結合能の場合、F a b を、分子の p I を利用する陽イオン交換クロマトグラフィー ( C E X ) によって捕捉する。さらなる直交精製工程によって、宿主細胞タンパク質及び混入物、例えばパピン、D N A 又はウイルスを除去する。

40

#### 【 0 1 0 4 】

本発明の別の態様では、抗体分子は、本明細書において記載される抗体分子のアミノ酸配列変異体である。

#### 【 0 1 0 5 】

抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体 D N A に適切なヌクレオチド変化を導入することによって、又はペプチド合成によって調製することができる。このような変異体には、例えば、本明細書における実施例の抗体のアミノ酸配列内の残基から欠失させたもの、及び / 又はそれに挿入したもの、及び / 又はそれを置換したものが挙げられる。最終構築物が所望の性質を有するという条件で、その最終構築物に到達するために欠失、挿入、及び置換

50

の任意の組み合わせが作られる。また、アミノ酸変化により、グリコシル化部位の数又は位置が変化されるなど、ヒト化抗体又は変異抗体の翻訳後プロセスが変更されてもよい。

【0106】

抗体の特定の残基又は領域であって、突然変異誘発に好ましい位置の残基又は領域を同定するのに有用な方法は、Cunningham及びWells(Science, 244:1081-1085 (1989))によって記載されているように「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、ターゲット残基のうちの一残基又は群(例えば、a r g、a s p、h i s、l y s、及びg l uなどの荷電残基)を同定し、中性又は負電荷のアミノ酸(典型的には、アラニン)で置換してアミノ酸と抗原との相互作用に影響を与える。次に、置換部位で若しくは置換部位のためにさらなる変異又は他の変異を導入することによって、置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸位置を絞り込む。従って、アミノ酸配列変異を導入するための部位を予め決定する一方で、突然変異の性質それ自体を予め決定する必要はない。例えば、所定部位での突然変異の成果を分析するために、アラニンスキャニング又はランダム突然変異誘発をターゲットコドン又はターゲット領域で実行し、所望の活性について、発現された抗体変異体をスクリーニングする。

10

【0107】

アミノ酸配列挿入体には、1個の残基から100個以上の残基を含有するポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端融合体及び/又はカルボキシル末端融合体、並びに単一若しくは複数のアミノ酸残基の配列内挿入体が挙げられる。末端挿入体の例には、エピトープタグに融合された抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異体には、抗体の血清半減期を増加させる酵素又はポリペプチドの抗体のN末端又はC末端への融合が挙げられる。

20

【0108】

別の種類の変異体は、アミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、抗体分子内で少なくとも1個のアミノ酸残基が除去されており、その位置に異なる残基が挿入されている。置換突然変異誘発について最も関心のある部位には、超可変領域が挙げられるが、FRの変更改も企図される。保存的置換を、以下の表に「好ましい置換」の見出しで示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、「例示的な置換」と示されるより実質的な変化、又はアミノ酸クラスに関して以下にさらに記載されるようなより実質的な変化を導入して、その産物をスクリーニングしてもよい。

【0109】

30

## 【化3】

元の残基	例示的な置換	好ましい置換	
Ala (A)	val; leu; ile	val	
Arg (R)	lys; gln; asn	lys	
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln	
Asp (D)	glu; asn	glu	
Cys (C)	ser; ala	ser	
Gln (Q)	asn; glu	asn	
Glu (E)	asp; gln	asp	10
Gly (G)	ala	ala	
His (H)	arg; asn; gln; lys;	arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu	
Leu (L)	ile; norleucine; val; met; ala; phe	ile	
Lys (K)	arg; gln; asn	arg	
Met (M)	leu; phe; ile	leu	
Phe (F)	tyr; leu; val; ile; ala;	tyr	
Pro (P)	ala	ala	
Ser (S)	thr	thr	
Thr (T)	ser	ser	
Trp (W)	tyr; phe	tyr	
Tyr (Y)	phe; trp; thr; ser	phe	20
Val (V)	leu; ile; met; phe ala; ノルロイシン;	leu	

## 【0110】

タンパク質化学において、抗体の生物学的特性は、(a)置換領域におけるポリペプチド骨格の、例えばシート又はヘリカルコンフォメーションとしての構造、(b)ターゲット部位での分子の荷電若しくは疎水性、又は(c)側鎖のかさを維持することに及ぼす作用が顕著に異なる置換を選択することによって達成できることが、一般に認められている。天然に存在する残基は、共通の側鎖性質に基づき群に分類される：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；
- (2) 中性親水性：cys、ser、thr；
- (3) 酸性：asp、glu；
- (4) 塩基性：asn、gln、his、lys、arg；
- (5) 鎖の配向に影響を与える残基：gly、pro；及び
- (6) 芳香族：trp、tyr、phe。

30

## 【0111】

非保存的置換は、これらのクラスのうち1つのメンバーを別のクラスに交換することを伴うものである。

## 【0112】

一般に、ヒト化抗体又は変異抗体の適切なコンフォメーションを維持することに関与しない任意のシステイン残基もセリンで置換して、分子の酸化安定性を改善するか、異常な架橋を防止するか、又は細胞毒性化合物若しくは細胞増殖抑制性化合物への所定の結合点を与えることができる。逆に、抗体にシステイン結合を加えて、その安定性を改善することができる(特に、その抗体がFvフラグメントなどの抗体フラグメントである場合)。

40

## 【0113】

置換変異体の1種は、親抗体(例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体)の1つ以上の超可変領域残基の置換を含む。一般に、さらなる開発のために選択されて得られた変異体は、それらが作成された親抗体と比較して改善された生物学的特性を有する。このような置換変異体を作成するのに便利な方法は、ファージディスプレイを用いた親和性成熟である。簡潔に言えば、いくつかの超可変領域部位(例えば、6~7個の部位)を突然変異させて、

50

考えられるすべてのアミノ置換を各部位に作成する。そのように作成された抗体変異体は、線維状ファージ粒子から、各粒子内にパッケージされたM13の遺伝子III産物との融合物として一価的にディスプレイされる。次に、ファージディスプレイされた変異体をそれらの生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。変更のための超可変領域部位候補を同定するために、アラニンスキャニング突然変異誘発を行って、抗原結合に顕著に寄与する超可変領域残基を同定することができる。あるいは、又は加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体とヒトダビガトランとの間の接触点を同定することが有益であり得る。このような接触残基及び隣接残基は、本明細書において詳述される技術による置換の候補である。このような変異体を作成したら、変異体のパネルを本明細書において記載されるスクリーニングに供し、1つ以上の関連するアクセ

10

**【0114】**

抗体の別の種類のアミノ酸変異体は、抗体の元のグリコシル化パターンを変化させる。「変化させる」は、抗体に見られる1つ以上の炭水化物部分を除去すること、及び/又は抗体に存在しない1つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味する。

**【0115】**

いくつかの実施態様では、本発明の抗体を改変してグリコシル化部位を付加することが望ましいことがある。抗体のグリコシル化は、典型的には、N-結合型又はO-結合型のいずれかである。N-結合型は、アスパラギン残基側鎖に炭水化物部分を結合させることを指す。アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-トレオニン（式中、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である）のトリペプチド配列は、アスパラギン側鎖に炭水化物部分を酵素的に結合させるための認識配列である。従って、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列のいずれかが存在することで、潜在的グリコシル化部位が生じる。O-結合型グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はトレオニン（もっとも5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリシンも使用することができる）に、糖であるN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの1つを結合させることを指す。従って、所定のタンパク質、例えば抗体をグリコシル化するためには、1つ以上の上記トリペプチド配列を含有するようにタンパク質のアミノ酸配列を操作する（N-結合型グリコシル化部位の場合）。また、1つ以上のセリン又はトレオニン残基を元の抗体配列に付加するか、又はそれらの残基で置換することによって、変化させてもよい（O-結合型グリコシル化部位の場合）。

20

30

**【0116】**

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当技術分野で公知の多様な方法によって調製される。これらの方法には、天然の供給源から単離すること（天然に存在するアミノ酸配列変異体の場合）、又は本明細書において記載される抗体分子の先に調製した変異体型若しくは非変異体型をオリゴヌクレオチド介在性（又は部位特異的）突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発することによって調製することが挙げられるが、これらに限定されない。上記に概説するように、本発明の抗体分子の抗原は、抗凝固薬である。抗原は、動物の免疫処置によって、又はファージディスプレイ法のように配列ライブラリーから抗体配列を選択することによって抗体分子を作成するのに使用される。

40

**【0117】**

動物のための免疫処置プロトコールは、当技術分野において周知である。適切な免疫応答を達成するために、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、スクアレン、又はフロイント完全アジュバント/フロイント不完全アジュバントのようなアジュバントに抗原を結合させることが必要なことがある。ダビガトランのような本発明の文脈における抗原は、主に比較的小型の有機分子であって、動物に投与されたときに抗体の形成を刺激しないことがある有機分子である。従って、抗原をハプテンのような巨大分子に結合させることが必要なことがある。

**【0118】**

50

さらなる態様では、本発明は、医薬に使用するための上記抗体分子に関する。

【0119】

さらなる態様では、本発明は、前記抗体分子及び薬学的な担体を含む医薬組成物に関する。

【0120】

治療に使用するために、抗体分子は、動物又はヒトへの投与を容易にするのに適切な医薬組成物に含められる。抗体分子の典型的な製剤は、抗体分子を生理学的に許容しうる担体、賦形剤又は安定化剤と混合することによって、凍結乾燥若しくは別の方法で乾燥された製剤、あるいは水性溶液又は水性懸濁液若しくは非水性懸濁液の形態で調製することができる。担体、賦形剤、調整剤又は安定化剤は、用いられる投与量及び濃度で非毒性である。それらには、緩衝系、例えばリン酸、クエン酸、酢酸及び他の無機酸又は有機酸並びにそれらの塩；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸及びメチオニン；保存料、例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコール又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルパラベン又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン又はポリエチレングリコール（PEG）；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン；単糖、二糖、オリゴ糖又は多糖及び他の炭水化物、例えばグルコース、マンノース、スクロース、トレハロース、デキストリン又はデキストラン；キレート剤、例えばEDTA；糖アルコール、例えばマンニトール又はソルビトール；塩形成性対イオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；及び/又は、イオン性界面活性剤又は非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN（商標）（ポリソルベート）、PLURONICS（商標）又は脂肪酸エステル、脂肪酸エーテル若しくは糖エステルが挙げられる。エタノール又はイソプロパノールなどの有機溶媒もまた、抗体製剤に含められ得る。賦形剤はまた、放出改変機能又は吸収改変機能を有してもよい。

10

20

【0121】

一態様では、医薬組成物は、水性緩衝液中に10～20mg/mlの濃度で抗体分子を含むか、又はこのような溶液から作られた凍結乾燥物を含む。

30

【0122】

好ましい適用様式は、注入又は注射（静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、皮内）による非経口的なものであるが、吸入、経皮、鼻腔内、口腔、経口などによる他の適用様式もまた適用可能であり得る。

【0123】

さらなる態様では、本発明は、抗凝固治療の副作用、特に出血事象の治療又は予防に使用するための上記抗体分子に関する。

【0124】

さらなる態様では、本発明は、本明細書において記載される疾患若しくは障害、特に抗凝固治療の副作用の処置又は予防のための医薬品を製造するための、本明細書において記載される抗体分子の使用に関する。

40

【0125】

さらなる態様では、本発明は、抗凝固薬、特にダビガトラン又はダビガトランエテキシラートの過剰投与をリバースするために使用するための上記抗体分子に関する。

【0126】

さらなる態様では、本発明は、抗凝固薬、特にダビガトラン又はダビガトランエテキシラートの解毒剤として使用するための上記抗体分子に関する。

【0127】

さらなる態様では、本発明は、抗凝固治療の副作用を治療又は予防する方法であって、それを必要とする患者に上記抗体分子の有効量を投与することを含む方法に関する。

50



## 【0128】

さらなる態様では、本発明は、抗凝固治療における過剰投与事象を処置する方法であって、それを必要とする患者に上記抗体分子の有効量を投与することを含む方法に関する。

## 【0129】

さらなる態様では、本発明は、ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はそれらの薬学的に許容しうる塩で処置されている患者の血漿中のダビガトラン又はダビガトランの1-0-アシルグルクロニドの濃度を低下させるための方法であって、患者におけるダビガトラン又は1-0-アシルグルクロニドの活性を中和するリバーシブル剤を投与する工程を含む方法に関する。

## 【0130】

さらなる態様では、本発明は、ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はそれらの薬学的に許容しうる塩で処置されている患者に使用するためのダビガトラン又は1-0-アシルグルクロニドの活性を中和するリバーシブル剤であって、患者が致命的と考えられる大量出血をしているか、若しくは血行動態の悪化に向かっているか、又は患者が緊急の医療措置を必要としている、リバーシブル剤に関する。

## 【0131】

さらなる態様では、本発明は、ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はそれらの薬学的に許容しうる塩で処置されている患者の血漿中のダビガトラン又はダビガトランの1-0-アシルグルクロニドの濃度を低下させるための方法であって、患者におけるダビガトラン又は1-0-アシルグルクロニドの活性を中和するリバーシブル剤を投与する工程を含み、ここで患者が致命的と考えられる大量出血をしているか、若しくは血行動態の悪化に向かっているか、又は患者が緊急の医療措置を必要としている、方法に関する。

## 【0132】

さらなる態様では、本発明は、ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はその薬学的に許容しうる塩で処置されている患者におけるダビガトラン又はダビガトランの1-0-アシルグルクロニドの抗凝固作用をリバーシブルする方法であって、患者におけるダビガトラン又は1-0-アシルグルクロニドの活性を中和するリバーシブル剤を投与する工程を含み、ここで患者が致命的と考えられる大量出血をしているか、若しくは血行動態の悪化に向かっているか、又は患者が緊急の医療措置を必要としている、方法に関する。

## 【0133】

好ましい実施形態では、リバーシブル剤は、ダビガトランに対する抗体分子であって、ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート及び/又は1-0-アシルグルクロニドの抗凝固活性を中和できる抗体分子である。別の好ましい実施形態では、リバーシブル剤は、本明細書において記載されるダビガトランに対する抗体分子である。

## 【0134】

好ましくは、血漿中のダビガトラン又はダビガトランの1-0-アシルグルクロニドの濃度は、0 nMよりも高いが1000 µM未満であり、ダビガトラン又は1-0-アシルグルクロニドの活性を中和するのに使用されるリバーシブル剤は、リバーシブル剤に対するダビガトラン又はダビガトランの1-0-アシルグルクロニドの化学量論量で存在する。

## 【0135】

さらなる態様では、血漿中のダビガトラン又はダビガトランの1-0-アシルグルクロニドの濃度は、0 nMよりも高いが1000 µM未満であり、ダビガトラン又は1-0-アシルグルクロニドの活性を中和するのに使用されるリバーシブル剤は、リバーシブル剤に対するダビガトラン又はダビガトランの1-0-アシルグルクロニドのモル比が1:1~1:100で存在する。

## 【0136】

さらなる態様では、血漿中のダビガトラン又はダビガトランの1-0-アシルグルクロニドの濃度は、30 nM~1000 µMであり、ダビガトラン又は1-0-アシルグルクロ

10

20

30

40

50

ニドの活性を中和するのに使用されるリバーシ剤は、リバーシ剤に対するダビガトラン又はダビガトランの1-O-アシルグルクロニドの比が30nM~1000µMで存在する。

【0137】

別の態様では、本発明は、凝固能力障害又は外傷により出血を経験しているか、又は出血のリスクがある患者におけるダビガトラン又はダビガトランの1-O-アシルグルクロニドの活性をリバーシ又は低下させるための方法であって、

(a) 患者の中に存在するダビガトラン又はダビガトランの1-O-アシルグルクロニドの量を測定する工程；

(b) 患者において測定されたダビガトラン又はダビガトランの1-O-アシルグルクロニドの活性をリバーシ又は低下させるのに有効な量の薬剤を投与する工程；及び

(c) 患者のトロンビン凝固時間をモニタリングして、ダビガトラン又はダビガトランの1-O-アシルグルクロニドの活性のリバーシ又は低下が達成されたことを確認する工程を含む方法に関する。

【0138】

好ましい態様では、ダビガトラン又はダビガトランの1-O-アシルグルクロニドの活性のリバーシは、100%である。さらに好ましい態様では、ダビガトラン又はダビガトランの1-O-アシルグルクロニドの活性の低下は、患者におけるダビガトラン又はダビガトランの1-O-アシルグルクロニドの10~99%である。

【0139】

投与されるべき抗体の「治療有効量」は、抗凝固治療の副作用を予防、改善、又は治療するのに必要な最小量、特に出血を止めるのに有効な最小量である。これは、抗体分子の化学量論量で達成することができる。

【0140】

ダビガトランは、例えば、推奨用量で投与された場合に、200nM程度の血漿濃度に達し得る。分子量約50kDの一価抗体分子が使用される場合、ポーラスのように静脈内投与すると、例えば、約1mg/kgの用量で中和に達し得る。別の実施態様では、ヒト患者に適用されるFab分子の用量は、適用1回あたり50~1000mg、例えば100、200、500、750、又は1000mgであり得る。状況に応じて、例えば、ダビガトランが患者に過剰投与された場合、さらにより高い用量、例えば適用1回あたり1250、1500、1750又は2000mgを適用することが適切であり得る。適切な用量は、投与される抗凝固薬の種類及び用量；このような投与からの経過時間、抗原分子の性質、患者の状態、並びに他の要因に応じて相違し得る。熟練の専門家は、治療的に有効かつ安全な用量を確立するための方法を知っている。

【0141】

さらなる態様では、本発明は、ダビガトラン及び/又はダビガトランエテキシラートに対する結合親和性を有する抗体分子に関する。好ましくは、抗体分子は、例えば、表面プラズモン共鳴分析(Malmqvist M., "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics. "Curr Opin Immunol. 1993 Apr ;5(2):282-6.)又は結合平衡除外アッセイ(KinExA)技術(Darling, R.J., and Brault P-A., "Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions." ASSAY and Drug Development Technologies. 2004, Dec 2(6): 647-657)により測定される場合に、0.1pM~100µM、好ましくは1pM~100µM、より好ましくは1pM~1µMの範囲のK<sub>D</sub>値を有する親和性でダビガトラン及び/又はダビガトランエテキシラートに結合する。

【0142】

また、本発明の抗体分子の分析及び診断の手順に使用して、例えば血漿、血清、又は他の体液などのサンプル中の抗原濃度を測定することができる。例えば、抗原分子は、実施例に記載されるような酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)に使用することができる。従って、さらなる態様では、本発明は、本明細書において記載される抗体分子を含む分析キット及び診断キット、並びに分析及び診断の各方法に関する。

10

20

30

40

50

## 【0143】

さらなる態様では、本発明は、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体分子を製造する方法であって、

(a) 発現コントロール配列と機能的に結合した前記抗体分子をコードする1つ以上の核酸を含む宿主細胞を提供すること、

(b) 前記宿主細胞を培養すること、及び

(c) 細胞培養物から抗体分子を回収することを含む方法に関する。

## 【0144】

本発明は、経口抗凝固薬、特に直接トロンビン阻害剤の中和に有用な材料を含有する製品及びキットをさらに提供する。製品は、ラベル付きの容器を含む。適切な容器には、例えば、ボトル、バイアル、及び試験管が挙げられる。容器は、ガラス、金属、プラスチック又はそれらの組み合わせなどの多様な材料から形成されてもよい。容器は、本明細書において記載される抗体又はダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ若しくはその薬学的に許容しうる塩を含む医薬組成物を収容する。医薬組成物中の活性薬剤は、特定の抗体又はダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ若しくはその薬学的に許容しうる塩である。抗体の容器上のラベルは、医薬組成物が、*in vivo*でダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はその薬学的に許容しうる塩を中和又は部分的に中和するのに使用されることを示す。

10

20

## 【0145】

本発明のキットは、1つ以上の上記容器を含む。キットは、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用説明書を含む添付文書などの商業的及び利用者の観点から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。

## 【0146】

本発明の一実施態様では、キットは、本明細書において記載されるいずれかの抗体のうちの1つの抗体又はその医薬組成物を含む。例えば、キットは、(1)本明細書において記載されるいずれかの抗体又はその医薬組成物、(2)容器及び(3)ラベルを含み得る。

## 【0147】

別の実施態様では、キットは、本明細書において記載されるいずれかの抗体のうちの1つの抗体又はその医薬組成物、及びダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はその薬学的に許容しうる塩を含む。ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はその薬学的に許容しうる塩の形態は、固体、液体又はゲルの形態であり得る。好ましい実施態様では、ダビガトランエテキシラートの薬学的に許容しうる塩は、メシラート塩である。さらに別の好ましい実施態様では、ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はその薬学的に許容しうる塩の投与単位あたりの量は、約50mg~約400mg、約75mg~約300mg、約75mg~150mg、又は約110mg~約150mgであり、1日1回(QD)又は1日2回(BID)投与される。例えば、キットは、(1)本明細書において記載されるいずれかの抗体又はその医薬組成物、(2)ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はその薬学的に許容しうる塩の医薬組成物、(3)容器及び(4)ラベルを含み得る。

30

40

## 【0148】

別の実施態様では、キットは、(1)ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はその薬学的に許容しうる塩を含む第1の医薬組成物、(2)本明細書において記載されるいずれかの抗体又はその組み合わせを含む第2の医薬組成物、(3)患者に前記第1及び第2の医薬組成物を別々に投与するための説明書を含み、ここで、前記第1及び第2の医薬組成物は、別々の容器に含まれており、前記第2の医薬組成物は、ダビガトラン又はダビガトランの1-O-アシルグルクロニドの中和又は部分

50

的な中和を必要としている患者に投与される。本発明はまた、ダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はその薬学的に許容しうる塩で処置されている患者においてダビガトラン又はダビガトランの1-O-アシルグルクロニドを中和又は部分的に中和するための診断方法であって、本明細書において記載される抗体のいずれか1つ、その組み合わせ又はその医薬組成物を投与することを含む方法を提供する。具体的には、本発明は、患者においてダビガトラン又はダビガトランの1-O-アシルグルクロニドを中和又は部分的に中和するための方法であって、(a)患者がダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はその薬学的に許容しうる塩で処置されていたこと、及び患者によって取り込まれた量を確認する工程；(b)凝固若しくは血液凝固の試験又はアッセイを行う前に、本明細書において記載される抗体のいずれか1つ又はその組み合わせでダビガトラン又は1-O-アシルグルクロニドを中和する工程、ここで、ダビガトラン又はダビガトランの1-O-アシルグルクロニドは試験又はアッセイの結果の正確な読み出しを妨害するであろう；(c)患者から採取されたサンプルで凝固若しくは血液凝固の試験又はアッセイを行って、ダビガトランもダビガトランの1-O-アシルグルクロニドも存在しない場合の血餅形成レベルを測定する工程；並びに(d)患者における血餅形成と分解との間の適切なバランスを達成するために、患者に投与されるダビガトラン、ダビガトランエテキシラート、ダビガトランのプロドラッグ又はその薬学的に許容しうる塩の量を調整する工程を含む方法を提供する。ダビガトラン又はダビガトランの1-O-アシルグルクロニドに対する抗体のモル比は、0.1~100、好ましくは0.1~10のモル比である。試験又はアッセイの結果の正確な読み出しは、フィブリノゲンレベル、活性化プロテインC抵抗性又は関連試験の正確な読み出しでもよい。

10

20

## 【0149】

## 実施例

## I. ポリクローナル抗ダビガトラン抗体の製造

ポリクローナル抗ダビガトラン抗体の製造のために、2種の異なるハプテン及び異なるモル投入量比のハプテンと担体タンパク質(BSA)を用いて、3種の異なる免疫原を製造した。

## 【0150】

スクリーニングのために、酵素ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)-コンジュゲートを製造し、酵素免疫吸着アッセイ(ELISA)を開発した。

30

## 【0151】

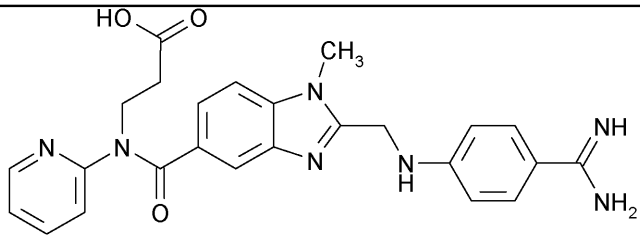
ポリクローナル抗体のさらなる精製は、プロテインAセファロースFFのアフィニティークロマトグラフィーによって行った。

## 【0152】

## 1. 材料及び方法

## 試験化合物(ダビガトラン)

## 【表1】

コード:	ダビガトラン, 両性イオン
構造式:	 $C_{25}H_{25}N_7O_3$ 分子量: 471.5 g/mol

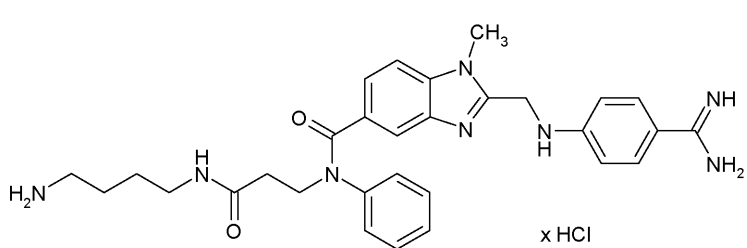
40

50

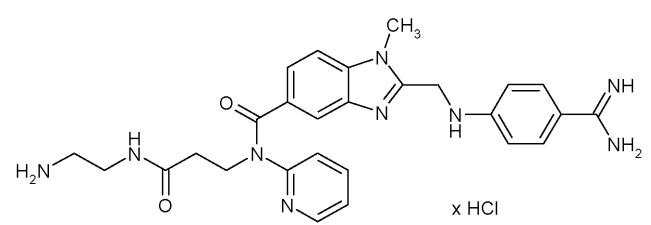
## 【 0 1 5 3 】

## 1 . 1 免疫原及びトレーサーの合成に使用したハプテン

## 【 表 2 】

コード:	ハプテン 1
リガンドの構造式:	 <p style="text-align: center;"><math>C_{30}H_{36}N_8O_2 \cdot HCl</math> 分子量: 577.13 g/mol</p>

10

コード:	ハプテン 2
リガンドの構造式:	 <p style="text-align: center;"><math>C_{27}H_{31}N_9O_2 \cdot HCl</math> 分子量: 550.07 g/mol</p>

20

## 【 0 1 5 4 】

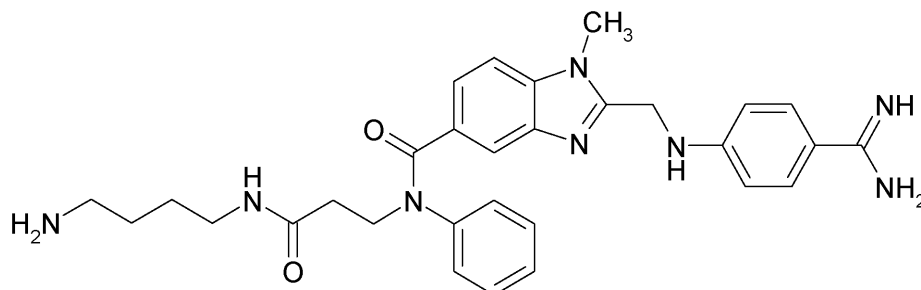
## 1 . 2 ハプテンの合成

ハプテン（ハプテン 1 及びハプテン 2）を以下のように合成した：

ハプテン 1 2 - [ ( 4 - カルバミイミドイル - フェニルアミノ ) - メチル ] - 1 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 5 - カルボン酸 [ 2 - ( 4 - アミノ - ブチルカルバモイル ) - エチル ] - フェニル - アミド

30

## 【 化 4 】

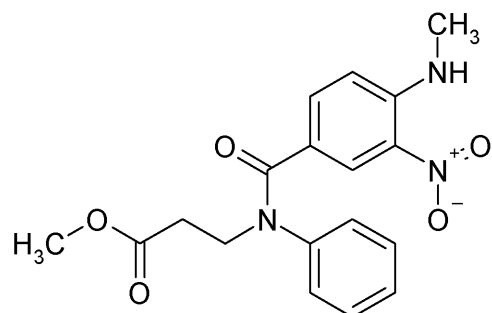


40

## 【 0 1 5 5 】

1 a 3 - [ ( 4 - メチルアミノ - 3 - ニトロ - ベンゾイル ) - フェニル - アミノ ] - プロピオン酸メチルエステル

## 【化5】



10

## 【0156】

4-メチルアミノ-3-ニトロ-安息香酸クロリド(23.3 mmol)及び3-フェニル-アミノ-プロピオン酸メチルエステル(23.3 mmol)を80 mLの無水テトラヒドロフラン(THF)に溶解させた溶液に、トリエチルアミン(50.2 mmol)を攪拌しながら室温で滴下した。3時間後に、反応混合物を蒸発乾固し、残った固体を水と一緒に摩砕し、固体生成物をろ過により単離した。

収率：99%

$C_{18}H_{19}N_3O_5$  (357.36)

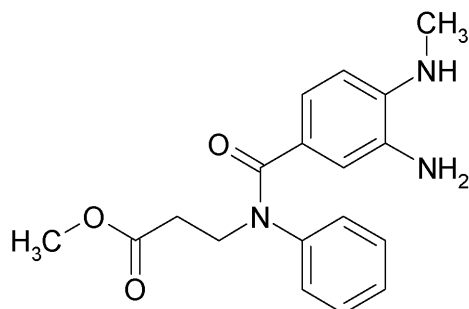
TL C (シリカゲル;ジクロロメタン/エタノール19:1):  $R_f = 0.48$

## 【0157】

1b 3-[(3-アミノ-4-メチルアミノ-ベンゾイル)-フェニル-アミノ]-プロピオン酸メチルエステル

## 【化6】

20



30

## 【0158】

触媒としてPd(炭上に10%)を用いてエタノール中、室温で水素化することによって生成物1aのニトロ基を還元した。

収率：99%

$C_{18}H_{21}N_3O_3$  (327.38)

TL C (シリカゲル;ジクロロメタン/エタノール9:1):  $R_f = 0.23$

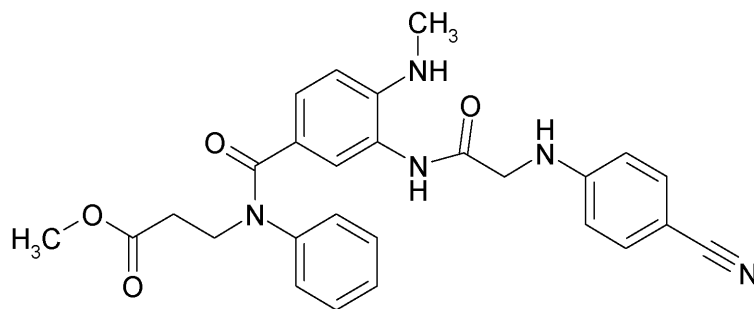
質量スペクトル(ESI):  $[M+H]^+ = 328$

## 【0159】

1c 3-({3-[2-(4-シアノ-フェニルアミノ)-アセチルアミノ]-4-メチルアミノ-ベンゾイル}-フェニル-アミノ)-プロピオン酸メチルエステル

40

## 【化 7】



10

## 【0160】

C D I ( 2 3 . 2 m m o l ) を用いて、生成物 1 b ( 2 3 . 2 m m o l ) 及び N - ( 4 - シアノ - フェニル ) - グリシン ( 2 3 . 2 m m o l ) を無水 T H F 中、室温でカップリングさせた。反応の完了後に、混合物を蒸発乾固させ、さらに精製せずに粗生成物を使用した。

収率：97%

$C_{27}H_{27}N_5O_4$  ( 4 8 5 . 5 4 )

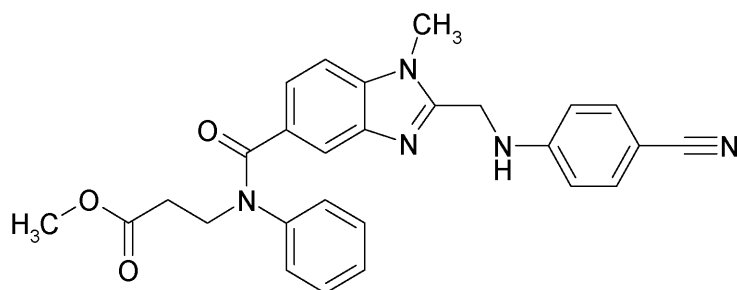
質量スペクトル ( E S I ) :  $[M+H]^+ = 486$

## 【0161】

1 d 3 - ( { 2 - [ ( 4 - シアノ - フェニルアミノ ) - メチル ] - 1 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 5 - カルボニル } - フェニル - アミノ ) - プロピオン酸メチルエステル

20

## 【化 8】



30

## 【0162】

生成物 1 c ( 2 2 . 6 m m o l ) を 1 0 0 m L の濃酢酸に溶解させた溶液を 1 時間加熱還流した。次に、その溶液を蒸発乾固し、残った固体を水と一緒に摩砕し、攪拌しながら pH を約 8 ~ 9 に調整した。酢酸エチルで抽出することによって粗生成物を単離し、シリカゲルのクロマトグラフィー ( 溶離液 : ジクロロメタン / エタノール 1 : 1 ) によって精製した。

収率：58%

$C_{27}H_{25}N_5O_3$  ( 4 6 7 . 5 2 )

T L C ( シリカゲル ; ジクロロメタン / エタノール 9 : 1 ) :  $R_f = 0.71$

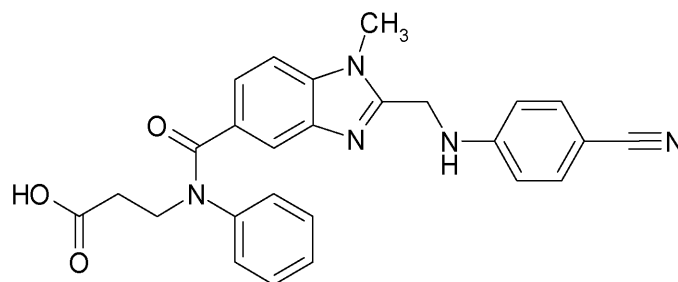
質量スペクトル ( E S I ) :  $[M+H]^+ = 468$

40

## 【0163】

1 e 3 - ( { 2 - [ ( 4 - シアノ - フェニルアミノ ) - メチル ] - 1 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 5 - カルボニル } - フェニル - アミノ ) - プロピオン酸

## 【化9】



## 【0164】

10

生成物 1 d ( 13 . 0 mmol ) を 100 mL のメタノールに溶解させた溶液に、水酸化ナトリウム ( 20 . 0 mmol ) を添加した。混合物を 40 で 2 . 5 時間攪拌し、次に蒸発乾固した。残った固体を 100 mL の水と一緒に攪拌し、濃酢酸で pH を約 6 に調整した。沈殿した生成物をろ過によって単離し、水で洗浄し、60 で乾燥させた。

収率 : 88 %

$C_{26}H_{23}N_5O_3$  ( 453 . 49 )

TLC ( シリカゲル ; ジクロロメタン / エタノール 9 : 1 ) :  $R_f = 0 . 33$

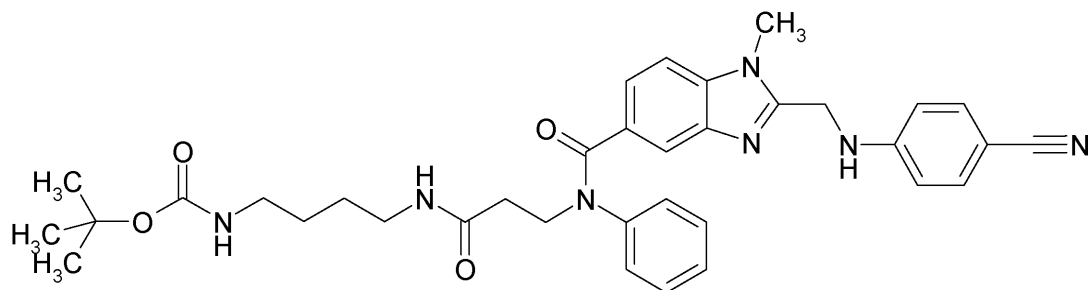
質量スペクトル ( ESI ) :  $[M + H]^+ = 454$

## 【0165】

20

1 f { 4 - [ 3 - ( { 2 - [ ( 4 - シアノ - フェニルアミノ ) - メチル ] - 1 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 5 - カルボニル } - フェニル - アミノ ) - プロピオニルアミノ ] - ブチル } - カルバミン酸 tert - ブチルエステル

## 【化10】



30

## 【0166】

生成物 1 e ( 5 . 23 mmol )、2 - ( 1 H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル ) - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート ( TBTU、5 . 23 mmol ) 及び N - メチル - モルホリン ( 5 . 23 mmol ) を 20 mL の DMF に溶解させた溶液を室温で 30 分間攪拌した。次に、( 4 - アミノ - ブチル ) - カルバミン酸 tert - ブチルエステル ( 5 . 23 mmol ) を添加し、混合物を室温でさらに 24 時間攪拌した。次に、混合物を水 ( 100 mL ) で希釈し、酢酸エチルで抽出することによって生成物を単離した。

収率 : 92 %

$C_{35}H_{41}N_7O_4$  ( 623 . 75 )

TLC ( シリカゲル ; ジクロロメタン / エタノール 9 : 1 ) :  $R_f = 0 . 51$

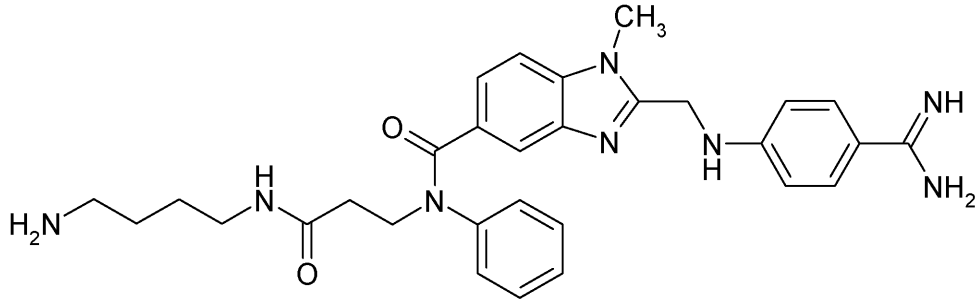
40

## 【0167】

1 g 2 - [ ( 4 - カルバムイミドイル - フェニルアミノ ) - メチル ] - 1 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 5 - カルボン酸 [ 2 - ( 4 - アミノ - ブチルカルバモイル ) - エチル ] - フェニル - アミド



## 【化 1 1】



10

## 【 0 1 6 8 】

生成物 1 f ( 4 . 8 1 mmol ) を H C l の飽和エタノール溶液 ( 2 5 0 mL ) に溶解させ、混合物を室温で一晩攪拌し、次に 3 0 ° で蒸発乾固した。残った粗物質を 2 0 0 mL の無水エタノールに溶解させ、次に炭酸アンモニウム ( 4 8 . 1 mmol ) を添加し、混合物を室温で一晩攪拌した。溶媒を蒸発させた後に、残った粗物質を約 5 mL のエタノールと一緒に摩砕し、不溶性物質をろ過によって分離し、溶媒を 3 0 ° で蒸発させた。次に、生成物を 3 0 mL の水に溶解させ、この溶液を約 2 g の炭と一緒に攪拌し、ろ過し、蒸発乾固した。

収率 : 9 0 %

$C_{30}H_{36}N_8O_2$  ( 5 4 0 . 6 7 )

T L C ( 逆相 R P - 8 ; メタノール / 5 % N a C l 水溶液 9 : 1 ) :  $R_f = 0 . 7 9$

質量スペクトル ( E S I ) :  $[ M + H ]^+ = 5 4 1$

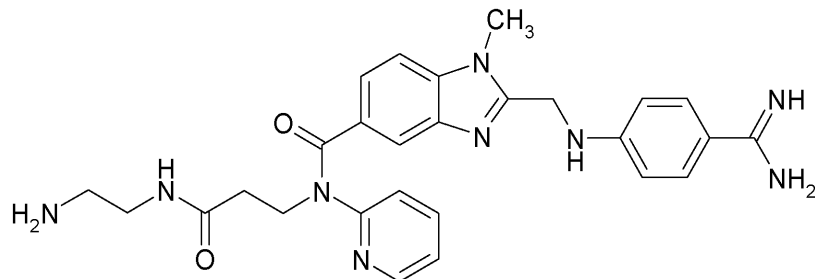
$[ M + C l ]^- = 5 7 5 / 7$

20

## 【 0 1 6 9 】

ハプテン 2 2 - [ ( 4 - カルバムイミドイル - フェニルアミノ ) - メチル ] - 1 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 5 - カルボン酸 [ 2 - ( 2 - アミノ - エチルカルバモイル ) - エチル ] - ピリジン - 2 - イル - アミド

## 【化 1 2】

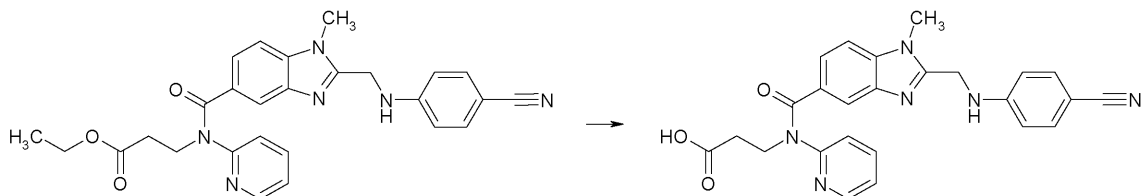


30

## 【 0 1 7 0 】

2 a 3 - ( { 2 - [ ( 4 - シアノ - フェニルアミノ ) - メチル ] - 1 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 5 - カルボニル } - ピリジン - 2 - イル - アミノ ) - プロピオン酸

## 【化 1 3】



40

## 【 0 1 7 1 】

水酸化ナトリウム ( 5 0 . 0 mmol ) を 5 0 0 mL のエタノール及び 5 0 mL の水に溶解させた溶液に、3 - ( { 2 - [ ( 4 - シアノ - フェニルアミノ ) - メチル ] - 1 - メチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 5 - カルボニル } - ピリジン - 2 - イル - アミノ ) - プロピオン酸エチルエステル ( 4 1 . 4 mmol ) を添加した。混合物を室温で 3 時間攪拌し、次に約

50

350 mLのエタノールを留出させ、約100 mLの水を添加し、pHを6に調整した。次に、ジエチルエーテル(50 mL)を添加し、混合物を一晩攪拌した。生成物をろ過により単離し、さらに精製せずに使用した。

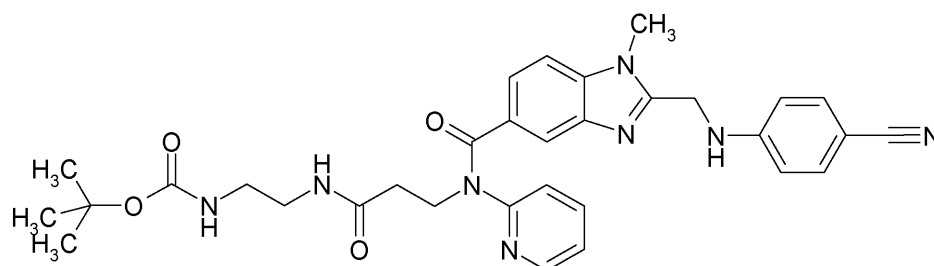
収率：78%

$C_{25}H_{22}N_6O_3$  (454.48)

【0172】

2b {2-[3-(2-[(4-シアノ-フェニルアミノ)-メチル]-1-メチル-1H-ベンゾイミダゾール-5-カルボニル)-ピリジン-2-イル-アミノ]-プロピオニルアミノ]-エチル}-カルバミン酸tert-ブチルエステル

【化14】



【0173】

生成物2a(2.20 mmol)、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート(TBTU、2.20 mmol)及びN-メチル-モルホリン(2.20 mmol)を無水テトラヒドロフラン(100 mL)に溶解させた溶液を室温で15分間攪拌した。次に、(2-アミノ-エチル)-カルバミン酸tert-ブチルエステル(2.20 mmol)を添加し、混合物を室温でさらに24時間攪拌した。次に、混合物を40 mLの水で希釈し、酢酸エチルで抽出することによって生成物を単離し、クロマトグラフィー(シリカゲル;ジクロロメタン/メタノール15:1)によって精製した。

収率：61%

$C_{32}H_{36}N_8O_4$  (596.68)

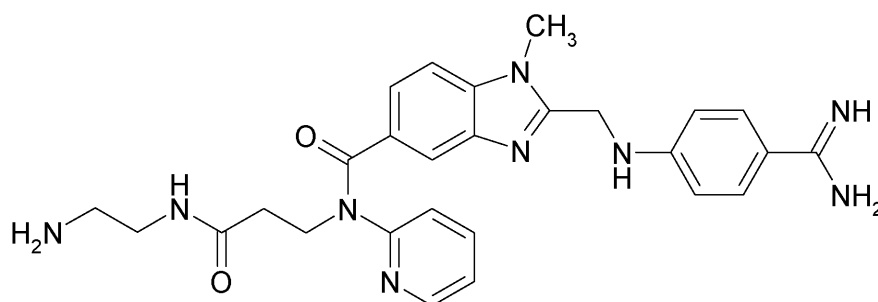
質量スペクトル(ESI):  $[M+H]^+ = 597$

$[M+H]^- = 595$

【0174】

2c 2-[(4-カルバミドイル-フェニルアミノ)-メチル]-1-メチル-1H-ベンゾイミダゾール-5-カルボン酸[2-(2-アミノ-エチルカルバモイル)-エチル]-ピリジン-2-イル-アミド

【化15】



【0175】

生成物2b(1.34 mmol)をHClの飽和無水エタノール溶液(30 mL)に添加した。この溶液を室温で5時間攪拌し、次に30 で蒸発乾固した。エタノール(30 mL)及び炭酸アンモニウム(13.0 mmol)を添加し、混合物を室温で一晩攪拌した。次に、溶媒を蒸発させ、残った物質をジクロロメタン/メタノール(30:1)混合物約4 mLと一緒に5回摩砕し、ろ過し、蒸発させて、無機塩から生成物を分離した。

10

20

30

40

50

収率：27%

$C_{27}H_{31}N_9O_2$  (513.61)

質量スペクトル (ESI) :  $[M + Cl]^- = 548 / 50$

$[M + HCl + Cl]^- = 584 / 6$

$[M + H]^+ = 514$

【0176】

2. 化学物質

2.1 試薬合成用の化学物質

【表3】

名称	規格	供給業者	カタログ番号
1,4-ベンゾキノン		Fluka	12309
ウシ血清アルブミン (BSA)		Serva	11920
1,1'-カルボニル-ジ-(1,2,4-トリア ゾール)		Fluka	21861
クエン酸	分析用	Riedel-De Haën	33114
N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)	合成用	Merck	822275
エタノール	分析用	Baker	8006
フロイントアジュバント (CFA)	完全	Sigma	F-5881
フロイントアジュバント (IFA)	不完全	Sigma	F-5506
グリセリン	純品	Merck	104093
ホースラディッシュペルオキシ ダーゼ HRP	25000 U / 100 mg	Boehringer Mannheim	108090
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	分析用	Riedel-De Haën	30743
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	分析用	Merck	4873
NaHCO <sub>3</sub>	分析用	Merck	106329
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	分析用	Merck	106392
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	分析用	Merck	101217
o-フェニレンジアミン	30 mg 錠	Sigma	P8412
過ホウ酸ナトリウム	純品	Riedel-De Haën	11621
チモール	純品	Merck	8167

10

20

30

40

【0177】

2.2 ELISA用の化学物質

【表 4】

名称	規格	供給業者	カタログ番号
クエン酸	分析用	Riedel-De Haën	33114
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	分析用	Riedel-De Haën	30743
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	分析用	Merck	4873
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	分析用	Merck	6580
NaCl	分析用	Merck	6404
NaOH	分析用	Merck	6498
o-フェニレンジアミン	30 mg 錠	Sigma	P8412
過ホウ酸ナトリウム	純品	Riedel-De Haën	11621
Tween 20	純品	Serva	37470

【 0 1 7 8 】

2 . 3 E L I S A 用の緩衝液

【表 5】

名称	成分	用途
緩衝液 1 安定性:	0.05 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.15 M NaCl, pH = 7.4 約+4°C で 4 週間	コーティング
緩衝液 2 安定性:	緩衝液 1 と同様, +5 g/l BSA 約+4°C で 10 日間	アッセイ緩衝液
緩衝液 3 安定性:	緩衝液 1 と同様, +5 g/l BSA 及び 0.1 g/L チメロサル 約+4°C で 4 週間	マイクロプレートのブロッキング; 保存
緩衝液 4 安定性:	NaOH で pH 5.0 に調整した 0.1 M クエン酸, 6.5 mmol/L 過ホウ酸ナトリウム クエン酸: 約+4°C で 6 ヶ月 過ホウ酸あり: 約+4°C で 10 日間	o-フェニレンジアミン用基質緩衝液
洗浄溶液 安定性:	水, 0.5 g/L Tween 20 周囲温度で 10 日間	マイクロプレートの洗浄
停止試薬 安定性:	2.25 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 周囲温度で 5 年間	o-フェニレンジアミンの発色を停止

10

20

30

Elgastat Maxima-HPLC超純水処理システムからの水を使用して、緩衝溶液を調製した。

## 【 0 1 7 9 】

## 3 . 免疫原の合成

ウサギの免疫系を刺激してダビガトランに対するポリクローナル抗体を産生させるために、カップリング試薬として 1 , 4 - ベンゾキノン又は 1 , 1 ' - カルボニル - ジ - ( 1 , 2 , 4 - トリアゾール ) を使用して、ハプテン ( ハプテン 1 及びハプテン 2 ) を担体タンパク質 ( ウシ血清アルブミン ( B S A ) ) にカップリングさせることによって、3 種の免疫原 ( ロット番号 G L 2 5 6 、 G L 2 5 8 、 及び G L 2 6 2 ) を合成した。

40

## 【 0 1 8 0 】

G L 2 5 6 の合成のために、2 個の反応部位を有するホモ二官能性化合物として 1 , 4 - ベンゾキノンを使用した。まず、それを、酸性 pH で 2 個の部位のうち一方のみにおいてアミノ基と反応させ、そしてアルカリ性 pH でもう一方の部位において反応させて、ポリマー化を最低限とする。G L 2 5 8 及び G L 2 6 2 は、カップリング試薬として 1 , 1 ' - カルボニル - ジ - ( 1 , 2 , 4 - トリアゾール ) を使用し、担体タンパク質に対して異なる投入量比のハプテンを用いて合成した。

## 【 0 1 8 1 】

## 3 . 1 G L 2 5 6 の合成

50

0.75  $\mu\text{Mol}$ のBSAを8.5mLの0.1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液(pH = 4.5)に溶解させた溶液に、0.416mMolの1,4-ベンゾキノン(エタノール1.5mL中)を添加し、室温、暗中で1.5時間インキュベーションした。その後、0.15M  $\text{NaCl}$ で平衡化したセファデックスG25カラムにこの溶液を通して、過剰の1,4-ベンゾキノン(最終体積12.5mL)を除去した。

【0182】

525  $\mu\text{Mol}$ のハプテン(ハプテン1)を0.1M  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液(pH = 8.5)2mLに溶解させた溶液に、2.5mL(0.15  $\mu\text{Mol}$ )の精製BSA溶液を攪拌しながらゆっくりと添加した。BSA溶液を添加する間に、pHを約8.0に調整した。ハプテンと担体タンパク質のモル投入量比は、3500:1であった。

10

【0183】

室温で一晩インキュベーション後に、免疫原を1リットルの蒸留水に対して6回透析した。薄層クロマトグラフィーにより、非結合ハプテンのスポットは、ハプテン-担体コンジュゲート中に残っていないことが示された。

【0184】

免疫原を等分して-20で凍結保存した。免疫原の上清におけるハプテンによるBSAの置換度は、302nmでUV吸収分光法によって測定したところ、約1:18であった。最終溶液中の免疫原の含量は、GL256 0.75mg/mLであった。

【0185】

3.2 GL258の合成

158  $\mu\text{Mol}$ のハプテン2を6.3mLのN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)に溶解させた溶液を室温で調製した。158  $\mu\text{Mol}$ の1,1'-カルボニル-ジ-(1,2,4-トリアゾール)を添加し、まず10で4時間インキュベーションし、その後に室温で30分間インキュベーションした。薄層クロマトグラフィーで化学反応をチェックしたところ、約20~25%であった。次に、0.75  $\mu\text{Mol}$ のBSAを2mLの0.13M  $\text{NaHCO}_3$ に溶解させ、1mLのN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)を攪拌しながら滴下した。pHを約8.3に調整した。その後、ハプテン溶液(6.3mL)及び4mLの0.13M  $\text{NaHCO}_3$ をBSA溶液に攪拌しながら滴下し、pHを8.4に調整した。免疫原GL258について、ハプテンと担体タンパク質のモル投入量比は、210:1であった。

20

30

【0186】

攪拌条件下、室温で一晩インキュベーションした後に、免疫原を1リットルの蒸留水に対して6回透析した。薄層クロマトグラフィーにより、非結合ハプテンのスポットは、ハプテン-担体コンジュゲート中に残っていないことが示された。

【0187】

免疫原を等分して-20で凍結保存した。免疫原の上清におけるハプテンによるBSAの置換度は、302nmでUV吸収分光法によって測定したところ、約1:5であった。最終溶液中の免疫原の含量は、GL258 0.28mg/mLであった。

【0188】

3.3 GL262の合成

225  $\mu\text{Mol}$ のハプテン2を8.75mLのN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)に溶解させた溶液を室温で調製した。225  $\mu\text{Mol}$ の1,1'-カルボニル-ジ-(1,2,4-トリアゾール)を添加し、10で4時間インキュベーションした。薄層クロマトグラフィーで化学反応をチェックしたところ、約20~25%であった。

40

【0189】

次に、0.49  $\mu\text{Mol}$ のBSAを2mLの0.13M  $\text{NaHCO}_3$ に溶解させ、1mLのN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)を攪拌しながら滴下した。pHを約8.2に調整した。その後、ハプテン溶液(8.75mL)及び6mLの0.13M  $\text{NaHCO}_3$ をBSA溶液に攪拌しながら滴下し、pHを8.3に調整した。免疫原GL262について、ハプテンと担体タンパク質のモル投入量比は、460:1であった。

50

## 【0190】

攪拌条件下、室温で一晩インキュベーションした後に、免疫原を1リットルの蒸留水に対して6回透析した。薄層クロマトグラフィーにより、非結合ハプテンのスポットは、ハプテン-担体コンジュゲート中に残っていないことが示された。

## 【0191】

免疫原を等分して-20℃で凍結保存した。免疫原の上清におけるハプテンによるBSAの置換度は、302nmでUV吸収分光法によって測定したところ、約1:32であった。最終溶液中の免疫原の含量は、GL262 0.71mg/mLであった。

## 【0192】

## 4. コンジュゲートの合成

## 4.1 GL261の合成

37.4 μMolのハプテン2を1.5mLのN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)に溶解させた溶液を室温で調製した。37.5 μMolの1,1'-カルボニル-ジ-(1,2,4-トリアゾール)を添加し、まず10℃で4時間インキュベーションし、その後に室温で30分間インキュベーションした。薄層クロマトグラフィーで化学反応をチェックしたところ、約20~25%であった。

## 【0193】

次に、1.125 μMolの酵素ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)を0.4mLの0.13M NaHCO<sub>3</sub>に溶解させ、0.267mLのN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)を攪拌しながら滴下した。pHを約8.2に調整した。その後、0.9mLのハプテン溶液(22.5 μMol)及び0.57mLの0.13M NaHCO<sub>3</sub>をHRP溶液に攪拌しながら滴下し、pHを8.4に調整した。HRPコンジュゲートGL261について、ハプテンとHRPのモル投入量比は、20:1であった。

## 【0194】

攪拌条件下、室温で一晩インキュベーションした後に、ゲルクロマトグラフィーによって、有機溶媒及び過剰のハプテンからHRPコンジュゲートを分離した。0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したセファデックスG25カラムにこの溶液を通した。

## 【0195】

最終濃度のハプテン-HRPコンジュゲート(トレーサー、5.64mg/mL)をBSAでスパイクして濃度を約10mg/mLにして、等体積のグリセリン(凍結防止のため)及びチモールの結晶(細菌の成長を防止するため)を加えた。トレーサー溶液をロット番号GL261とラベルし、等分して-20℃で保存した。

## 【0196】

ハプテンによるHRPの置換度は、302nmでUV分光法によって測定したところ、1:0.2であった。

## 【0197】

BSAでブロッキングしたマイクロタイタープレートにおいて、基質としてo-フェニレン-ジアミン(OPD)及び対照物質としてネイティブなHRPを使用して、トレーサーの比活性を測定した。希釈したHRP標準又はハプテン-HRPコンジュゲートと基質溶液との混合物を暗中で30分間インキュベーションし、硫酸で停止させ、吸光度を490nmで測定した。残りの活性はネイティブなHRPの94%であり、グリセリン中でのコンジュゲート形成の比活性は611U/mLであった。

## 【0198】

トレーサーの規格の概要:

10

20

30

40

【表 6】

種類:	ハプテン 2 - ホースラディッシュペルオキシダーゼ (ロット番号 GL 261)
タンパク質含量:	5.64 mg/mL
比活性:	108 U/mg 611 U/ml (基質グアヤコール及び H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 25°C)
保存:	約 -20°C
使用希釈倍率:	1:40000

10

## 【 0 1 9 9 】

5 . 免疫処置及び抗体の製造

5 . 1 ウサギの免疫処置

100 µgの免疫原 GL 256、GL 258 及び GL 262 を 0.5 mL の 0.9% NaCl 溶液及び 0.5 mL のフロイント完全アジュバント (CFA) のエマルジョンで、12 匹の雌チンチラウサギ (3 月齢) を免疫処置した。続いて翌月に、追加免疫処置を何回か行った。3 回目の免疫処置については、0.5 mL のフロイント不完全アジュバント (IFA) を使用した。4 箇所 of 皮下部位及び 4 箇所 of 筋肉内部に各免疫処置を行った。

20

## 【 0 2 0 0 】

A 群 - 免疫原 GL 256

ウサギ 1 # 50

ウサギ 2 # 51

ウサギ 3 # 52

ウサギ 4 # 53

## 【 0 2 0 1 】

B 群 - 免疫原 GL 258

ウサギ 5 # 54

ウサギ 6 # 55

ウサギ 7 # 56

ウサギ 8 # 57

## 【 0 2 0 2 】

C 群 - 免疫原 GL 262

ウサギ 9 # 46

ウサギ 10 # 47

ウサギ 11 # 48

ウサギ 12 # 49

## 【 0 2 0 3 】

30



## 【表 7】

## 免疫処置のスキーム

1 日目	動物 1 匹あたり 100 µg 免疫原/ mL CFA で 1 回目の免疫処置
29 日目	動物 1 匹あたり 100 µg 免疫原/ mL CFA で 2 回目の免疫処置
57 日目	動物 1 匹あたり 100 µg 免疫原/ mL CFA で 3 回目の免疫処置 免疫原 GL256 及び GL258 の使用によってウサギの健康状態が 悪化するおそれがあった ウサギ 7 #56 は処置しなかった
67 日目	1 回目の採血 (動物 1 匹あたり 2 mL)
81 日目	動物 1 匹あたり 100 µg 免疫原/ mL CFA で 4 回目の免疫処置
91 日目	2 回目の採血 (動物 1 匹あたり 25 mL)
112 日目	動物 1 匹あたり 100 µg 免疫原/ mL CFA で 5 回目の免疫処置
122 日目	動物番号の割当てを失くした 3 回目の最後の採血 (瀉血)*

10

\*ウサギ番号 1~12 を 5 回目の免疫処置の 10 日後に完全に瀉血した。

20

キシラジン(Rompun(登録商標), Bayer, Leverkusen, Germany) 及び塩酸ケタミン(Ketavet(登録商標), Parke-Davis, Freiburg, Germany) による麻酔下で、頸動脈を介して瀉血を行った。

## 【 0 2 0 4 】

## 5 . 2 ウサギ血清の分析

ウサギの凝固血液を遠心分離することによって、血清を調製した。硫酸アンモニウム沈殿、及びセファデックス G 2 5 カラムを通して脱塩することによって、タンパク質画分を得た。

## 【 0 2 0 5 】

標準的な E L I S A 法によって、ウサギ血清からの個々のタンパク質画分を、抗ダビガトランカ価についてスクリーニングした。

30

## 【 0 2 0 6 】

スクリーニング - E L I S A

【表 8】

工程	手順	
A	各採血からのタンパク質画分を、緩衝液 1 中、周囲温度でマイクロタイタープレート上に一晩吸着させた(100 $\mu$ L/ウェル; 1, 2 又は 4 $\mu$ g/mL). マイクロプレートをそれぞれ 450 $\mu$ L で 4 回洗浄する 250 $\mu$ L の緩衝液 3 で少なくとも 1 時間ブロッキングする	
B	マイクロプレートをそれぞれ 450 $\mu$ L で 4 回洗浄する	10
C	マイクロタイタープレートの各ウェルに 3 重で添加する: + 50 $\mu$ L の緩衝液 2 + 較正用標準を緩衝液 2 に溶解させたもの 50 $\mu$ L + 25 $\mu$ L のダビガトラン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲート GL 261 (トレーサー) (1/40000)	
D	粘着ホイルでマイクロプレートを密封し、すべてのマイクロプレートについてサンプルの配分を完了する 周囲温度、振盪機上で 4 時間インキュベーションする	20
E	マイクロプレートをそれぞれ 450 $\mu$ L で 4 回洗浄する	
F	マイクロタイタープレートの各ウェルに、100 $\mu$ L の 2.7 mg/mL o-フェニレンジアミン HCl(1 個の 30 mg 錠を 11 mL の緩衝液 4 に溶解させたもの)を添加する 周囲温度、暗中で 30 分間インキュベーションする	
G	マイクロタイタープレートの各ウェルに 100 $\mu$ L の H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2.25 M)を添加する 5 分間振盪する	30
H	吸光度を読み取る; 試験波長: 490 nm, 対照波長: 650 nm	

【 0 2 0 7 】

5 . 3 ウサギ血清中の抗ダビガトラン抗体の検出

最後の 3 個の欄 : 値はダビガトランに関するものである。

【 0 2 0 8 】

【表 9】

採血 2

ウサギ	免疫原	コーティング 濃度 [μg/ml]	濃度 [Mol]	[Ext]	[%]
1 #50	GL256	2	0	1.812	100%
			2.E-12	1.574	87%
			2.E-11	0.461	25%
			2.E-10	0.059	3%
2 #51	GL256	1	0	2.193	100%
			2.E-12	2.086	95%
			2.E-11	1.515	69%
			2.E-10	0.207	9%
3 #52	GL256	2	0	1.513	100%
			2.E-12	1.419	94%
			2.E-11	0.728	48%
			2.E-10	0.107	7%
4 #53	GL256	2	0	1.474	100%
			2.E-12	1.388	94%
			2.E-11	0.848	58%
			2.E-10	0.142	10%
5 #54	GL258	1	0	2.114	100%
			2.E-12	1.892	89%
			2.E-11	0.646	31%
			2.E-10	0.159	8%
6 #55	GL258	1	0	1.295	100%
			2.E-12	0.937	72%
			2.E-11	0.265	20%
			2.E-10	0.140	11%
7 #56	GL258	2	0	1.611	100%
			2.E-12	1.372	85%
			2.E-11	0.424	26%
			2.E-10	0.145	9%
8 #46	GL258	1	0	1.640	100%
			2.E-12	1.290	79%
			2.E-11	0.425	26%
			2.E-10	0.196	12%
9 #47	GL262	2	0	1.854	100%
			2.E-12	1.534	83%
			2.E-11	0.530	29%
			2.E-10	0.254	14%
10 #48	GL262	2	0	1.458	100%
			2.E-12	1.142	78%
			2.E-11	0.300	21%
			2.E-10	0.131	9%
11 #49	GL262	4	0	1.646	100%
			2.E-12	1.393	85%
			2.E-11	0.460	28%
			2.E-10	0.257	16%
12 #50	GL262	2	0	1.605	100%
			2.E-12	1.400	87%
			2.E-11	0.389	24%
			2.E-10	0.109	7%

10

20

30

40

## 最後の採血

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

10

20

30

40

## 【0209】

採血2からの全ウサギのタンパク質画分をスクリーニングした後、好ましいハプテン（ハプテン2）を用いて抗ダビガトラン抗体の力価が最も高いのは、ウサギ番号5（#54）であることが明らかになった。さらに、低濃度の分析物（ダビガトラン）だけを用いて、抗体結合部位からトレーサーを置換することが可能であった。

## 【0210】

50

最後の採血3のスクリーニングについては、使用した免疫原に関する情報が欠落しているため、低濃度の分析物（ダビガトラン）を用いた抗体結合部位からのトレーサーの置換を主な決定基準として使用した。従って、ウサギ番号2、3及び5をさらなる精製に使用した。

【0211】

#### 5.4 ポリクローナル抗体の精製

ウサギ番号5（#54）、採血番号2及びウサギ番号2、3及び5、採血番号3（最後の採血）の抗血清を硫酸アンモニウムで沈殿させた。沈殿物を4500U/分、10で30分間遠心分離し、溶液から分離し、トリス緩衝液中に再溶解させた。この手順を繰り返した。プロテインAセファロースFFのアフィニティークロマトグラフィーによって、さらなる精製を行った。カラム緩衝液は0.01Mトリス（pH=7.5）であり、0.1Mグリシン（pH=3.0）を溶離に使用した。ウサギIgGを含有する画分を合わせた。タンパク質濃度は、280nmでのUV分光法によって測定した。

10

【0212】

抗体の規格の概要：

【表 10】

免疫原:	ハプテン 2-BSA (ロット番号 GL258)
ウサギ:	番号 5 (#54) 血清 (採血番号 2)
タンパク質含量:	1.85 mg/mL
保存:	約-20°C

免疫原:	ハプテン 1-BSA (GL256) 又は ハプテン 2-BSA (ロット番号 GL258) 又は ハプテン 2-BSA (ロット番号 GL262)	10
ウサギ:	採取した番号 2 血清 (最後の採血)	
タンパク質含量:	3.9 mg/mL	
保存:	約-20°C	

免疫原:	ハプテン 1-BSA (GL256) 又は ハプテン 2-BSA (ロット番号 GL258) 又は ハプテン 2-BSA (ロット番号 GL262)	20
ウサギ:	番号 3 血清 (最後の採血)	
タンパク質含量:	9.96 mg/mL	
保存:	約-20°C	

免疫原:	ハプテン 1-BSA (GL256) 又は ハプテン 2-BSA (ロット番号 GL258) 又は ハプテン 2-BSA (ロット番号 GL262)	30
ウサギ:	番号 5 血清 (最後の採血)	
タンパク質含量:	5.72 mg/mL	
保存:	約-20°C	

## 【0213】

## I I . ダビガトランの中和

2 系列の実験を行って、ダビガトラン抗凝固活性に対する抗体の作用を *in vitro* で示した。4 種のポリクローナル抗体を実験室で受け取り、ヒト血漿でさらに試験した。これを機能的アッセイ (トロンビン凝固時間) で試験した。

## 【0214】

## アッセイの説明:

簡潔に言えば、ヒト血漿は、全血を 3 . 1 3 % クエン酸ナトリウムに入れることによって得る。次に、これを遠心分離して無血小板血漿を得て、別個のチューブに移し、アッセイの日に必要とされるまで凍結する。アッセイの日に血漿を 3 7 で解凍する。

## 【0215】

トロンビン凝固時間は以下のように行う。まず、付属の緩衝液 (Dade Behring Test kit) 中で、製造業者の指定通りにトロンビンを希釈し (3 IU/mL トロンビン)、3 7 に

10

20

30

40

50

予熱する。調製してから2時間以内に、それを使用する。すべてのアッセイを市販のCL4凝固測定機 (Behnk Electronics, Norderstadt, Germany) で行った。磁気スターラーを備える付属のキュベットに50 µLの血漿をピペットで入れ、CL4機器において、37 に予熱したウェルの中で2分間攪拌する。この時点で、100 µLのトロンピン溶液を添加し、血漿サンプルが凝固するのに必要な時間をCL4によって自動的に記録する。付属のキュベットに入れた血漿中でダビガトランを5分間プレインキュベーションしてからトロンピンを添加し、測定を開始する。抗体も試験する場合 (最大50 µLの原液)、37 でさらに5分間インキュベーションしてから凝固を開始する (すなわち、ダビガトランと一緒に合計10分間インキュベーションし、抗体と一緒に合計5分間インキュベーションし、次にトロンピンで凝固を開始させる)。

10

#### 【0216】

最初に、ヒト血漿に漸増濃度のダビガトランを添加し、トロンピンを添加してから凝固までの時間を測定することによって、ダビガトランの標準曲線を作成した (図1)。トロンピン凝固時間は、ダビガトラン濃度の増加とともに濃度依存的に増加した。

#### 【0217】

最初のセットの中和実験については、中和のために、臨床的に関連する濃度である200 nMのダビガトランをすべての血漿サンプルに添加した。4個の抗体調製物はすべて、ダビガトランを含有する血漿での凝固時間を短縮することができた (図2)。中和度は、各抗体調製物中のタンパク質濃度に相関していた。次に、最高濃度の抗体溶液 (D) を系列希釈し、別々の実験セットにおいて、200 nMのダビガトランの抗凝固活性を中和する能力について試験した。ダビガトラン誘導性の抗凝固活性は、抗体濃度の増加とともに濃度依存的に阻害されたことが、図3で分かる。加えて、ダビガトランを含有する血漿に非特異的ウサギポリクローナル抗体 (青色四角) を添加したところ、抗凝固活性を中和する能力はなかった。濃度依存性及び非特異的抗体の中和欠如は、抗体による抗血液凝固のリバー스가ダビガトランに特異的であることを示している。

20

#### 【0218】

しかしながら、これらの濃度のダビガトランは臨床的に意義があるものであり、出血又は過剰投与は、おそらくより高濃度で起こるであろう。従って、抗体が、図1の標準曲線における最高濃度のダビガトラン (500 nM) の抗凝固活性を阻害する能力も試験した。図4は、抗体Dが高濃度のダビガトランも阻害することができたことを示す。

30

#### 【0219】

III. モノクローナル抗ダビガトラン抗体の製造及び特性決定

##### 1. モノクローナル抗ダビガトラン抗体及びFabの製造

ヘモシアニンなどの担体タンパク質にコンジュゲーションしたハプテン1 (実施例1.1を参照されたい) でマウスを免疫処置し、標準的な手順により免疫グロブリン及びハイブリドーマを作成した。培養上清から精製したモノクローナル抗体は、ダビガトラン-タンパク質コンジュゲートに結合し、この結合は溶液中のダビガトランで競合することができ、半最大阻害濃度は1 ~ 10 nMの範囲であった。モノクローナル抗体をパインで切断し、続いてプロテインAによりFcドメインを除去することによって、Fabを作成した。

40

#### 【0220】

マウス抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をクローニングし、標準方法を用いて配列決定した。抗体の質量分析及びN-末端配列決定によるタンパク質分析によって、配列を確認した。特異的マウス可変領域及びヒトIgG定常領域を含むキメラ抗体をコードするDNA構築物を作成し、HEK293T細胞でタンパク質を発現させ、精製した。

#### 【0221】

潜在的な免疫原性を減少させるために、マウスモノクローナル抗体クローン35E6及び27A9の配列を上記標準方法によってヒト化した。ヒト化Fabは、哺乳類細胞 (例えば、HEK293; CHO細胞) で一過的にトランスフェクションすることによって製造し、ベンズアミジンセファロースを用いてアフィニティークロマトグラフィーをした後

50

にサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。

【0222】

2. モノクローナル抗ダビガトラン抗体及びFabの特性決定

9種のモノクローナル抗体クローンDBG22(クローン22)、35E6、45B9、48E1、49F8、6A7F1、2F1E5、3B4E7、1F6G8、2D2E3及び27A9の可変ドメイン配列を表1に示す。配列番号67、68、69、92、93、94、99、100及び101は、最適化及び/又はヒト化した配列を表す。Fab化合物VH5C/VK18は、重鎖としてHCVH5C(配列番号99)及び軽鎖としてLCVK18(配列番号100)を含む。Fab化合物VH5C/VK21は、重鎖としてHCVH5C(配列番号99)及び軽鎖としてLCVK21(配列番号101)を含む。従って、VH5C/VK18及びVH5C/VK21は両方とも、配列番号67のCDR1、配列番号68のCDR2及び配列番号9のCDR3を有する重鎖可変ドメインと、配列番号64のCDR1、配列番号65のCDR2及び配列番号69のCDR3を有する軽鎖可変ドメインとを含む。両Fabは、配列番号92(VH5C)の重鎖可変領域が共通している。VH5C/VK18は、配列番号93(VK18)の軽鎖可変領域を含み、VH5C/VK21は、配列番号94(VK21)の軽鎖可変領域を含む。

10

【0223】

表1において、「CDR」という文字は相補性決定領域を意味し、「VH」は重鎖可変領域を意味し、「VK」は軽鎖可変領域を意味し、「CL」は軽鎖定常領域を意味し、「CH」は重鎖定常領域を意味し、「LC」は抗体分子の軽鎖を意味し、「HC」は抗体分子の重鎖を意味する。例えば、「VHCDR1DBG22」は、クローンDBG22の重鎖可変ドメインの第1のCDR(CDR1)を意味し、「DBG22VH」は、クローンDBG22の重鎖可変領域を意味する。

20

【0224】

【表11】

表1

配列番号	略号	配列
1	VHCDR1 DBG22	GFSLTSYIVD
2	VHCDR2 DBG22	VIWAGGSTNYNSALRS
3	VHCDR3 DBG22	AAYSYNYDGFAY
4	VKCDR1	KSSQSLLYTNGKTYLY

30



	DBG22	
5	VKCDR2 DBG22	LVSKLDS
6	VKCDR3 DBG22	LQSTHFPHT
7	VHCDR1 35E6	GYTFTNYWMH
8	VHCDR2 35E6	ETNPRNGGTNYNEKFKR
9	VHCDR3 35E6	GTSGYDYFDY
10	VKCDR1 35E6	RSSQTIVHSNGNTYLE
11	VKCDR2 35E6	KVSNRFS
12	VKCDR3 35E6	FQASHFPYT
13	VHCDR1 45B9	GVSLFTYDVD
14	VHCDR2 45B9	VMWSSGGTTNYNSALKS
15	VHCDR3 45B9	DRWSPGGFAY
16	VKCDR1 45B9	QSSQSLLYTNGKTYLH
17	VKCDR2 45B9	LVSKLDS
18	VKCDR3 45B9	LQSTHFPHT
19	VHCDR1 48E1	GFSLTSYDVD
20	VHCDR2 48E1	VIWAGGSTNYNSALKS
21	VHCDR3 48E1	DRWSPGGFAY
22	VKCDR1 48E1	KSSQSLLYTNGKTYLI
23	VKCDR2 48E1	LVSKLDS
24	VKCDR3 48E1	LQTTHFPHT
25	VHCDR1 49F8	GFSLSTYGVD
26	VHCDR2 49F8	LIWAGGSTTYNSAFKS
27	VHCDR3 49F8	ERSGDSPFGY
28	VKCDR1 49F8	KSSQSLLYTNGKTYLN

10

20

30

40

29	VKCDR2 49F8	LVSKLDS
30	VKCDR3 49F8	LQNSHFPHT
31	VHCDR1 6A7F1	GFTFSTYGMS
32	VHCDR2 6A7F1	SVTRGGNTYYPSM
33	VHCDR3 6A7F1	DYSGWYFDV
34	VKCDR1 6A7F1	RSSQSIVHSNGDTFLE
35	VKCDR2 6A7F1	KVSNRFS
36	VKCDR3 6A7F1	FQGSRIPYT
37	VHCDR1 2F1E5	GFTLTNYGMN
38	VHCDR2 2F1E5	WINTYTGEPTYADDFKG
39	VHCDR3 2F1E5	SAGTDYFDY
40	VKCDR1 2F1E5	RASESVDSYGNSFMH
41	VKCDR2 2F1E5	LASNLES
42	VKCDR3 2F1E5	QQNNEPWT
43	VHCDR1 3B4E7	GYTFTYYTIH
44	VHCDR2 3B4E7	YINPASSYTNYIQKFKD
45	VHCDR3 3B4E7	GANWDYFDY
46	VKCDR1 3B4E7	RSSQNI IQSNGNTYLE
47	VKCDR2 3B4E7	KVSNRFS
48	VKCDR3 3B4E7	FQGSHPYT
49	VHCDR1 1F6G8	GYTFTSYTIH
50	VHCDR2 1F6G8	YINPSSGYTYIYIQNFKD
51	VHCDR3 1F6G8	GANWDYFDY
52	VKCDR1 1F6G8	RSSQNIVQTNGNTYLE
53	VKCDR2	KVSSRFS

10

20

30

40

	1F6G8	
54	VKCDR3 1F6G8	FQGSHPVFT
55	VHCDR1 2D2E3	GYTFTHSGMN
56	VHCDR2 2D2E3	WINTNTGEPTYAEEFNDR
57	VHCDR3 2D2E3	SWWTDYFDY
58	VKCDR1 2D2F8	RSSQSIVHSNGNTYLE
59	VKCDR2 2D2E3	KVSNRFS
60	VKCDR3 2D2E3	FQGSHPVFT
61	VHCDR1 27A9	GYTFTN CYMH
62	VHCDR2 27A9	ETNPRNGGTNYNEKFKR
63	VHCDR3 27A9	GTSGYEYFDY
64	VKCDR1 27A9	RSSQSIVHSDGNIYLE
65	VKCDR2 27A9	KVSYRFS
66	VKCDR3 27A9	FQGSHPVFT
67	VHCDR1 5C	GYTFTDYYMH
68	VHCDR2 5C	ETNPRNGGTTYNEKFKG
69	VKCDR3 18	FQASHVFT
70	DBG22VH	QVQLEQSGPG LVAPSQRSLI TCTVSGFSLT SYIVDWVRQS PGKLEWLGV IWAGGSTNYN SALRSRLSIT KSNSKSQVFL QMNSLQTDDT AIYYCASAAY YSYNYDGFA YWGQTLVTV SA
71	DBG22VK	DVVMQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLI YTNGKTYLYW LLQRPGQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGI YYCLQSTHFP HTFGGGTKLE IK
72	35E6VH	QVQLQOPGAE LVKPGASVKL SCKTSGYTFT NYWMHWVRQR PGQGLEWIGE TNPRNGGTNY NEKFKRKATL TVDKSSNTAY MQLSSLTFGD SAVYYCTIGT SGYDYFDYWG QGTTLTVSS
73	35E6VK	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQTIV HSNNGTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRN SGVPDRFSGS GSGTGFTLKI SRVEAEDLGV YFCFQASHFP YTFGGGTKLE IK
74	45B9VH	QVQLKQSGPG LVAPSQSLI TCTVSGVSLF TYDWDWVRQS PGKDLEWLGV MWSGGTTNYN SALKSRLNIM KDSSKSQVFL KMSGLQTDGT GIYYCATDRW SPGGFAYWGQ GTLVTVSA
75	45B9VK	DVVMQTPLT LSVLIGQPAS ISQSSQSLI YTNGKTYLHW LLQRPGQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI

10

20

30

40

		SRVEAEDLGV YYCLQSTHFP HTFGGGTKLE IR	
76	48E1VH	QVQLKQSGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLT SYDVDWVRQS PGKGLEWLGW IWAGGSTNYN SALKSRLIIS KDNSKNQVFL RMNSLQTDDET AMYYCASDRW SPGGFAYWGW GTLVTVSA	
77	48E1VK	DVVMTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL YTNGKTYLIW LLQRPQSPK RLIHLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV FYCLQTTTHFP HTFGGGTKLE IR	
78	49F8VH	QVQLKQSGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLT TYGVDWVRQS PKKGLEWLGW IWAGGSTTYN SAFKSRLSIS KDNSKSQVFL KMNSLQTDDET AMYYCASERS GDSPFGYWGW GTLVTVSA	10
79	49F8VK	DVVMTQSPLI LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL YTNGKTYLNW LLQRPQSPK RLIHLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCLQNSHFP HTFGSGTKLE IK	
80	6A7F1VH	EVKLVESGGD LVRPGGSLKL SCAASGFTFS TYGMSWVRQS PEKRLEWVAS VTRGGNTYYP DSMRGRFTIS RDNVGNILYL HLRSLRSED AIYFCARDYS GWYFDVWGAG TTVTVSS	
81	6A7F1VK	DVLMTQIPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNGDTFLEW YLQKSGQSPK LLIYKVS NRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGS RIP YTFGGGTKLE IK	
82	3B4E7VH	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT YYTIHWVKQR PGQGLEWIGY INPASSYTN Y IQKFKDRATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVFYCARGA NWDYFDYWGW GTTLTVSS	20
83	3B4E7VK	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNI I QSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVS NRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGS HVP YTFGGGTNLE IK	
84	2F1E5VH	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKSSGFTLT NYGMNWKQV PGKGLRWMGW INTYTGEPY ADDFKGRFAF SLETSARTAY LQINNLKNE D AATYFCARSA GTDYFDYWGW GTTLTVSS	
85	2F1E5VK	NFVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD SYGNSFMHWC QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGS SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQONNEDPW TFGGGTKLEI K	30
86	1F6G8VH	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKSSGFTLT NYGMNWKQV PGKGLRWMGW INTYTGEPY ADDFKGRFAF SLETSARTAY LQINNLKNE D AATYFCARSA GTDYFDYWGW GTTLTVSS	
87	1F6G8VK	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNI V QTNGNTYLEW YLQKPGQSPN LLIYKVSSRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGS HVP FTFGGGTKLE IK	
88	2D2E3VH	QAQIHLVQSG PELKKPGETV KISCKASGYT FTHSGMNWMK QTPGKDLKWM GWINTNTGEP TYAEFEFNGRF AFSLEASANT AYLQINNLKN EDTATYFCAR SWWTDYFDYW GQGTTLTVSS	
89	2D2E3VK	DVLMTQTPLS LPVSLGDQTS ISCRSSQSIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVS NRF SGVPDRISGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGS HFP YTFGGGTKLE IT	40
90	27A9VH	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT NCMHWVKQR PGQGLEWIGE TNPRNGGTNY NEKFKRKATL TVNKYSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCTIGT SGYEYFDYWG QGTTLTVSS	

91	27A9VK	NILMTQTPLS YLQKPGQSPK SRVEAEDLGV	LPVSLGDQAS VLIYKVSYRF YFCFQGSHPV	ISCRSSQSIV SGVPDRFSGS YTFGGGTKLE	HSDGNIYLEW GSGTYFTLKI IK
92	VH5C	QVQLVQSGAE PGQGLEWMGE MELSSLRSED	VKKPGASVKV TNPRNGGTTY TAVYYCTIGT	SCKASGYTFT NEKFKGKATM SGYDYFDYWG	DYYMHWVRQA TRDTSTSTAY QGTLVTVSS
93	VK18	DIVMTQTPLS YLQKPGQSPK SRVEAEDVGV	LSVTPGQPAS LLIYKVSYRF YYCFQASHVP	ISCRSSQSIV SGVPDRFSGS YTFGQGTKLE	HSDGNIYLEW GSGTDFTLKI IK
94	VK21	DIVMTQTPLS YLQKPGQSPK SRVEAEDVGV	LSVTPGQPAS LLIYKVSYRF YYCFQASHVP	ISCRSSQSIV SGVPDRFSGS YTFGGGTKLE	HSDGNIYLEW GSGTGFTLKI IK
95	クローン22 カメラ HC	QVQLEQSGPG PGKGLEWLGV QMNSLQTDSD SAASTKGPSV VSWNSGALTS QTYICNVNHNK GGPSVFLFPP NWIYVDGVEVH GKEYKCKVSN EEMTKNQVSL PVLDSGDSFF YTQKSLSLSP	LVAPSQRLSI IWAGGSTNYN AIYYCASAAY FPLAPSSKST GVHTFPAVLQ PSNTKVDKRV KPKDTLMISR NAKTKPREEQ KALPAPIEKT TCLVKGFYPS LYSKLTVDKS GK	TCTVSGFSLT SALRSRLSIT YSYNYDGFA SGGTAALGCL SSGLYSLSSV EPKSCDKTHT TPEVTCVVVD YNSTYRVVSV ISKAKGQPRE DIAVEWESNG RWQQGNVFSC	SYIVDWVRQS KSNSKSQVFL YWGQGTLLTV VKDYFPEPVT VTVPSSSLGT CPPCPAPEAA VSHEDPEVKF LTVLHQDWLN PQVYTLPPSR QPENNYKTP SVMHEALHNN
96	クローン22 カメラ LC	DVVMTQTPLT LLQRPQSPK SRVEAEDVGI FIFPPSDEQL SGNSQESVTE VTHQGLSSPV	LSVTIGQPAS RLIYLVSKLD YYCLOSTHFP KSGTASVVCL QDSKDSTYSL TKSFNRGEC	ISCKSSQSLL SGVPDRFSGS HTFGGGTKLE LNNFYBREAK SSTLTLSKAD	YTNGKTYLYW GSGTDFTLKI IKRTVAAPSV VQWKVDNALQ YEKHKVYACE
97	hCL ドメイン	RTVAAPSVFI WKVDNALQSG KHKVYACEVT	FPPSDEQLKS NSQESVTEQD HQGLSSPVTK	GTASVVCLLN SKDSTYSLSS SFNRGEC	NFYBREAKVQ TLTLSKADYE
98	hCH ドメイン	ASTKGPSVFP WNSGALTSGV YICNVNHNKPS PSVFLFPPKP YVDGVEVHNA EYKCKVSNKA MTKNQVSLTC LDSGDSFFLY QKSLSLSPGK	LAPSSKSTSG HTFPAVLQSS NTKVDKRVPEP KDTLMISRTP KTKPREEQYN LPAPIEKTIS LVKGFYPSDI SKLTVDKSRW	GTAALGCLVK GLYSLSSVVT KSCDKTHTCP EVTCVVVDVS STYRVVSVLT KAKGQPREPQ AVEWESNGQP QQGNVFSCSV	DYFPEPVTVS VPSSSLGTQT PCPAPEAAGG HEDPEVKFNW VLHQDWLNGK VYTLPPSREE ENNYKTPPV MHEALHNHYT
99	HCVH5C	QVQLVQSGAE PGQGLEWMGE MELSSLRSED STKGPSVFPL	VKKPGASVKV TNPRNGGTTY TAVYYCTIGT APSSKSTSGG	SCKASGYTFT NEKFKGKATM SGYDYFDYWG TAALGCLVKD	DYYMHWVRQA TRDTSTSTAY QGTLVTVSSA YFPEPVTVSW

10

20

30

40

		NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SC
100	LCVK18	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSDGNIYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSYRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQASHVP YTFGQGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYBREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
101	LCVK21	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSDGNIYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSYRF SGVPDRFSGS GSGTGFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQASHVP YTFGGGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYBREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

10

20

30

40

## 【 0 2 2 5 】

実施例 I I に概説したトロンビン凝固時間アッセイにおいて、ヒト血漿中でのダビガトランの抗凝固活性を中和する能力について、マウスモノクローナル抗体クローン 2 2 を試験した。この抗体は、ヒト血漿中で、ダビガトランを介したトロンビン依存性凝固延長を用量依存的に完全にリバースした（図 5）。この抗体はまた、ヒト全血中で、ダビガトランの機能を効果的に阻害した。この抗体から作成した F a b は、ヒト血漿中でダビガトランの活性を遮断したが、このことは、一価の抗原結合ドメインが化合物の抗凝固活性を中和できることを示している（図 6）。

## 【 0 2 2 6 】

ヒトにおけるダビガトランの主な代謝経路は、カルボン酸部分のグルクロン酸抱合による。ダビガトランアシルグルクロニドは、薬理的に活性であることが示されている（Ebner et al., Drug Metab. Dispos. 2010, 38(9):1567-75）。マウスモノクローナル抗体クローン 2 2 がこれらの代謝物を中和できるかどうかを試験するために、ダビガトランで処置したアカゲザルの尿からダビガトランアシルグルクロニドを精製し、トロンビン凝固時間アッセイで評価した。抗体は、ヒト血漿中で、ダビガトランアシルグルクロニドを介したトロンビン依存性凝固延長を、ダビガトランで見られたのと類似の効力で用量依存的にリバースした（図 7）。従って、この抗体は、ヒトで見られるダビガトラン代謝物の抗凝固活性を遮断するのに有効である。

## 【 0 2 2 7 】

F a b と、クローン 2 2 の可変ドメインを含むマウス - ヒトキメラ抗体との親和性は、Kinexa 技術を用いて測定した。一定濃度の F a b 又はキメラ抗体を、様々な濃度のダビガトランと一緒に、平衡に到達するまでインキュベーションした。このインキュベーションの後に、ビオチン標識ダビガトランアナログとカップリングしたニュートラアビジンビーズ上に抗体を捕捉することによって、遊離抗体の濃度を測定した。捕捉した F a b を、F I T C でラベルした抗マウス I g G ( F a b 特異的 ) F ( a b ' ) 2 フラグメントを用いて検出した。捕捉したキメラ抗体を、C y 5 標識抗ヒト I g G を用いて検出した。解離定数は、1 : 1 結合モデルを用いて計算した。これらの実験の結果を以下の表に要約する。

## 【 0 2 2 8 】

抗ダビガトラン抗体の親和性

【表 1 2】

抗体	見掛けの $K_d$
クローン22 Fab	48 pM
クローン22 キメラAb	34 pM

## 【 0 2 2 9】

F a b 及びキメラ抗体は両方とも、高親和性でダビガトランに結合する。

## 【 0 2 3 0】

10

## トロンビン凝固時間アッセイ

簡潔に言えば、ヒト血漿は、全血を 3 . 1 3 % クエン酸ナトリウムに入れることによって得る。次に、これを遠心分離して無血小板血漿を得て、別個のチューブに移し、アッセイの日に必要とされるまで凍結する。アッセイの日に血漿を 3 7 で解凍する。

## 【 0 2 3 1】

トロンビン凝固時間は以下のように行う。まず、付属の緩衝液 (Dade Behring Test kit) 中で、製造業者の指定通りにトロンビンを希釈し ( 3 IU/mL トロンビン)、3 7 に予熱する。調製してから 2 時間以内に、それを使用する。すべてのアッセイを市販の C L 4 凝固測定機 (Behnk Electronics, Norderstadt, Germany) で行った。磁気スターラーを備える付属のキュベットに 5 0  $\mu$ L の血漿をピペットで入れ、C L 4 機器において、3 7 に予熱したウェルの中で 2 分間攪拌する。この時点で、1 0 0  $\mu$ L のトロンビン溶液を添加し、血漿サンプルが凝固するのに必要な時間を C L 4 によって自動的に記録する。付属のキュベットに入れた血漿中でダビガトランを 5 分間プレインキュベーションしてからトロンビンを添加し、測定を開始する。抗体も試験する場合 (最大 5 0  $\mu$ L の原液)、3 7 でさらに 5 分間インキュベーションしてから凝固を開始する (すなわち、ダビガトランと一緒に合計 1 0 分間インキュベーションし、抗体と一緒に合計 5 分間インキュベーションし、次にトロンビンで凝固を開始させる)。

20

## 【 0 2 3 2】

トロンビン時間アッセイにおけるキメラ抗体及びヒト化 F a b の活性は、それぞれ図 8 ~ 1 0 に示す。

30

## 【 0 2 3 3】

## 親和性測定 (Kinexa法)

F a b 及びマウス - ヒトキメラ抗体の親和性は、Kinexa (登録商標) 技術を用いて測定した。一定濃度の F a b 又はキメラ抗体を、様々な濃度のダビガトランと一緒に、平衡に到達するまでインキュベーションした。このインキュベーションの後に、ビオチン標識ダビガトランアナログとカップリングしたニュートラアビジンビーズ上に抗体を捕捉することによって、遊離抗体の濃度を測定した。捕捉した F a b を、F I T C でラベルした抗ヒト I g G ( F a b 特異的 ) F ( a b ' ) 2 フラグメントを用いて検出した。捕捉したキメラ抗体を、C y 5 標識抗ヒト I g G を用いて検出した。解離定数 (  $K_D$  ) は、1 : 1 結合モデルを用いて計算した。

40

## 【 0 2 3 4】

KinExA (登録商標) 機器を用いて速度定数 (  $k_{on}$  及び  $k_{off}$  ) を測定するために、Kinetics Direct法を使用した。この方法では、結合パートナーを溶液中で混合し、活性結合部位は複合体の形成により消耗されるので、遊離活性結合部位濃度を経時的に調べる。データ点を特定の時間間隔で収集し、シグナルを分析する。この方法では、 $k_{on}$  は直接測定し、o f f 速度  $k_{off}$  は  $k_{off} = K_D \times k_{on}$  として計算する。

## 【 0 2 3 5】

## 【表 1 3】

表: KinExA(登録商標) 技術を使用して測定したキメラ抗体の  $K_D$  値

キメラ Ab	$K_D$ (pM)
45B6	545
48E1	281
35E6	52
49F8	40
27A9	120

10

## 【 0 2 3 6】

## 【表 1 4】

表: ヒト化 Fab である VH5C/VK18 及び VH5C/VK21 の  $K_D$  値,  $k_{on}$  並びに  $k_{off}$ 

Fab	$K_D$	$k_{on}$	$k_{off}$ (予測値)
VH5C/VK18	133 pM	9.38e+005/Ms	1.25e-004 /s
VH5C/VK21	147 pM	1.377e+006/Ms	2.02e-004 /s

20

## 【 0 2 3 7】

F a b - ダビガトラン複合体の形成及び結晶化

F a b を 1 0 mg/ml に濃縮し、2 モルを超えるダビガトランと混合し、4 で 1 時間インキュベーションした。複合体及び結晶化溶液を 1 : 1 で混合した。複合体は、2 5 % P E G 1 5 0 0、0 . 1 M S P G 緩衝液 ( p H 7 ) 中で結晶化する。

## 【 0 2 3 8】

データ収集及び構造決定

すべての結晶のデータセットは、Paul Scherrer Institut の Swiss light Source beamline PXI - X06SA で収集した。すべてのデータセットは、autoPROC package (Vonnrhein, C ., Flensburg, C ., Keller, P ., Sharff, A ., Smart, O ., Paciorek, W ., Womack, T . & Bricogne, G. (2011). Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. Acta Cryst. D67, 293-302.) で処理した。

30

## 【 0 2 3 9】

F a b V H 5 C / V K 2 1 : ダビガトラン結晶は、空間群 P 2 1 2 1 2 1 で成長し、 $a = 5 9 . 9 7$ 、 $b = 7 8 . 3 9$ 、 $c = 8 7 , 6 7$  の単位格子寸法及び 2 . 2 の分解能回折を有していた。複合体の構造は、初期サーチモデルとして相同的な F a b 構造 ( P D B - I D 1 C 1 E ) を使用して、program phaser (Collaborative Computational Project, number 4. 1994. "The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography". Acta Cryst. D50, 760-763. Phaser crystallographic software. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. J. Appl. Cryst. (2007). 40, 658-674.) による分子置換によって解明した。電子密度図の分析により、ダビガトランの明確な電子密度が示された。完全な構造は、Coot によるモデル構築及び autoBUSTER による改良を複数ラウンド行うことにより改善した (Coot: model-building tools for molecular graphics" Emsley P, Cowtan K Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography 60: 2126-2132 Part 12 Sp. Iss. 1 DEC 2004. Bricogne G., Blanc E., Brandl M., Flensburg C., Keller P., Paciorek W., Roversi P, Sharff A., Smart O.S ., Vonnrhein C., Womack T.O. (2011). BUSTER version 2.11.2. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd)。

40

50



## 【0240】

F a b V H 5 C / V K 1 8 : ダビガトラン結晶は、それぞれ空間群 P 2 1 及び P 2 1 2 1 2 1 で成長した。空間群 P 2 1 の結晶は、 $a = 51.81$ 、 $b = 128.92$ 、 $c = 60.26$  の単位格子寸法及び  $1.9$  の分解能回折を示した。空間群 P 2 1 2 1 2 1 の結晶は、 $a = 48.20$ 、 $b = 59.74$ 、 $c = 127.69$  の単位格子寸法及び  $2.2$  の分解能回折を示した。両複合体の構造は、初期サーチモデルとして F a b V H 5 C / V K 2 1 の構造を使用して、program phaser による分子置換によって解明した。電子密度図の分析により、ダビガトランの明確な電子密度が示された。完全な構造は、Coot によるモデル構築及び autoBUSTER による改良を複数ラウンド行うことにより改善した。

10

## 【0241】

空間的凝集傾向 (S A P) の *in silico* 分析

各原子及び各残基の空間的凝集傾向 (S A P) は、残基の疎水性パラメーターを (2) から取り入れた以外は、(1) に記載したように計算した。F v S A P は、抗体の変ドメインにおける正電荷残基の全 S A P 値の合計として計算する。C D R S A P は、抗体の相補性決定領域における正電荷残基の全 S A P 値の合計として計算する。タンパク質データバンク (P D B) からの 850 個の異なる抗体構造について F v S A P 及び C D R S A P を計算して、両特性について平均 ( $\mu_{F v}$  及び  $\mu_{C D R}$ ) 及び標準偏差 ( $\sigma_{F v}$  及び  $\sigma_{C D R}$ ) の値を出した。

20

## 【0242】

次に、

Z - スコア (F v S A P) = (F v S A P -  $\mu_{F v}$ ) /  $\sigma_{F v}$  及び

Z - スコア (C D R S A P) = (C D R S A P -  $\mu_{C D R}$ ) /  $\sigma_{C D R}$

に従って、抗体の F v S A P 及び C D R S A P についての Z - スコアを計算した。

結果 (図 11) :

ヒト化 F a b 1 8 / 1 5 :

Z - スコア (F v S A P) = 1.06

Z - スコア (C D R S A P) = 1.00

ヒト化 F a b V H 5 C / V K 1 8 :

Z - スコア (F v S A P) = -0.61

Z - スコア (C D R S A P) = -0.84

ヒト化 F a b V H 5 C / V K 2 1 :

Z - スコア (F v S A P) = -0.61

Z - スコア (C D R S A P) = -0.78

30

## 【0243】

F a b 1 8 / 1 5 (国際公開公報第 2011089183 号を参照されたい) は、タンパク質データバンクにおける公知の抗体の平均よりも溶媒に曝露した疎水性表面が多い。

## 【0244】

驚くべきことに、V H 5 C / V K 1 8 (配列番号 99 / 配列番号 100) 及び V H 5 C / V K 2 1 (配列番号 99 / 配列番号 101 を含む) は両方とも、タンパク質データバンクにおける公知の抗体の平均よりも溶媒に曝露した疎水性表面が少ない (ネガティブな Z - スコア)。これは、これらの化合物が、水媒体中での増加した溶解性、及び低い凝集傾向を有することを意味しており、これによりこれらの化合物は、高い抗体濃度で薬物を安定的に製剤化するのにより適したものとなっている。

40

## 【0245】

(1) Chennamsetty et. al., Proc Natl Acad Sci; 2009, 106(29), pg 11937-11942

(2) Cowan and Whittaker, Pept Res; 1990, 3(2), pg 75-80

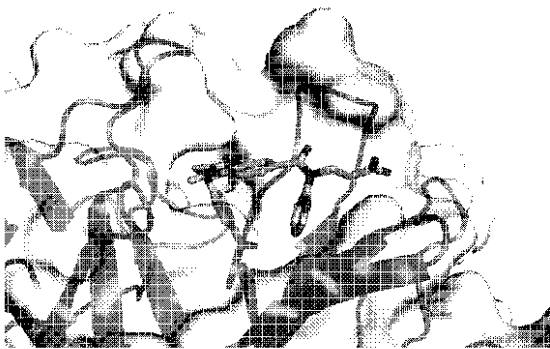
## 【0246】

C H O 細胞における F a b の発現

50

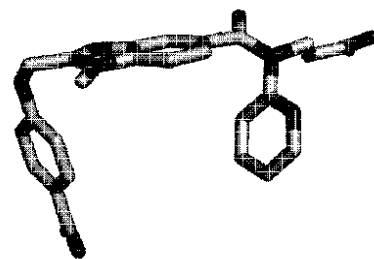
CHO DG44細胞に一過的にトランスフェクションすることによってFabを製造し、続いて、安定的な細胞プールを選択及び作成した。図13は、Fab 18/15（国際公開公報第2011089183号を参照されたい）、Fab VH5c/Vk18及びFab VH5c/Vk21を用いたフェドバッチランの力価を示す。驚くべきことに、Fabs VH5c/Vk18及びVH5c/Vk21は、Fab 18/15と比較して5～10倍高い力価を示している。

【図11A】



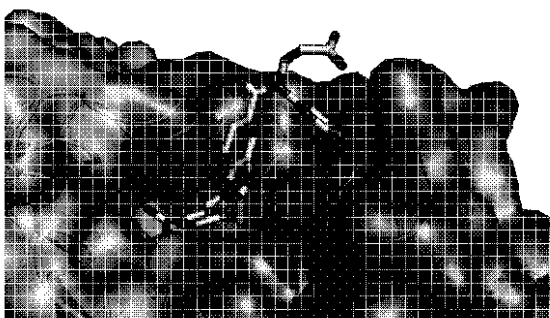
A

【図11C】



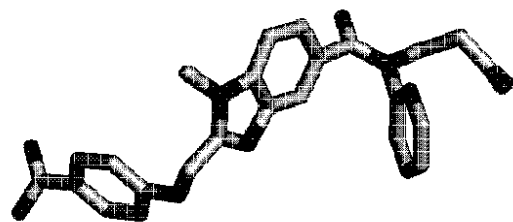
C

【図11B】



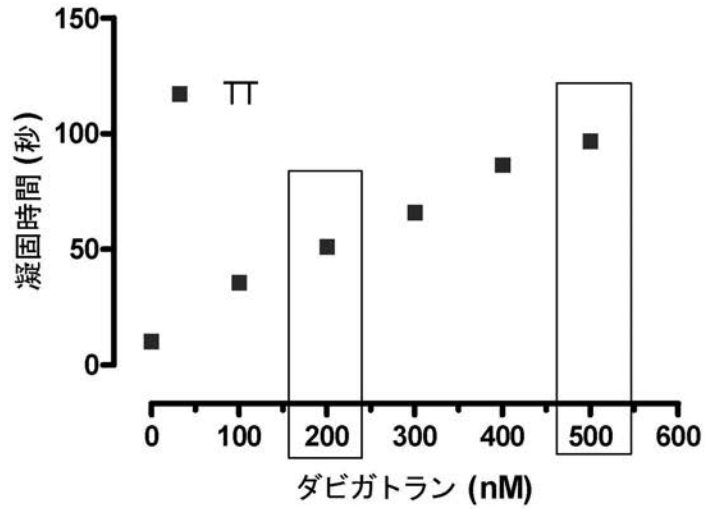
B

【図11D】

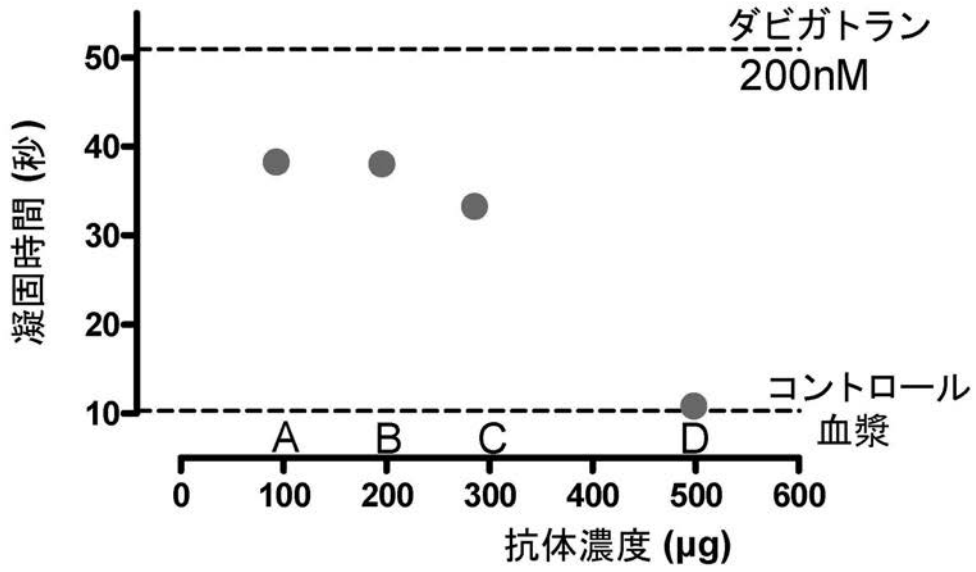


D

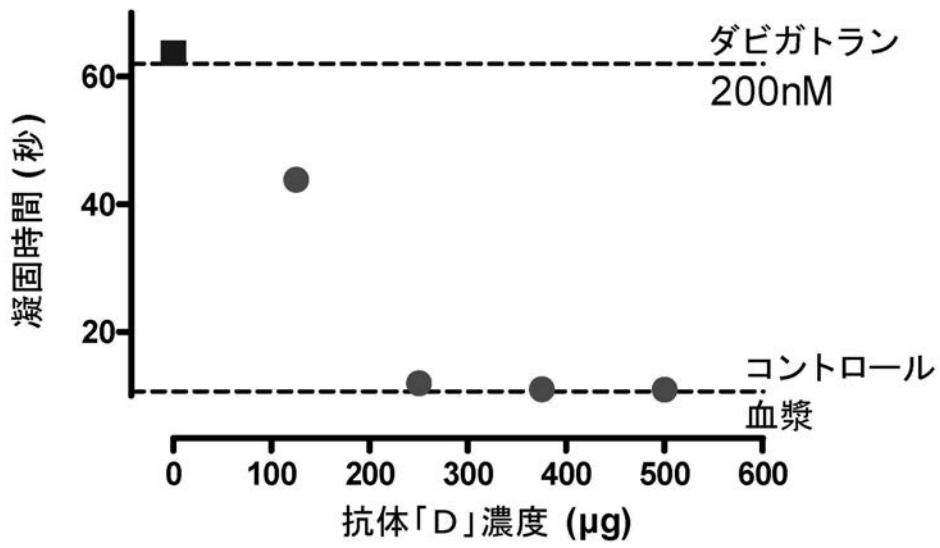
【 図 1 】



【 図 2 】

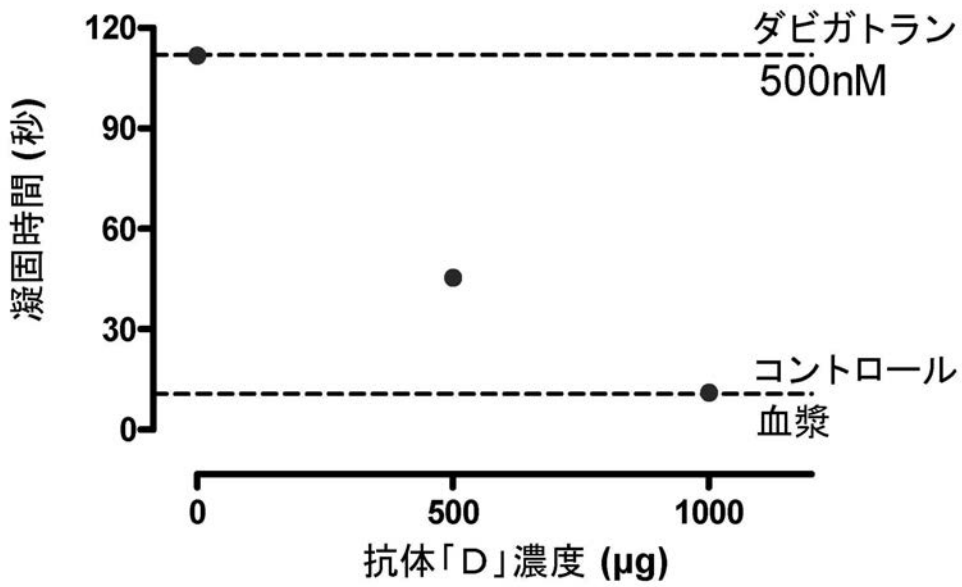


【 図 3 】

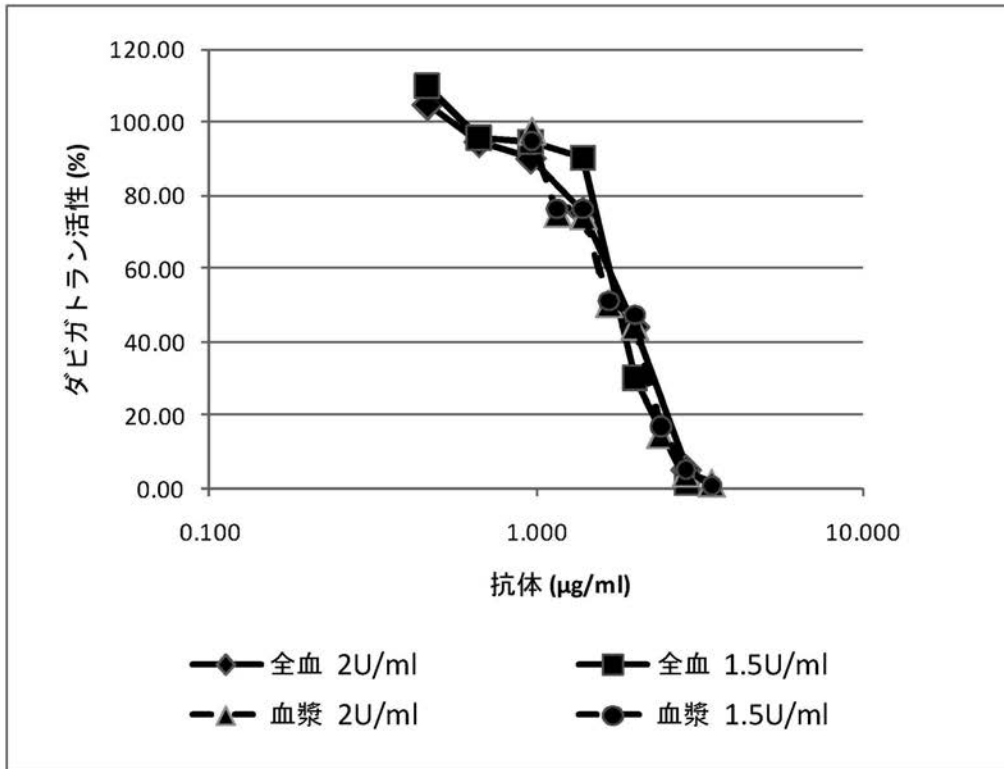


■ 非特異的ポリクローナル Ab (167μg) + 200 nM ダビガトラン

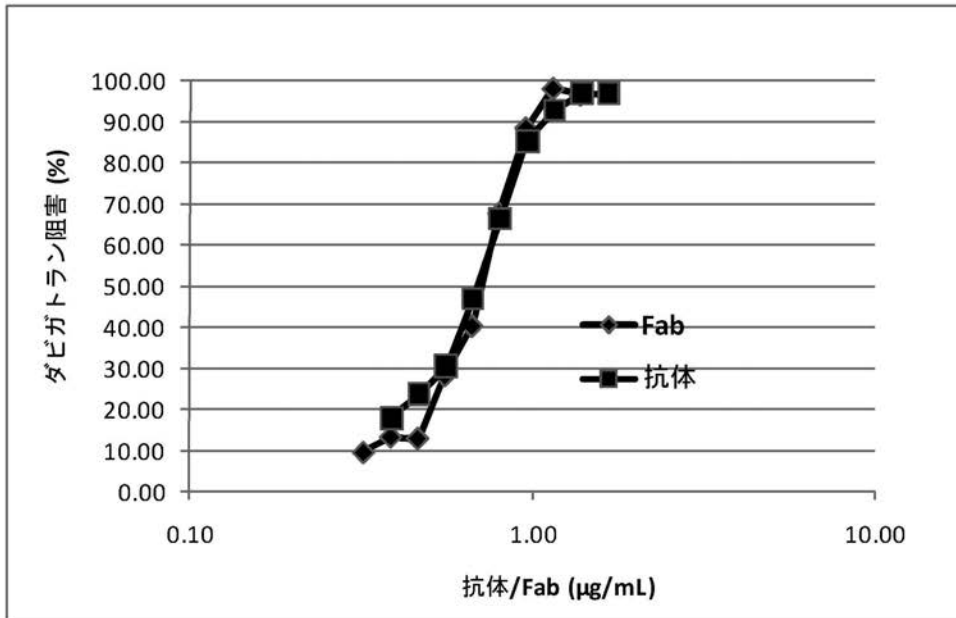
【 図 4 】



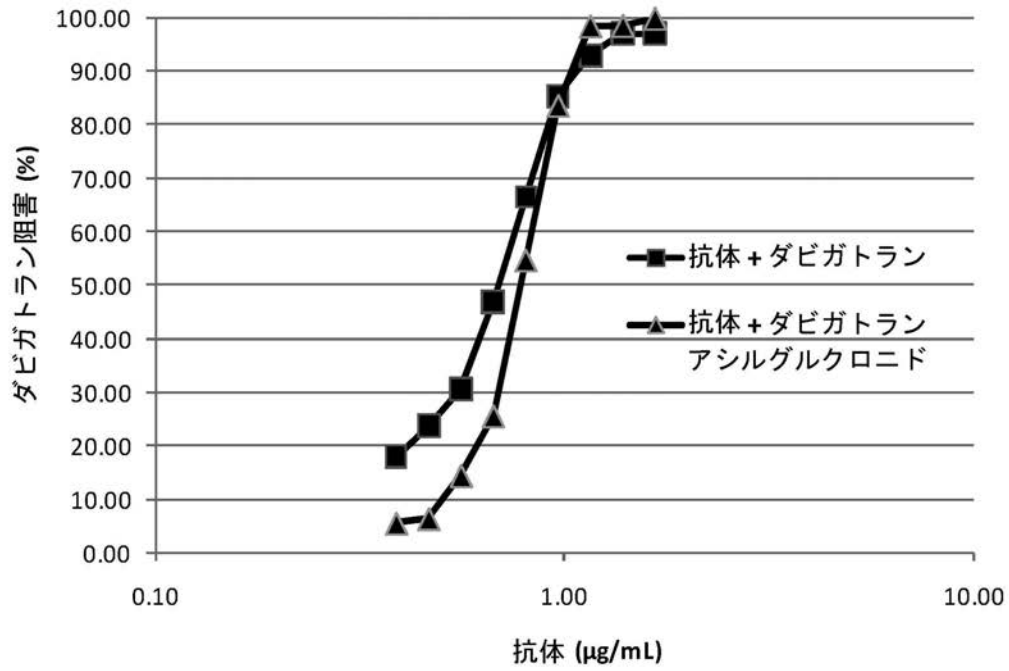
【 図 5 】



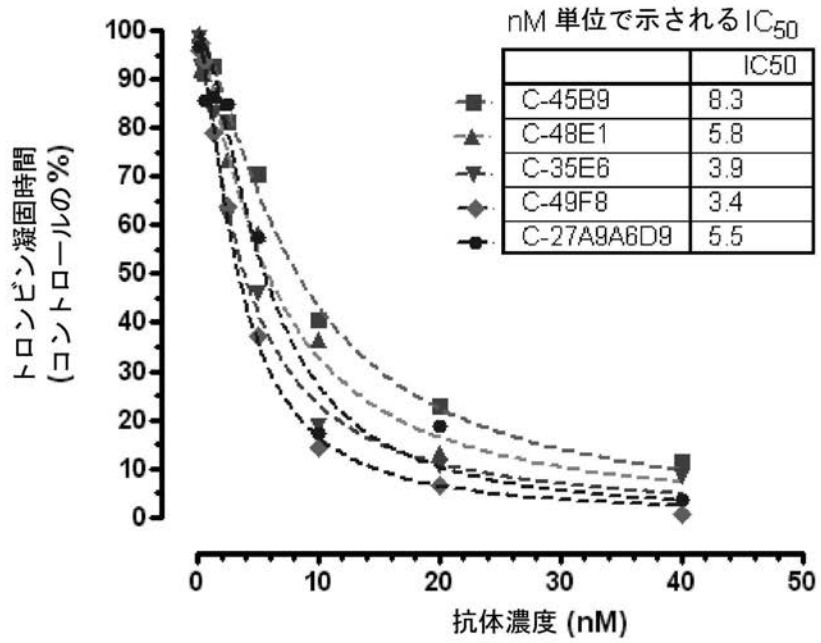
【 図 6 】



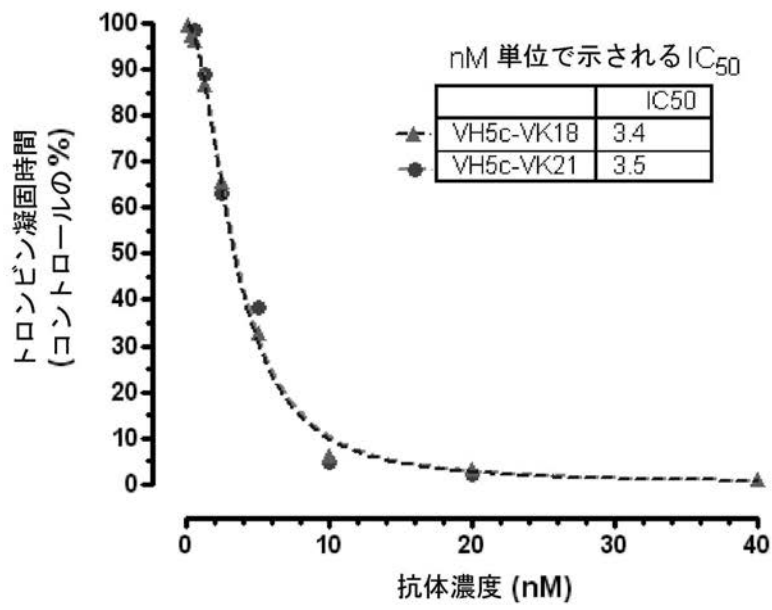
【 図 7 】



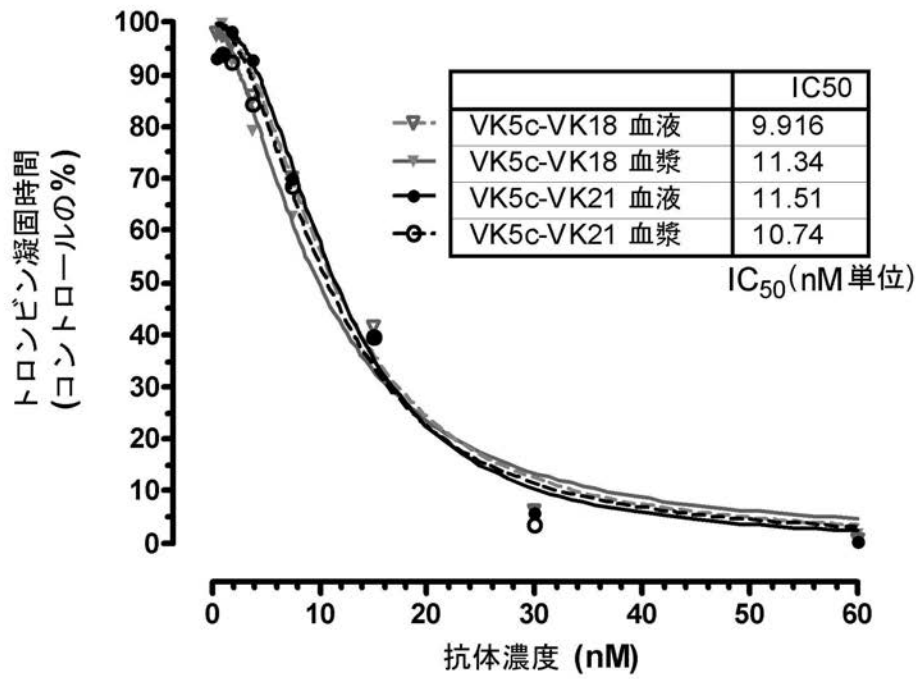
【 図 8 】



【 図 9 】

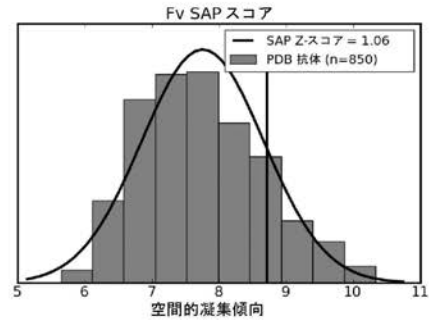
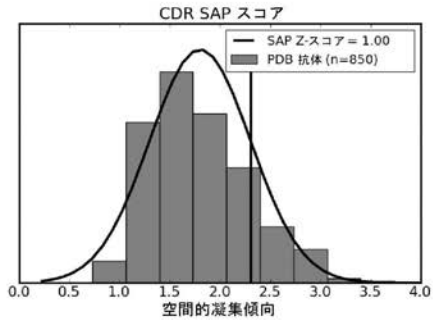


【 図 10 】

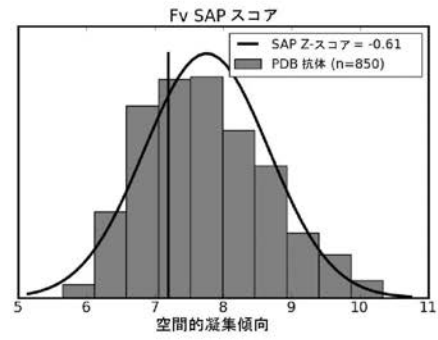
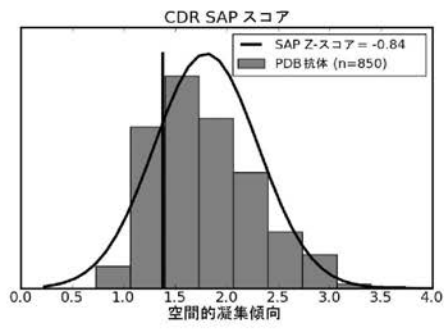


【 図 1 2 】

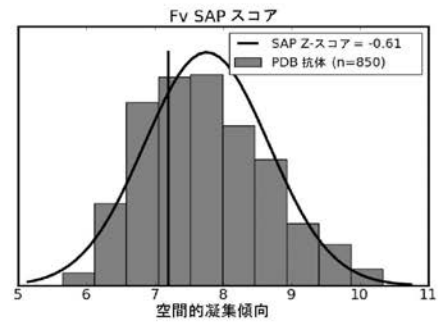
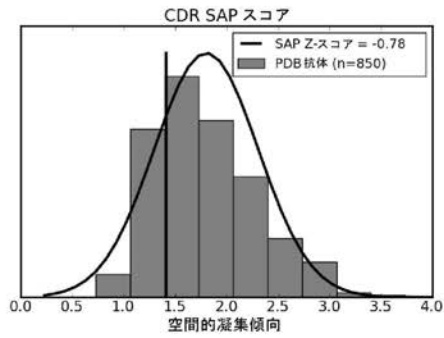
A) Fab 18/15



B) Fab VH5C/VK18

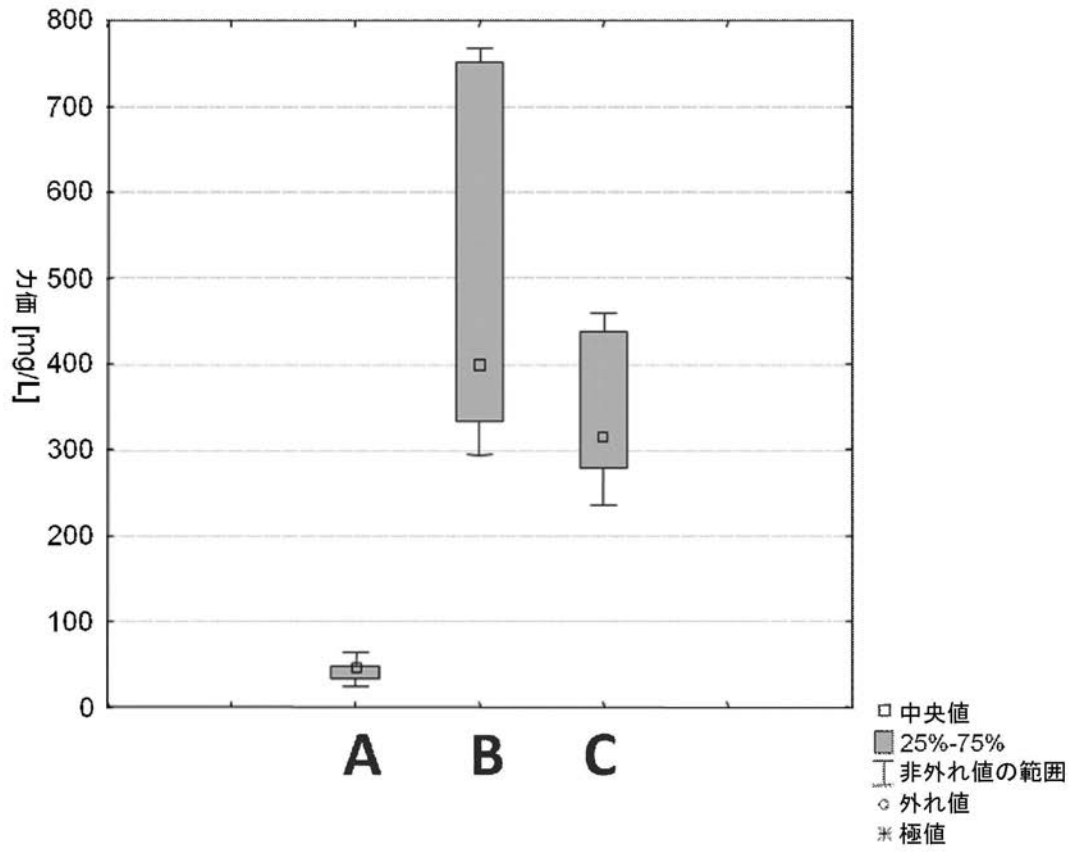


C) Fab VH5C/VK21





【 図 1 3 】



【 配列表 】

2014515740000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2012/055397

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61P39/02 C07K16/44 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61P C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/023653 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]; VAN RYN JOANNE [DE]; CLEMENS ANDREAS [D] 3 March 2011 (2011-03-03) claims 1-11; examples 1-4 -----	1-48
X	EISERT WOLFGANG G ET AL: "Dabigatran: An Oral Novel Potent Reversible Nonpeptide Inhibitor of Thrombin", ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY, vol. 30, no. 10, October 2010 (2010-10), pages 1885-1889, XP007920583, page 1888, right-hand column, paragraph 3 ----- -/--	1-48
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 7 May 2012		Date of mailing of the international search report 30/05/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cilensek, Zoran

1

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/055397
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VAN RYN: "Dabigatran etexilate - a novel, reversible, oral directlaction assays and reversal of anticoagulant activity (vol 103, pg 1109, 2010)", THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 105, no. 3, March 2011 (2011-03), page 570, XP007920584, ISSN: 0340-6245 page 1122, left-hand column, paragraph 1 -----	1-48
X,P	WO 2011/089183 A2 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]; VAN RYN JOANNE [DE]; PARK JOHN EDWARD []) 28 July 2011 (2011-07-28) figures 1-14 -----	1-48
X,P	JOANNE VAN RYN ET AL: "DABIGATRAN ANTICOAGULANT ACTIVITY IS NEUTRALIZED BY AN ANTIBODY SELECTIVE TO DABIGATRAN IN IN VITRO AND IN VIVO MODELS", JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 57, no. 14, 1 April 2011 (2011-04-01) , page E1130, XP55026090, ISSN: 0735-1097, DOI: 10.1016/S0735-1097(11)61130-3 the whole document -----	1-48
A	COLBURN W A: "Specific antibodies and Fab fragments to alter the pharmacokinetics and reverse the pharmacologic/toxicologic effects of drugs", DRUG METABOLISM REVIEWS, MARCEL DEKKER, NEW YORK, NY, US, vol. 11, no. 2, 1 January 1980 (1980-01-01), pages 223-262, XP002577103, ISSN: 0360-2532 page 37, paragraph 4 -----	1-48

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2012/055397

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

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/055397

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011023653 A1	03-03-2011	AR 077909 A1	28-09-2011
		CA 2767966 A1	03-03-2011
		TW 201124143 A	16-07-2011
		US 2011206656 A1	25-08-2011
		WO 2011023653 A1	03-03-2011
-----			
WO 2011089183 A2	28-07-2011	AR 079944 A1	29-02-2012
		US 2012027780 A1	02-02-2012
		UY 33196 A	31-08-2011
		WO 2011089183 A2	28-07-2011
-----			

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	M
	A 6 1 K 39/395	D
	A 6 1 P 7/04	
	C 1 2 N 15/00	A

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

(74) 代理人 100135873

弁理士 小澤 圭子

(74) 代理人 100116528

弁理士 三宅 俊男

(74) 代理人 100122736

弁理士 小國 泰弘

(74) 代理人 100122747

弁理士 田中 洋子

(74) 代理人 100132540

弁理士 生川 芳徳

(74) 代理人 100146031

弁理士 柴田 明夫

(74) 代理人 100147533

弁理士 岡崎 祐一

(72) 発明者 ヴァン・リン, ジョアン

ドイツ国、5 5 2 1 6 インゲルハイム・アム・ライン、ピンガー・シュトラッセ 1 7 3、ベー  
リンガー・インゲルハイム・ゲーエムベーハー、コーポレート・パテント

(72) 発明者 カナダ, キース

アメリカ合衆国、コネチカット 0 6 8 7 7、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 9 0 0  
、ベーリンガー・インゲルハイム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド

(72) 発明者 コーベンハイヴァー, ロバート

アメリカ合衆国、コネチカット 0 6 8 7 7、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 9 0 0  
、ベーリンガー・インゲルハイム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド

(72) 発明者 ハウエル, ノルベルト

ドイツ国、5 5 2 1 6 インゲルハイム・アム・ライン、ピンガー・シュトラッセ 1 7 3、ベー  
リンガー・インゲルハイム・ゲーエムベーハー、コーポレート・パテント

(72) 発明者 リッツェンブルガー, トビアス

ドイツ国、5 5 2 1 6 インゲルハイム・アム・ライン、ピンガー・シュトラッセ 1 7 3、ベー  
リンガー・インゲルハイム・ゲーエムベーハー、コーポレート・パテント

(72) 発明者 サルコ, クリストファー・ロナルド

アメリカ合衆国、コネチカット 0 6 8 7 7、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 9 0 0  
、ベーリンガー・インゲルハイム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド

(72) 発明者 シン, サンジャヤ

アメリカ合衆国、コネチカット 0 6 8 7 7、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 9 0 0

、ベーリンガー・インゲルハイム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド

(72)発明者 ウォーターマン, アリサ・ケイ

アメリカ合衆国、コネチカット 06877、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 900

、ベーリンガー・インゲルハイム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA53 CA05 CA07 DA02 DA03 EA04

4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01

4C085 AA13 AA14 AA16 AA38 BB11 BB41 BB43 CC02 CC13 CC22

CC23 DD32 DD33 DD38 DD62 EE01 FF03 FF20 GG02 GG03

GG04 GG05 GG06 GG08

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA24 FA74