

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6657098号
(P6657098)

(45) 発行日 令和2年3月4日(2020.3.4)

(24) 登録日 令和2年2月7日(2020.2.7)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A D
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
請求項の数 21 (全 57 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2016-549205 (P2016-549205)	(73) 特許権者	513168518 ダイアックス コーポレーション アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O 2 4 2 1, レキシントン, 3 0 0 シャイ アー ウェイ
(86) (22) 出願日	平成26年10月17日(2014.10.17)	(74) 代理人	100114775 弁理士 高岡 亮一
(65) 公表番号	特表2017-500584 (P2017-500584A)	(74) 代理人	100121511 弁理士 小田 直
(43) 公表日	平成29年1月5日(2017.1.5)	(74) 代理人	100202751 弁理士 岩堀 明代
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/061242	(74) 代理人	100191086 弁理士 高橋 香元
(87) 国際公開番号	W02015/061182		
(87) 国際公開日	平成27年4月30日(2015.4.30)		
審査請求日	平成29年10月16日(2017.10.16)		
(31) 優先権主張番号	61/893,542		
(32) 優先日	平成25年10月21日(2013.10.21)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患の診断と治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的試料を分析する方法であって、前記方法が、
自己免疫疾患を有することが疑われるヒト対象の生物学的試料における切断型高分子量
キニノーゲン (H M W K) のパーセントを測定することと、
前記生物学的試料における切断型 H M W K のパーセントを対照試料における切断型 H M
W K のパーセントと比較することと、
を含み、

前記自己免疫疾患が関節リウマチ、クローン病または潰瘍性大腸炎であり、

前記生物学的試料における切断型 H M W K のパーセントが前記対照試料における切断型
H M W K のパーセントよりも高い場合、前記ヒト対象は、前記自己免疫疾患を有している
かまたは前記自己免疫疾患の危険性があり、

前記生物学的試料が、血液試料、血清試料または血漿試料である、
方法。

【請求項 2】

前記生物学的試料が、1種以上のプロテアーゼ阻害剤を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

切断型 H M W K のパーセントが、切断型 H M W K に特異的な結合剤を含むアッセイによ
って測定される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記結合剤が抗体である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記アッセイが、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）もしくはイムノプロットアッセイである、請求項3または4に記載の方法。

【請求項6】

前記アッセイがウェスタンブロットアッセイである、請求項3～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

生物学的試料を分析する方法であって、前記方法が、

第一の時点において、自己免疫疾患を有することが疑われるヒト対象の第一の生物学的試料における切断型高分子量キニノーゲン（HMWK）のパーセントを測定することと、
前記第一の時点に続く第二の時点において、前記ヒト対象の第二の生物学的試料における切断型HMWKのパーセントを測定することと、

前記第一の生物学的試料における切断型HMWKのパーセントを前記第二の生物学的試料における切断型HMWKのパーセントと比較することと、
を含み、

前記自己免疫疾患が関節リウマチ、クローン病または潰瘍性大腸炎であり、

前記第二の生物学的試料における切断型HMWKのパーセントが前記第一の生物学的試料における切断型HMWKのパーセントよりも高い場合、前記対象は、前記自己免疫疾患を発症しているかまたは前記自己免疫疾患を発症する危険性があり、

前記生物学的試料が、血液試料、血清試料または血漿試料である、
方法。

【請求項8】

前記第一の生物学的試料、前記第二の生物学的試料またはその両方が、1種以上のプロテアーゼ阻害剤を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記第一の生物学的試料および前記第二の生物学的試料における切断型HMWKのパーセントが、切断型HMWKに特異的な結合剤を含むアッセイによって測定される、請求項7または8に記載の方法。

【請求項10】

前記結合剤が抗体である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記アッセイが、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）もしくはイムノプロットアッセイである、請求項9または10に記載の方法。

【請求項12】

前記アッセイがウェスタンブロットアッセイである、請求項9～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

生物学的試料を分析する方法であって、前記方法が、

治療の過程において自己免疫疾患の治療を施されるヒト患者の複数の生物学的試料における切断型高分子量キニノーゲン（HMWK）のパーセントを測定することと、

治療の過程にわたって切断型HMWKのパーセントを比較することと、
を含み、

前記自己免疫疾患が関節リウマチ、クローン病または潰瘍性大腸炎であり、

治療の過程において切断型HMWKのパーセントが減少する場合、前記治療は、前記患者において有効であり、

前記複数の生物学的試料のうちの少なくとも一つが、血液試料、血清試料または血漿試料である、
方法。

【請求項14】

10

20

30

40

50

前記治療が、少なくとも1種の血漿カリクレイン阻害剤を含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記複数の生物学的試料のうちの一つが、1種以上のプロテアーゼ阻害剤を含む、請求項13または14に記載の方法。

【請求項16】

前記複数の生物学的試料における切断型HMWKのパーセントが、切断型HMWKに特異的な結合剤を含むアッセイによって測定される、請求項13～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記結合剤が抗体である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記アッセイが、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)もしくはイムノブロットアッセイである、請求項16または17に記載の方法。

【請求項19】

前記アッセイがウェスタンブロットアッセイである、請求項16～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

ヒト対象における自己免疫疾患の治療における使用のための血漿カリクレイン(pKa1)阻害剤であって、

前記対象は、健康対照と比較して切断型高分子量キニノーゲン(HMWK)のパーセントが上昇しており、

前記自己免疫疾患は、関節リウマチ、クローン病、もしくは潰瘍性大腸炎である、血漿カリクレイン(pKa1)阻害剤。

【請求項21】

pKa1に特異的な抗体である、請求項20に記載のpKa1阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本願は、2013年10月21日に提出された米国仮特許出願第61/893,542号の出願日の優先権を主張するものであり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

血漿カリクレイン(pKa1)は、循環系における主要なブラジキニン産生酵素であり、かつ血漿カリクレイン-キニン系(KKS)の構成要素である(Colman, R.W. および Schmaier, A.H. (1997) Blood 90, 3819-3843)。pKa1の活性化は、接触系を介して起こり、このことは遺伝性血管浮腫(HAE)に関連する疾患病理の原因であることが実証されている(Zuraw, B.L. および Christiansen, S.C. (2008) Expert Opin Invest Drugs 17, 697-706)。ブラジキニンは、疼痛、炎症、浮腫および血管新生の重要な媒介因子である(Maurer, M.ら(2011) Allergy 66, 1397-1406; Colman, R.W. (2006) Curr Pharm Des 12, 2599-2607)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

要約

本開示は、切断型高分子量キニノーゲン(HMWK)の濃度が、関節リウマチ(RA)

10

20

30

40

50

、クローン病（ＣＤ）および潰瘍性大腸炎（ＵＣ）のような自己免疫疾患を有する患者で上昇するという知見に基づく。したがって、本明細書において、切断型ＨＭＷＫの濃度に基づく、ＲＡ、ＣＤもしくはＵＣのような自己免疫疾患の診断、自己免疫疾患の進行の監視、または自己免疫疾患の治療効果の判定のための方法が開示される。

【課題を解決するための手段】

【０００４】

一態様において、本開示は対象における自己免疫疾患（例えばＲＡ、ＣＤもしくはＵＣ）の診断方法を提供し、ここで方法は、（ｉ）自己免疫疾患を有することが疑われる対象の生物学的試料（例えば、血清試料もしくは血漿試料）を提供するステップ；（ｉｉ）該生物学的試料中の切断型高分子量キニノーゲン（ＨＭＷＫ）の濃度を測定するステップ；
10
ならびに（ｉｉｉ）該生物学的試料中の切断型ＨＭＷＫの濃度が対照の試料と比較して上昇している場合に、対象が自己免疫疾患を有しているかまたは自己免疫疾患の危険性があると識別するステップを含む。

【０００５】

ある実施態様において、切断型ＨＭＷＫの濃度は、切断型ＨＭＷＫに特異的である結合剤（例えば抗体）を含むアッセイによって測定される。アッセイは、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、もしくは、例えばＬｉＣｏｒ検出を含むウェスタンブロットアッセイのようなイムノブロットアッセイであり得る。

【０００６】

方法は、対象に自己免疫疾患の治療を施すことをさらに含み得る。ある実施態様において、対象は、例えば本明細書に記載されるもののような血漿カリクレイン（ｐＫａ１）阻
20
害剤の有効量を投与される。

【０００７】

別の態様において、本開示は、対象における自己免疫疾患（例えばＲＡ、ＣＤもしくはＵＣ）の進行を監視する方法を提供し、方法は、（ｉ）第一の時点において、自己免疫疾患を有していることが疑われる対象の第一の生物学的試料を提供するステップ；（ｉｉ）該第一の生物学的試料中の高分子量キニノーゲン（ＨＭＷＫ）の第一の濃度を測定するステップ；（ｉｉｉ）該第一の時点に続く第二の時点における該対象の第二の生物学的試料を提供するステップ；（ｉｖ）該第二の生物学的試料中の切断型ＨＭＷＫの第二の濃度を測定するステップ；
30
ならびに（ｖ）該第一のおよび第二の生物学的試料中の切断型ＨＭＷＫの濃度変化に基づいて対象中の自己免疫疾患の進行を判定するステップを含む。切断型ＨＭＷＫの第二の濃度が切断型ＨＭＷＫの第一の濃度よりも高い場合、自己免疫疾患が対象において進行していること、または対象が自己免疫疾患を発症したこともしくは自己免疫疾患を発症する危険性を持つことを示す。

【０００８】

ある実施態様において、第一の生物学的試料、第二の生物学的試料、もしくはその両方は、血清試料もしくは血漿試料である。他の実施態様において、切断型ＨＭＷＫの第一のもしくは第二の濃度は、切断型ＨＭＷＫに特異的な結合剤（例えば抗体）を含むアッセイによって測定される。ある例において、アッセイは、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳ
40
Ａ）、もしくは、例えばＬｉＣｏｒ検出を含むウェスタンブロットアッセイのようなイムノブロットアッセイであってよい。

【０００９】

方法は、対象に自己免疫疾患の治療を施すことをさらに含み得る。ある実施態様において、対象は、本明細書に記載されるもののような血漿カリクレイン（ｐＫａ１）阻
害剤の有効量を投与される。

【００１０】

さらに、本開示は、患者における自己免疫疾患（例えばＲＡ、ＣＤもしくはＵＣ）の治療効果を判定する方法を提供し、方法は、（ｉ）治療の過程において自己免疫疾患の治療を施される患者の複数の生物学的試料（例えば、血清試料もしくは血漿試料）を提供する
50
ステップ；（ｉｉ）該複数の生物学的試料中の高分子量キニノーゲン（ＨＭＷＫ）の濃度

を測定するステップ；ならびに (i i i) 治療の過程における切断型 H M W K の濃度の変化に基づいて、患者における治療効果を判定するステップを含む。治療の過程において、切断型 H M W K の濃度が減少する場合、患者において治療が有効であることを示す。

【 0 0 1 1 】

ある実施態様において、治療は例えば本明細書に記載されるもののような血漿カリクレイン阻害剤の少なくとも一つを含む。他の実施態様において、複数の生物学的試料中の切断型 H M W K の濃度は、切断型 H M W K に特異的な結合剤（例えば抗体）を含むアッセイによって測定される。ある例において、アッセイは、酵素結合免疫吸着測定法（ E L I S A ）、もしくは、例えば L i C o r 検出を含むウェスタンブロットアッセイのようなイムノブロットアッセイである。本明細書に記載される任意の方法において、そこで使用される生物学的試料は、採取の後に生物学的試料に添加されるプロテアーゼ阻害剤もしくはプロテアーゼ阻害剤カクテルを含み得る。

10

【 0 0 1 2 】

該方法において有用なカリクレイン阻害剤は、例えば血漿カリクレイン（ p K a l ）阻害剤であり得る。ある実施態様において、阻害剤は血漿カリクレイン阻害剤である。

【 0 0 1 3 】

該方法において有用なカリクレイン阻害剤は、当技術分野に公知であるかもしくは本明細書に記載される K u n i t z ドメインポリペプチド、そのような任意の K u n i t z ドメインを含むより大きなポリペプチド（カリクレイン阻害剤ポリペプチドが、標準的なアッセイでの測定により、カリクレインに結合し、かつカリクレインを阻害することを条件として）、カリクレイン結合タンパク質（例えば、例えば抗血漿カリクレイン抗体のような抗体）、または本明細書に記載される他のカリクレイン阻害剤のいずれかであり得る。

20

【 0 0 1 4 】

p K a l 活性を阻害できる例示的な K u n i t z ドメインペプチドは： G l u A l a
M e t H i s S e r P h e C y s A l a P h e L y s A l a A s p
A s p G l y P r o C y s A r g A l a A l a H i s P r o A r g
T r p P h e P h e A s n I l e P h e T h r A r g G l n C y s
G l u G l u P h e I l e T y r G l y G l y C y s G l u G l y
A s n G l n A s n A r g P h e G l u S e r L e u G l u G l u
C y s L y s L y s M e t C y s T h r A r g A s p（配列識別番号 2
； S X - 8 8 ）、もしくは配列識別番号 2 のアミノ酸 3 ~ 6 0 のようなそれらの断片を含む。

30

【 0 0 1 5 】

ある実施態様において、カリクレイン阻害剤は、 K u n i t z ドメインのフレームワーク領域ならびに D X - 8 8 ポリペプチドの第一のおよび第二の結合ループ領域を含むかまたはそれらからなる。

【 0 0 1 6 】

ある実施態様において、カリクレイン阻害剤は、配列識別番号 2 のアミノ酸 3 ~ 6 0 の約 5 8 アミノ酸配列もしくは配列識別番号 2 の 6 0 アミノ酸配列を持つ D X - 8 8 ポリペプチドを含むかまたはそれらからなる。

40

【 0 0 1 7 】

ある実施態様において、カリクレイン阻害剤は、血漿カリクレイン結合タンパク質（例えば、例えば本明細書に記載される抗血漿カリクレイン抗体のような抗体）を含む。

【 0 0 1 8 】

ある実施態様において、結合タンパク質（例えば、例えばヒト抗体のような抗体）は、本明細書に記載されるタンパク質と同じエピトープに結合するか、もしくは本明細書に記載されるタンパク質と結合に関して競合する。

【 0 0 1 9 】

ある実施態様において、本明細書に記載されるタンパク質は、 M 1 6 2 - A 0 4、 M 1 6 0 - G 1 2、 M 1 4 2 - H 0 8、 X 6 3 - G 0 6、 X 1 0 1 - A 0 1（本明細書におい

50

てDX-2922とも呼ばれる)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本明細書においてDX-2930とも呼ばれる)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09およびM35-G04からなる群より選択される。そのような結合タンパク質は、例えばPCT公開WO2012/094587および米国特許出願公開US2010183625に記載され、その両方とも参照によって本明細書にその全ての内容が組み込まれる。

【0020】

ある実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、X81-B01、X67-D03、X101-A01、M162-A04、X115-F02、X124-G01もしくはX63-G06と競合するか、またはそれらと同じエピトープを持つ。

10

【0021】

ある実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、プレカリクレイン(例えばヒトプレカリクレイン)には結合しないが、血漿カリクレイン(例えばヒト血漿カリクレイン)の活性型には結合する。

【0022】

ある実施態様において、該タンパク質は、血漿カリクレインもしくはその断片の触媒ドメインの活性部位もしくはその近傍に結合するか、または血漿カリクレインの活性部位と重なるエピトープに結合する。

20

【0023】

ある実施態様において、該タンパク質は、血漿カリクレインの触媒三残基:His434、Asp483および/もしくはSer578(番号はヒトの配列に基づく)を形成する一つもしくはそれ以上のアミノ酸に結合する。他の実施態様において、該タンパク質は、Ser479、Tyr563および/もしくはAsp58(番号はヒトの配列に基づく)の一つもしくはそれ以上のアミノ酸に結合する。さらに他の実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、Arg551、Gln553、Tyr555および/もしくはArg560(アミノ酸の位置の番号はヒトカリクレイン配列に基づく)の一つもしくはそれ以上のアミノ酸に結合する。さらに他の実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、Ser478、Asn481、Ser525および/もしくはLys526(アミノ酸の位置の番号はヒトカリクレイン配列に基づく)の一つもしくはそれ以上のアミノ酸に結合する。

30

【0024】

ある実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、第XIIa因子および/もしくはブラジキニンの産生を、例えば、タンパク質の非存在下での同じ条件下での標準的な、例えば第XIIa因子および/もしくはブラジキニンの産生と比較して、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%もしくは約95%よりも大きく減少させる。

【0025】

ある実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、1000nM、500nM、100nMもしくは10nM未満の見かけの阻害定数($K_{i,app}$)を持つ。

40

【0026】

ある実施態様において、HCおよびLC可変ドメイン配列は、同じポリペプチド鎖の構成要素である。

【0027】

他の実施態様において、HCおよびLC可変ドメイン配列は、異なるポリペプチド鎖の構成要素である。例えば、血漿カリクレイン結合タンパク質は、例えばIgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4のようなIgGである。血漿カリクレイン結合タンパク質は、可溶性Fab(sFab)であり得る。

50

【0028】

他の実施において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、Fab2'、scFv、ミニボディー(minibody)、scFv::Fc融合体、Fab::HSA融合体、HSA::Fab融合体、Fab::HSA::Fab融合体、もしくは本明細書における結合タンパク質の一つの抗原結合部位を含む他の分子を含む。これらのFabのVHおよびVL領域は、IgG、Fab、Fab2、Fab2'、scFv、ペグ化Fab、ペグ化scFv、ペグ化Fab2、VH::CH1::HSA+LC、HSA::VH::CH1+LC、LC::HSA+VH::CH1、HSA::LC+VH::CH1、もしくは他の適切な構造として提供され得る。

【0029】

一実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、ヒト抗体もしくはヒト化抗体であるか、またはヒトにおいて非免疫原性である。例えば、該タンパク質は、例えばすべてのヒトフレームワーク領域のようなヒト抗体フレームワーク領域の一つもしくはそれ以上を含む。

【0030】

一実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、ヒトFcドメイン、またはヒトFcドメインと少なくとも95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるFcドメインを含む。

【0031】

一実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、霊長類抗体もしくは霊長類化抗体であるか、またはヒトにおいて非免疫原性である。例えば、タンパク質は、例えばすべての霊長類フレームワーク領域のような霊長類抗体フレームワーク領域の一つもしくはそれ以上を含む。

【0032】

一実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、霊長類Fcドメイン、または霊長類Fcドメインと少なくとも95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるFcドメインを含む。「霊長類」は、ヒト(Homo sapiens)、チンパンジー(Pan troglodytesおよびPan paniscus(ボノボ))、ゴリラ(Gorilla gorilla)、テナガザル、サル、キツネザル、アイアイ(Daubentonia madagascariensis)ならびにメガネザルを含む。

【0033】

一実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、ヒトフレームワーク領域、またはヒトフレームワーク領域と少なくとも95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるフレームワーク領域を含む。

【0034】

ある実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、マウスもしくはウサギからの配列を一切含まない(例えばマウスもしくはウサギ抗体ではない)。

【0035】

ある実施態様において、結合タンパク質(例えば、ヒト抗体のような抗体)は、重鎖イムノグロブリン可変ドメイン配列および軽鎖イムノグロブリン可変ドメイン配列を含み、ここで重鎖イムノグロブリン可変ドメイン配列は、本明細書に記載されるタンパク質の重鎖可変ドメインからの1個、2個もしくは3個(例えば3個)のCDR領域を含み、ならびに/または、軽鎖イムノグロブリン可変ドメイン配列は、本明細書に記載されるタンパク質の軽鎖可変ドメインからの1個、2個もしくは3個(例えば3個)のCDR領域を含み、そしてここで、該タンパク質は血漿カリクレインと結合(例えば、結合して阻害)する。

【0036】

ある実施態様において、重鎖イムノグロブリン可変ドメイン配列は、M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本明細書

10

20

30

40

50

においてDX - 2922とも呼ばれる)、X81 - B01、X67 - D03、X67 - G04、X81 - B01、X67 - D03、X67 - G04、X115 - B07、X115 - D05、X115 - E09、X115 - H06、X115 - A03、X115 - D01、X115 - F02、X124 - G01(本明細書においてDX - 2930とも呼ばれる)、X115 - G04、M29 - D09、M145 - D11、M06 - D09およびM35 - G04の重鎖可変ドメインからの1個、2個もしくは3個(例えば3個)のCDR領域を含み、ならびに/または軽鎖イムノグロブリン可変ドメイン配列は、M162 - A04、M160 - G12、M142 - H08、X63 - G06、X101 - A01(本明細書においてDX - 2922とも呼ばれる)、X81 - B01、X67 - D03、X67 - G04、X81 - B01、X67 - D03、X67 - G04、X115 - B07、X115 - D05、X115 - E09、X115 - H06、X115 - A03、X115 - D01、X115 - F02、X124 - G01(本明細書においてDX - 2930とも呼ばれる)、X115 - G04、M29 - D09、M145 - D11、M06 - D09およびM35 - G04の軽鎖可変ドメインからの1個、2個もしくは3個(例えば3個)のCDR領域を含む(それぞれ)。

10

【0037】

ある実施態様において、重鎖可変ドメインからの1個、2個もしくは3個(例えば3個)のCDR領域は、X81 - B01由来であり、ならびに/または、軽鎖可変領域からの1個、2個もしくは3個(例えば3個)のCDR領域は、X81 - B01由来もしくはX67 - D03由来である。

20

【0038】

ある実施態様において、重鎖イムノグロブリン可変ドメイン配列は、本明細書に記載されるタンパク質の重鎖可変ドメインを含み、ならびに/または軽鎖イムノグロブリン可変ドメイン配列は、本明細書に記載されるタンパク質の軽鎖可変ドメインを含む。

【0039】

ある実施態様において、重鎖イムノグロブリン可変ドメイン配列は、M162 - A04、M160 - G12、M142 - H08、X63 - G06、X101 - A01(本明細書においてDX - 2922とも呼ばれる)、X81 - B01、X67 - D03、X67 - G04、X81 - B01、X67 - D03、X67 - G04、X115 - B07、X115 - D05、X115 - E09、X115 - H06、X115 - A03、X115 - D01、X115 - F02、X124 - G01(本明細書においてDX - 2930とも呼ばれる)、X115 - G04、M29 - D09、M145 - D11、M06 - D09およびM35 - G04の重鎖可変ドメインを含み、ならびに/または、軽鎖イムノグロブリン可変ドメイン配列は、M162 - A04、M160 - G12、M142 - H08、X63 - G06、X101 - A01(本明細書においてDX - 2922とも呼ばれる)、X81 - B01、X67 - D03、X67 - G04、X81 - B01、X67 - D03、X67 - G04、X115 - B07、X115 - D05、X115 - E09、X115 - H06、X115 - A03、X115 - D01、X115 - F02、X124 - G01(本明細書においてDX - 2930とも呼ばれる)、X115 - G04、M29 - D09、M145 - D11、M06 - D09およびM35 - G04の軽鎖可変ドメインを含む(それぞれ)。

30

40

【0040】

ある実施態様において、重鎖イムノグロブリン可変ドメイン配列は、X81 - B01の重鎖可変ドメインを含み、ならびに/または軽鎖イムノグロブリン可変ドメイン配列は、X81 - B01の軽鎖可変ドメインを含む。

【0041】

ある実施態様において、重鎖イムノグロブリン可変ドメイン配列は、X67 - D03、X101 - A01、M162 - A04、X115 - F02、X124 - G01もしくはX63 - G06の重鎖可変ドメインを含み、ならびに/または軽鎖イムノグロブリン可変ドメイン配列は、X67 - D03、X101 - A01、M162 - A04、X115 - F02、X124 - G01もしくはX63 - G06の軽鎖可変ドメインを含む(それぞれ)。

50

【 0 0 4 2 】

ある実施態様において、該タンパク質は、本明細書に記載されるタンパク質の重鎖および/もしくは本明細書に記載されるタンパク質の軽鎖を含む。

【 0 0 4 3 】

ある実施態様において、該タンパク質は、M 1 6 2 - A 0 4、M 1 6 0 - G 1 2、M 1 4 2 - H 0 8、X 6 3 - G 0 6、X 1 0 1 - A 0 1（本明細書においてD X - 2 9 2 2とも呼ばれる）、X 8 1 - B 0 1、X 6 7 - D 0 3、X 6 7 - G 0 4、X 8 1 - B 0 1、X 6 7 - D 0 3、X 6 7 - G 0 4、X 1 1 5 - B 0 7、X 1 1 5 - D 0 5、X 1 1 5 - E 0 9、X 1 1 5 - H 0 6、X 1 1 5 - A 0 3、X 1 1 5 - D 0 1、X 1 1 5 - F 0 2、X 1 2 4 - G 0 1（本明細書においてD X - 2 9 3 0とも呼ばれる）、X 1 1 5 - G 0 4、M 2 9 - D 0 9、M 1 4 5 - D 1 1、M 0 6 - D 0 9およびM 3 5 - G 0 4の重鎖を含む（それぞれ）。

10

【 0 0 4 4 】

ある実施態様において、該タンパク質は、X 8 1 - B 0 1の重鎖および/もしくはX 8 1 - B 0 1の軽鎖を含む。

【 0 0 4 5 】

ある実施態様において、該タンパク質は、X 6 7 - D 0 3、X 1 0 1 - A 0 1、M 1 6 2 - A 0 4、X 1 1 5 - F 0 2、X 1 2 4 - G 0 1もしくはX 6 3 - G 0 6の重鎖ならびに/またはX 6 7 - D 0 3、X 1 0 1 - A 0 1、M 1 6 2 - A 0 4、X 1 1 5 - F 0 2、X 1 2 4 - G 0 1もしくはX 6 3 - G 0 6の軽鎖を含む（それぞれ）。

20

【 0 0 4 6 】

ある実施態様において、該タンパク質は、以下の：（a）ヒトCDRもしくはヒトフレームワーク領域；（b）HCイムノグロブリン可変ドメイン配列が、本明細書に記載されるHC可変ドメインのCDRと少なくとも85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一であるCDRの一つもしくはそれ以上（例えば1、2もしくは3個）を含む；（c）LCイムノグロブリン可変ドメイン配列が、本明細書に記載されるLC可変ドメインのCDRと少なくとも85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一であるCDRの1個もしくはそれ以上（例えば1個、2個もしくは3個）を含む；（d）LCイムノグロブリン可変ドメイン配列が、本明細書に記載されるLC可変ドメイン（例えば、全体またはフレームワーク領域もしくはCDR）と少なくとも85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一である；（e）HCイムノグロブリン可変ドメイン配列が、本明細書に記載されるHC可変ドメイン（例えば、全体またはフレームワーク領域もしくはCDR）と少なくとも85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一である；（f）該タンパク質が、本明細書に記載されるタンパク質が結合するエピトープに結合するか、または、結合に関して本明細書に記載されるタンパク質と競合する；（g）霊長類CDRもしくは霊長類フレームワーク領域；（h）HCイムノグロブリン可変ドメイン配列が、本明細書に記載されるHC可変ドメインのCDR 1から少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個もしくは3個を超えるアミノ酸が異なることのないCDR 1を含む；（i）HCイムノグロブリン可変ドメイン配列が、本明細書に記載されるHC可変ドメインのCDR 2から、少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個、3個、4個、5個、6個、7個もしくは8個を超えるアミノ酸が異なることのないCDR 2を含む；（j）HCイムノグロブリン可変ドメイン配列が、本明細書に記載されるHC可変ドメインのCDR 3から、少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個、3個、4個、5個もしくは6個を超えるアミノ酸が異なることのないCDR 3を含む；（k）LCイムノグロブリン可変ドメイン配列が、本明細書に記載されるLC可変ドメインのCDR 1から少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個、3個、4個もしくは5個を超えるアミノ酸が異なることのないCDR 1を含む；（l）LCイムノグロ

30

40

50

ブリン可変ドメイン配列が、本明細書に記載されるLC可変ドメインのCDR2から少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個、3個もしくは4個を超えるアミノ酸が異なることのないCDR2を含む；(m)LCイムノグロブリン可変ドメイン配列が、本明細書に記載されるLC可変ドメインのCDR3から少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個、3個、4個もしくは5個を超えるアミノ酸が異なることのないCDR3を含む；(n)LCイムノグロブリン可変ドメイン配列が、本明細書に記載されるLC可変ドメイン(例えば、全体またはフレームワーク領域もしくはCDR)から少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個もしくは10個を超えるアミノ酸が異なることのない；ならびに(o)HCイムノグロブリン可変ドメイン配列が、本明細書に記載されるHC可変ドメイン(例えば、全体またはフレームワーク領域もしくはCDR)から少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個もしくは10個を超えるアミノ酸が異なることのない、という特徴の一つもしくはそれ以上を含む。

10

【0047】

ある実施態様において、該タンパク質は、1000nM、500nM、100nMもしくは10nM未満の見かけの阻害定数($K_{i,app}$)を持つ。

【0048】

好ましい実施態様において、該タンパク質は、M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本明細書においてDX-2922とも呼ばれる)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本明細書においてDX-2930とも呼ばれる)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09およびM35-G04からなる群より選択される抗体の軽鎖および重鎖を持つ抗体(例えばヒト抗体)である。

20

【0049】

好ましい実施態様において、該タンパク質は、M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本明細書においてDX-2922とも呼ばれる)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本明細書においてDX-2930とも呼ばれる)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09およびM35-G04からなる群より選択される抗体の重鎖を持つ抗体(例えばヒト抗体)である。

30

【0050】

好ましい実施態様において、該タンパク質は、M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本明細書においてDX-2922とも呼ばれる)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本明細書においてDX-2930とも呼ばれる)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09およびM35-G04からなる群より選択される抗体の軽鎖を持つ抗体(例えばヒト抗体)である。

40

【0051】

好ましい実施態様において、該タンパク質は、M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本明細書においてDX-2922とも呼ばれる)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本明細書においてDX-2930とも呼ばれる)、X115-G04

50

、M29-D09、M145-D11、M06-D09およびM35-G04からなる群より選択される抗体の軽鎖および/もしくは重鎖の抗体可変領域を持つ抗体（例えばヒト抗体）である。

【0052】

ある実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、プレカリクレイン（例えばヒトプレカリクレイン）には結合しないが、血漿カリクレイン（例えばヒト血漿カリクレイン）の活性型に結合する。

【0053】

ある実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、第XIIa因子および/もしくはブラジキニンの産生を、タンパク質の非存在下での同じ条件下での標準的な、例えば第XIIa因子および/もしくはブラジキニンの産生と比較して、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%もしくは約95%よりも大きく減少させる。

【0054】

ある実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、1000 nM、500 nM、100 nMもしくは10 nM未満の見かけの阻害定数 ($K_{i,app}$) を持つ。

【0055】

ある実施態様において、HCおよびLC可変ドメイン配列は、同じポリペプチド鎖の構成要素である。

【0056】

本開示の一つもしくはそれ以上の実施態様の詳細は、付随する図表および以下の記載において説明される。本開示の他の特徴、目標および利点は、記載および図表、ならびに請求項より明らかであろう。

【0057】

本出願全体において引用されるすべての参考文献、係属中の特許出願および公開された特許の内容は、参照により本明細書において、明示的に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】図1は、切断型HMWKと関節リウマチ、クローン病および潰瘍性大腸炎との相関を示す表である。

【発明を実施するための形態】

【0059】

本開示は、RA、CDもしくはUCを有する患者において切断型HMWKの上昇した濃度が観察されたという、予期せぬ発見に基づく。特に、切断型HMWKの高濃度がRA患者において観察され、切断型HMWKの中程度の濃度がCDおよびUCの患者の両方において観察された。したがって、対象の生物学的試料中の切断型HMWKの濃度に基づく、RA、UCもしくはCDのような自己免疫疾患を有しているかまたはそれらを発症する危険性のある対象を識別するため、自己免疫疾患の進行を監視するため、ならびに対象における自己免疫疾患の治療効果を判定するための新規の診断および予後判定の方法が本明細書において開示される。本明細書に記載されるもののようなpKa1阻害剤を用いて、そのような自己免疫疾患および血漿カリクレイン (pKa1) 系に関連する他の疾患の治療のための方法もまた本明細書において開示される。

【0060】

定義

便宜のため、本開示のさらなる説明の前に、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲において使用される特定の用語をここで定義する。

【0061】

単数形の「a」、「an」および「the」は、文脈が明確に他を示さない限り、複数への言及を含む。

10

20

30

40

50

【0062】

用語「抗体」は、少なくとも一つのイムノグロブリン可変ドメインもしくはイムノグロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質を指す。例えば、抗体は、重(H)鎖可変領域(本明細書においてVHと略される)、および軽(L)鎖可変領域(本明細書においてVLと略される)を含み得る。他の例において、抗体は、2個の重(H)鎖可変領域と2個の軽(L)鎖可変領域を含む。用語「抗体」は、抗体の抗原結合断片(例えば、一本鎖抗体、FabおよびsFab断片、F(ab')₂、Fd断片、Fv断片、scFv、およびドメイン抗体(dAb)断片(de Wildtら、Eur J Immunol、1996、26(3)、629~639))ならびに完全な抗体を包含する。抗体は、IgA、IgG、IgE、IgD、IgM(ならびにそれらのサブタイプ)の構造的特徴を持ち得る。抗体は任意の起源由来であってよいが、霊長類(ヒトおよび非ヒトの霊長類)および霊長類化のものが好ましい。

10

【0063】

VHおよびVL領域は、フレームワーク領域(「FR」)と呼ばれるより保存された領域が介在する「相補性決定領域(「CDR」)」と呼ばれる超可変領域へとさらに細分され得る。フレームワーク領域およびCDRの範囲は正確に定義されている(Kabat, E.A.ら(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242およびChothia, C.ら(1987) J. Mol. Biol. 196:901-917を参照。www.hgmp.mrc.ac.ukもまた参照できる。)。Kabatの定義を本明細書において使用する。それぞれのVHおよびVLは、典型的には3個のCDRと4個のFRからなり、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順番で配置される。

20

【0064】

抗体のVH鎖もしくはVL鎖はそれぞれ、重鎖定常領域もしくは軽鎖定常領域のすべてもしくは部分をさらに含んでもよく、それによってイムノグロブリン重鎖もしくはイムノグロブリン軽鎖をそれぞれ形成する。一実施態様において、抗体は2個のイムノグロブリン重鎖と2個のイムノグロブリン軽鎖とのテトラマーであり、ここで、イムノグロブリン重鎖とイムノグロブリン軽鎖とは、例えばジスルフィド結合によって相互結合されている。IgGにおいて、重鎖定常領域は、3個のイムノグロブリンドメインCH1、CH2およびCH3を含む。軽鎖定常領域はCLドメインを含む。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、典型的には、免疫系のさまざまな細胞(例えばエフェクター細胞)および古典的補体系の第一成分(C1q)を含む宿主の組織もしくは因子への抗体の結合を媒介する。イムノグロブリンの軽鎖は、もしくはのタイプであってよい。一実施態様において、抗体はグリコシル化されている。抗体は、抗体依存性細胞傷害性および/もしくは補体依存性細胞障害性に関して機能的であり得る。

30

【0065】

抗体の一つもしくはそれ以上の領域はヒトもしくは事実上ヒトのものであってよい。例えば、可変領域の一つもしくはそれ以上は、ヒトもしくは事実上ヒトのものであってよい。例えば、CDRの一つもしくはそれ以上はヒトの、例えばHC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3であってよい。軽鎖CDRのそれぞれはヒトのものであってよい。HC CDR3はヒトのものであってよい。フレームワーク領域の一つもしくはそれ以上は、ヒトの、例えばHCもしくはLCのFR1、FR2、FR3およびFR4であってよい。例えば、Fc領域はヒトのものであってよい。一実施態様において、フレームワーク領域の全てはヒトのものであり、例えばイムノグロブリンを産生する造血細胞もしくは非造血細胞のような、例えばヒトの体細胞で産生された抗体のフレームワークの配列を持つ。一実施態様において、ヒトの

40

50

配列は、例えば生殖細胞系列の核酸によってコードされる、生殖細胞系列の配列である。一実施態様において、選択された F a b のフレームワーク (F R) の残基を、最も類似する霊長類の生殖細胞系列の遺伝子、特にヒトの生殖細胞系列の遺伝子における対応する残基のアミノ酸タイプに変換することができる。定常領域の一つもしくはそれ以上は、ヒトもしくは事実上ヒトのものであってよい。例えば、イムノグロブリン可変ドメイン、定常領域、定常ドメイン (C H 1、C H 2、C H 3、C L 1) もしくは抗体全体の少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 8 % もしくは 1 0 0 % は、ヒトもしくは事実上ヒトのものであってよい。

【 0 0 6 6 】

抗体のすべてもしくは部分は、イムノグロブリン遺伝子もしくはそのセグメントによってコードされ得る。例示的なヒトイムノグロブリン遺伝子は、 κ 、 λ (I g A 1 および I g A 2)、 μ 、 δ (I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4)、 ϵ および μ の定常領域遺伝子ならびに多くのイムノグロブリン可変領域遺伝子を含む。全長のイムノグロブリン「軽鎖」(約 2 5 k D a もしくはアミノ酸約 2 1 4 個)は、N H 2 末端における可変領域遺伝子(アミノ酸約 1 1 0 個)、ならびに、C O O H 末端における μ もしくは δ 定常領域遺伝子によってコードされる。全長のイムノグロブリン「重鎖」(約 5 0 k D a もしくはアミノ酸約 4 4 6 個)は、同様に、可変領域遺伝子(アミノ酸約 1 1 6 個)および例えば(アミノ酸約 3 3 0 個をコードする) μ のような他の上述の定常領域遺伝子の一つによってコードされる。ヒト H C の長さは、H C C D R 3 がアミノ酸残基約 3 個からアミノ酸残基 3 5 個超まで変化するために、大幅に変化する。

【 0 0 6 7 】

全長抗体の「抗原結合断片」という用語は、関心対象の標的に特異的に結合する能力を保持する全長抗体の一つもしくはそれ以上の断片を指す。全長抗体の「抗原結合断片」という用語に包含される結合断片の例は、(i) V L、V H、C L および C H 1 ドメインからなる一価の断片である、F a b 断片；(i i) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合する 2 個の F a b 断片を含む二価の断片である F (a b ')₂ 断片、(i i i) V H および C H 1 ドメインからなる F d 断片、(i v) 抗体の単腕の V L および V H ドメインからなる F v 断片、(v) V H ドメインからなる d A b 断片 (W a r d ら (1 9 8 9) N a t u r e 3 4 1 : 5 4 4 - 5 4 6)、ならびに (v i) 機能性を保持する、単離された相補性決定領域 (C D R) を含む。さらに、V L および V H である F v 断片の 2 個のドメインは、別個の遺伝子によってコードされるが、それらを、組換え法を用いて、合成リンカーによって結合して、V L および V H 領域が対を形成して一本鎖 F v (s c F v) として知られる一価の分子を形成する単一のタンパク質鎖として作製することができる (例えば米国特許第 5, 2 6 0, 2 0 3 号、米国特許第 4, 9 4 6, 7 7 8 号および米国特許第 4, 8 8 1, 1 7 5 号、B i r d ら (1 9 8 8) S c i e n c e 2 4 2 : 4 2 3 - 4 2 6 および H u s t o n ら (1 9 8 8) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 5 : 5 8 7 9 - 5 8 8 3 を参照)。

【 0 0 6 8 】

抗体断片は、当業者に公知の従来技術を含む任意の好適な技術を用いて取得できる。用語「単一特異的抗体」は、例えばエピトープのような特定の標的に対する単一の結合特異性および結合親和性を示す抗体を指す。この用語は「モノクローナル抗体」もしくは「モノクローナル抗体組成物」を含み、それらは、本明細書において、抗体がどのように生成されたかに関わらず、単一の分子組成の抗体もしくはその断片の調製物を指すのに用いられる。

【 0 0 6 9 】

阻害定数 (K i) は、阻害剤の効力の尺度を提供し、それは、酵素活性を半減させるのに必要な阻害剤の濃度であり、酵素もしくは基質の濃度に依存しない。見かけの K i (K_{i, app}) を、異なる濃度の阻害剤 (例えば阻害的結合タンパク質) が反応の度合い (例えば酵素活性) に及ぼす阻害効果を測定することによって、異なる基質濃度で得て、阻害剤の濃度の関数としての擬 1 次速度定数の変化をモリソン式 (式 1) に適合させること

10

20

30

40

50

で見かけの K_i 値の推定値を得る。 K_i は、 $K_{i, app}$ 対基質濃度のプロットの線形回帰分析から得られる Y 切片から得られる。

【数 1】

$$v = v_o - v_o \left(\frac{(K_{i, app} + I + E) - \sqrt{(K_{i, app} + I + E)^2 - 4 \cdot I \cdot E}}{2 \cdot E} \right)$$

式 1

v = 測定された速度； v_o = 阻害剤の非存在下での速度； $K_{i, app}$ = 見かけの阻害定数； I = 総阻害剤濃度、および E = 総酵素濃度

10

【0070】

本明細書で用いられるとき、「結合親和性」は、見かけの会合定数もしくは K_a を指す。 K_a は、解離定数 (K_d) の逆数である。結合タンパク質は、特定の標的分子に対して、例えば、少なくとも $10^5 M^{-1}$ 、 $10^6 M^{-1}$ 、 $10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ および $10^{11} M^{-1}$ の結合親和性を持つ。第二の標的と比べて第一の標的に対する結合タンパク質の結合の親和性が高いことは、第一の標的との結合に対する K_a が第二の標的との結合に対する K_a (もしくは数値 K_d) よりも高いこと (もしくはより小さい数値 K_d) によって示され得る。そのような場合、結合タンパク質は、第二の標的 (例えば、第二の立体構造での同じタンパク質もしくはそれらの模倣体、または第二のタンパク質) と比較して、第一の標的 (例えば、第一の立体構造でのタンパク質もしくはそれらの模倣体) に対して特異性を有する。結合親和性の差 (例えば特異性もしくは他の比較) は、少なくとも、1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、15 倍、20 倍、37.5 倍、50 倍、70 倍、80 倍、91 倍、100 倍、500 倍、1000 倍、もしくは 10^5 倍であり得る。

20

【0071】

結合親和性は、平衡透析、平衡結合、ゲル濾過、ELISA、表面プラズモン共鳴もしくは (例えば、蛍光アッセイを用いる) 分光法を含むさまざまな方法によって測定できる。結合親和性を評価するための例示的な条件は、TRIS 緩衝液 (50 mM の TRIS、150 mM の NaCl、5 mM の CaCl₂、pH 7.5) 中である。これらの技術を使用して、結合タンパク質 (もしくは標的) の濃度の関数として、結合しているおよび遊離の結合タンパク質の濃度を測定することができる。結合している結合タンパク質の濃度 ([結合]) は、遊離の結合タンパク質の濃度 ([遊離]) および標的上の結合タンパク質に対する結合部位の濃度と、以下の式

30

$$[\text{結合}] = N \cdot [\text{遊離}] / ((1 / K_a) + [\text{遊離}])$$

で表される関係を有し、式中 (N) は、標的分子当たりの結合部位の数である。

【0072】

しかし、 K_a を正確に決定することは必ずしも必要ではなく、その理由は、時に、例えば ELISA もしくは FACS 分析のような方法を用いて決定され、 K_a に比例し、したがって、より高い親和性が、例えば 2 倍高いか否かを決定することなどの比較のために使用できる親和性の定量的測定を得ること、親和性の定性的測定を得ること、または、例えばインビトロもしくはインビボのアッセイのような、例えば機能性アッセイの活性によって親和性の推定値を得ることによって十分であるためである。

40

【0073】

用語「結合タンパク質」は、標的分子と相互作用できるタンパク質を指す。この用語は、「リガンド」と相互交換可能に使用される。「血漿カリクレイン結合タンパク質」は、血漿カリクレインと相互作用 (例えば結合) できるタンパク質を指し、特に、選択的もしくは特異的に、血漿カリクレインと相互作用および/もしくは血漿カリクレインを阻害するタンパク質を含む。タンパク質は、該タンパク質の非存在下での同じ条件における血漿カリクレインの活性と比較して、血漿カリクレインの活性の低減を引き起こす場合、血漿

50

カリクレインを阻害する。ある実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は抗体である。

【0074】

用語「カリクレイン阻害剤」は、カリクレインを阻害する任意の剤もしくは分子を指す。

【0075】

用語「併用」は、剤もしくは治療の使用もしくは作用の時間が重なる、同じ患者を治療するために二つ以上の剤もしくは治療を使用することを指す。剤もしくは治療は、同時に（例えば、患者に投与される1つの製剤として、もしくは同時に投与される2個別々の製剤として）もしくは任意の順番で連続的に投与され得る。

10

【0076】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を持つアミノ酸残基と置換されているものである。類似の側鎖を持つアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖（例えばトレオニン、バリン、イソロイシン）、ならびに芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。

20

【0077】

結合タンパク質のフレームワークおよび/もしくはCDRアミノ酸残基（または結合ループアミノ酸残基）の一つもしくはそれ以上が、本明細書に記載される結合タンパクと比べて一つもしくはそれ以上の変異（例えば置換（例えば保存的置換もしくは必須でないアミノ酸の置換）、挿入または欠失）を含むことができる。血漿カリクレイン結合タンパク質は、本明細書に記載される結合タンパク質と比べて変異（例えば置換（例えば保存的置換もしくは非必須アミノ酸の置換）（例えば少なくとも1個、2個、3個もしくは4個ならびに/または15個、12個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個もしくは2個未満）持っていてよく、例えばタンパク質の機能に実質的に影響を与えない変異を持っていてよい。変異は、フレームワーク領域、CDR（もしくは結合ループ）および/もしくは定常領域に存在してよい。ある実施態様において、変異はフレームワーク領域に存在する。ある実施態様において、変異はCDRに存在する。ある実施態様において、変異は定常領域に存在する。特定の置換が認容されるか否か、すなわち、例えば結合活性のような生物学的特性に悪い影響を与えないことは、例えば、変異が保存的かを評価することによって、またはBowier(1990) Science 247, 1306~1310の方法によって、予測できる。

30

【0078】

「事実上ヒト」のイムノグロブリン可変領域は、イムノグロブリン可変領域が正常なヒトにおいて免疫原性応答を引き起こさないのに十分な数のヒトのフレームワークアミノ酸位置を含むイムノグロブリン可変領域である。「事実上ヒト」の抗体は、抗体が正常ヒトにおいて免疫原性応答を引き起こさないのに十分な数のヒトアミノ酸位置を含む抗体である。

40

【0079】

「エピトープ」は、結合タンパク質（例えば、Fabもしくは全長抗体のような抗体）によって結合される標的化合物上の部位を指す。標的化合物がタンパク質である場合、部位はすべてアミノ酸構成要素からなることができるか、もしくは部位がすべてタンパク質のアミノ酸の化学修飾（例えばグリコシル部分）からなることができるか、またはそれらの組み合わせからなることができる。重なるエピトープは、少なくとも一つの共通の、アミノ酸残基、グリコシル基、リン酸基、硫酸基、もしくは他の分子特徴を含む。

【0080】

50

標的化合物上で第二の結合タンパク質が結合する部位と同じ部位に第一の結合タンパク質が結合する場合、または第二の結合タンパク質が結合する部位と重なる（例えば、アミノ酸配列もしくは他の分子特徴（例えばグリコシル基、リン酸基もしくは硫酸基）に関して、例えば50%、60%、70%、80%、90%もしくは100%重なる）部位に第一の結合タンパク質が結合する場合、第一の結合タンパク質（例えば抗体）が、第二の結合タンパク質（例えば抗体）と「同じエピトープに結合する」。

【0081】

第一の結合タンパク質のそのエピトープへの結合が、そのエピトープへと結合する第二の結合タンパク質の量を減少させる（例えば10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%もしくはそれ以上）場合、第一の結合タンパク質（例えば抗体）が、第二の結合タンパク質（例えば抗体）と「結合に関して競合する」。競合は、直接的（例えば、第一の結合タンパク質が第二の結合タンパク質の結合するエピトープと同じエピトープに結合するかまたは、第一の結合タンパク質が第二の結合タンパク質の結合するエピトープと重なるエピトープに結合する）であっても間接的（例えば、第一の結合タンパク質のエピトープに対する結合が標的化合物の立体構造変化を引き起こし、それによって第二の結合タンパク質によるそのエピトープへの結合能が低減する）であってもよい。

【0082】

2個の配列の間の「相同性」もしくは「配列同一性」（これらの用語は本明細書において相互交換可能に使用される）の計算は、以下のように実施される。配列を、最適比較の目的のために整列させる（例えば最適アラインメントのために、第一のおよび第二のアミノ酸もしくは核酸の配列の一方もしくは両方にギャップを導入でき、非相同性配列は、比較の目的のために度外視できる）。最適アラインメントを、12のギャップペナルティ、4のギャップ拡張ペナルティ、および5のフレームシフトギャップペナルティでBlossum 62スコアリングマトリックスによるGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムを用いた最良のスコアとして決定する。次に、対応するアミノ酸位置もしくはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基もしくはヌクレオチドを比較する。第一の配列中の位置が、第二の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基もしくはヌクレオチドによって占められているとき、それら分子は、その位置において同一である（本明細書において使用されるとき、アミノ酸もしくは核酸の「同一性」は、アミノ酸もしくは核酸の「相同性」と等価である）。2個の配列の間のパーセント同一性は、それらの配列によって共有される同一の位置の数の関数である。

【0083】

好ましい実施態様において、比較目的で整列させる参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも60%、そしてさらにより好ましくは少なくとも70%、80%、90%、92%、95%、97%、98%もしくは100%である。例えば、参照配列は、イムノグロブリン可変ドメイン配列の長さであってよい。

【0084】

「ヒト化」イムノグロブリン可変領域は、イムノグロブリン可変領域が正常なヒトにおいて免疫原性応答を引き起こさないのに十分な数のヒトフレームワークアミノ酸位置を含むように改変されたイムノグロブリン可変領域である。「ヒト化」イムノグロブリンの記載は、例えば、米国特許第6,407,213号および米国特許第5,693,762号を含む。

【0085】

本明細書で使用されるとき、用語「低ストリンジェント、中ストリンジェント、高ストリンジェントもしくは非常に高いストリンジェントな条件下でのハイブリダイズ」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件を記載する。ハイブリダイゼーション反応を実施するためのガイダンスは、「Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (19

10

20

30

40

50

89)、6.3.1~6.3.6.)に見出すことができる。水性および非水性の方法がその参考文献に記載され、いずれも使用することができる。本明細書に言及される具体的なハイブリダイゼーションの条件は、以下の：(1)約45で6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中の後に、少なくとも50(低ストリンジェント条件において、洗浄温度は55まで上昇させることができる)で0.2×SSC、0.1%SDS中での2回の洗浄を行う低ストリンジェントハイブリダイゼーション条件、(2)約45で6×SSC中の後に、60での0.2×SSC、0.1%SDS中での1回もしくはそれ以上の洗浄を行う中ストリンジェントハイブリダイゼーション条件、(3)約45で6×SSC中の後に、65で0.2×SSC、0.1%SDS中での1回もしくはそれ以上の洗浄を行う高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件であり、そして(4)非常に高いストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、65で0.5Mリン酸ナトリウム、7%SDSの後に、65で0.2×SSC、1%SDS中での1回もしくはそれ以上の洗浄を行う。非常に高いストリンジェント条件(4)は、好ましい条件であり、他に特定されない限り、使用されるべきものである。本開示は、例えば本明細書に記載される結合タンパク質をコードする核酸のような、本明細書に記載される核酸もしくはその相補体に、低、中、高もしくは非常に高いストリンジェントでハイブリダイズする核酸を含む。該核酸は、参照核酸の長さと同じであるか、またはその30%、20%もしくは10%の範囲の長さであってよい。該核酸は、本明細書に記載されるイムノグロブリン可変ドメインをコードする領域に対応してもよい。

10

【0086】

20

「単離した組成物」は、単離した組成物を取得することのできた天然試料の少なくとも一つの成分の少なくとも90%が除去された組成物を指す。人工的にもしくは天然で産生された組成物は、関心対象の種もしくは種の集合が、少なくとも5、10、25、50、75、80%、90%、92%、95%、98%もしくは99重量%純粋である場合、「少なくとも」特定の度合いで純粋である「組成物」であり得る。

【0087】

「単離した」タンパク質は、単離したタンパク質を取得することのできた天然試料の少なくとも一つの成分の少なくとも90%から除去されたタンパク質を指す。タンパク質は、関心対象の種もしくは種の集合が、少なくとも5、10、25、50、75、80、90、92、95、98もしくは99重量%純粋である場合、「少なくとも」特定の度合いで純粋であり得る。

30

【0088】

「非必須」アミノ酸残基は、例えば抗体のような結合剤の野生型配列から生物学的活性を消失させることなく、もしくはより好ましくは実質的に変化させることなく変更できる残基であり、一方で「必須」アミノ酸残基を変化させると、活性の大幅な損失を生じる。

【0089】

該方法によって治療されるべき「患者」、「対象」もしくは「宿主」(これらの用語は相互交換可能に使用される)は、ヒトもしくは非ヒトの動物のいずれかを意味し得る。

【0090】

「それを必要とする対象」は、例えば、本明細書に記載される疾患もしくは障害を有する対象、または、本明細書に記載される疾患もしくは障害を発症する危険性のある対象を含む。

40

【0091】

用語「カリクレイン」(例えば血漿カリクレイン)は、セリンプロテアーゼファミリーのサブグループであるペプチダーゼ(タンパク質のペプチド結合を切断する酵素)を指す。血漿カリクレインは、キニノーゲンを切断して強力な炎症誘発性ペプチドであるキニンを産生する。DX-88(本明細書において「PEP-1」とも呼ばれる)は、血漿カリクレイン(NP_000883)の強力(Ki<1nM)かつ特異的な阻害剤である(例えばWO95/21601もしくはWO2003/103475を参照)。

【0092】

50

K L K b 1 (血漿カリクレイン) のアミノ酸配列は、

K L K b 1

> gi | 78191798 | ref | NP_000883.2 | 血漿カリクレインB1
前駆体 [Homo sapiens]

M I L F K Q A T Y F I S L F A T V S C G C L T Q L Y E N A F F R G G D V A S M Y
T P N A Q Y C Q M R C T F H P R C L L F S F L P A S S I N D M E K R F G C F L K
D S V T G T L P K V H R T G A V S G H S L K Q C G H Q I S A C H R D I Y K G V D
M R G V N F N V S K V S S V E E C Q K R C T S N I R C Q F F S Y A T Q T F H K A
E Y R N N C L L K Y S P G G T P T A I K V L S N V E S G F S L K P C A L S E I G
C H M N I F Q H L A F S D V D V A R V L T P D A F V C R T I C T Y H P N C L F F
T F Y T N V W K I E S Q R N V C L L K T S E S G T P S S S T P Q E N T I S G Y S
L L T C K R T L P E P C H S K I Y P G V D F G G E E L N V T F V K G V N V C Q E
T C T K M I R C Q F F T Y S L L P E D C K E E K C K C F L R L S M D G S P T R I
A Y G T Q G S S G Y S L R L C N T G D N S V C T T K T S T R I V G G T N S S W G
E W P W Q V S L Q V K L T A Q R H L C G G S L I G H Q W V L T A A H C F D G L P
L Q D V W R I Y S G I L N L S D I T K D T P F S Q I K E I I I H Q N Y K V S E G
N H D I A L I K L Q A P L N Y T E F Q K P I C L P S K G D T S T I Y T N C W V T
G W G F S K E K G E I Q N I L Q K V N I P L V T N E E C Q K R Y Q D Y K I T Q R
M V C A G Y K E G G K D A C K G D S G G P L V C K H N G M W R L V G I T S W G E
G C A R R E Q P G V Y T K V A E Y M D W I L E K T Q S S D G K A Q M Q S P A (配
列識別番号3) である。

10

20

【 0 0 9 3 】

本明細書において使用されるとき、用語「DX-2922」は、用語「X101-A01」と交換可能に使用される。この抗体の他の変異型は以下に記載される。

【表1】

抗体識別番号	説明
X63-G06	ROLICを用いて見出された、非生殖細胞系列化Fab、M160-G12と同じHCを有するが、LCは異なる。
X81-B01	HEK293T細胞中で産生される生殖細胞系列化IgG。
X101-A01	CHO細胞で産生される生殖細胞系列化IgG、X81-B01と同じHCおよびLC配列を有する
DX-2922	X101-A01の別名である。

30

【 0 0 9 4 】

本明細書において使用されるとき、用語「DX-2930」は、用語「X124-G01」と交換可能に使用される。この抗体の他の変異型は以下に記載される。

【表 2】

抗体識別番号	説明
M162-A04	ファージディスプレイを用いて見出された、非生殖細胞系列化F a b
M199-A08	M162-A04の親和性成熟由来の重鎖CDR3変異F a b
X115-F02	HEK293T細胞中で産生される生殖細胞系列化I g G、X124-G01と同じ可変重鎖を有する。
X124-G01 or DX-2930	CHO細胞で産生される生殖細胞系列化I g G、X124-G01 (DX-2930としても知られる)においてHCのC末端のL y sが除去されていることを除いてX115-F02と同じLCおよびHCの配列を有する

10

【0095】

K L K 1

> g i | 1 3 5 2 9 0 5 9 | g b | A A H 0 5 3 1 3 . 1 | カリクレイン1 [H o m o s a p i e n s]

M W F L V L C L A L S L G G T G A A P P I Q S R I V G G W E C E Q H S Q P W Q A
 A L Y H F S T F Q C G G I L V H R Q W V L T A A H C I S D N Y Q L W L G R H N L
 F D D E N T A Q F V H V S E S F P H P G F N M S L L E N H T R Q A D E D Y S H D
 L M L L R L T E P A D T I T D A V K V V E L P T Q E P E V G S T C L A S G W G S
 I E P E N F S F P D D L Q C V D L K I L P N D E C K K V H V Q K V T D F M L C V
 G H L E G G K D T C V G D S G G P L M C D G V L Q G V T S W G Y V P C G T P N K
 P S V A V R V L S Y V K W I E D T I A E N S (配列識別番号4)

20

【0096】

本明細書で使用されるとき、語句「非経口投与」および「非経口で投与される」は、経腸および局所表面の投与以外の投与の様式を意味し、通常注射によるものであり、そして、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内の注射および注入を非限定的に含む。

30

【0097】

対象における疾患を「予防する」という用語は、対象に例えば薬剤の投与のような薬品治療を施して、疾患の少なくとも一つの症状が予防されるようにすることを指し、すなわち、宿主が望ましくない状態になることを防ぐために、望ましくない状態（例えば疾患もしくは宿主動物の他の望ましくない状態）の臨床症状発現より前に施される。疾患を「予防する」は、「予防」もしくは「予防的治療」とも呼ばれる。

【0098】

「予防的有効量」は、用量においておよび必要な期間において、所望の予防の結果を達成するのに有効な量を指す。典型的には、疾患の前、もしくは疾患の初期段階において予防的な用量が対象に用いられるため、予防的有効量は、治療的有効量よりも少なくなり得るが、必ずしもそうであることはない。

40

【0099】

本明細書において使用されるとき、用語「実質的に同一」（もしくは「実質的に相同」）は、第一および第二のアミノ酸もしくは核酸配列が類似の活性、例えば結合活性、結合選択性、もしくは生物活性を有する（もしくは有するタンパク質をコードする）ように、第一のアミノ酸もしくは核酸配列が、第二のアミノ酸もしくは核酸配列に対し、十分な数の同一もしくは同等の（例えば、例えば保存的アミノ酸置換のような類似の側鎖を持つ）アミノ酸残基もしくは核酸を含むことを指すものとして本明細書において使用される。抗体の場合、第二の抗体は、同じ抗原に対して、同じ特異性を持ち、かつ同じ抗原に対して少なくとも50%、少なくとも25%もしくは少なくとも10%の親和性を持つ。

50

【0100】

本明細書に開示される配列と類似もしくは相同（例えば、少なくとも約85%の配列同一性）の配列は、本願の部分でもある。ある実施態様において、配列の同一性は、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上であってよい。ある実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の、本明細書に記載される結合タンパク質に対する配列同一性を持っていてよい。ある実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、本明細書に記載される結合タンパク質に対して、HCおよび/もしくはLCフレームワーク領域（例えばHCおよび/もしくはLC FR1、2、3および/もしくは4）において約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を持っていてよい。ある実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、本明細書に記載される結合タンパク質に対して、HCおよび/もしくはLC CDR（例えばHCおよび/もしくはLC CDR1、2および/もしくは3）において約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を持っていてよい。ある実施態様において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、本明細書に記載される結合タンパク質に対して、定常領域（例えばCH1、CH2、CH3および/もしくはCL1）において約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を持っていてよい。

10

20

【0101】

さらに、核酸セグメントが選択的なハイブリダイゼーション条件（例えば、高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件）において相補鎖に結合するとき、実質的な同一性が存在する。核酸は、全細胞に、細胞溶解物に、または部分精製型もしくは実質的に純粋型で存在し得る。

【0102】

バイオポリマーのモチーフ配列は、変異アミノ酸であり得る位置を含み得る。例えば、そのような文脈における記号「X」は他に特定されない限り任意のアミノ酸（例えば20種の天然アミノ酸の任意のもの）を指し、例えば、任意の非システインアミノ酸を指す。他の許容されるアミノ酸はまた、例えば括弧およびスラッシュを用いて表記することができる。例えば、「A/W/F/N/Q」は、アラニン、トリプトファン、フェニルアラニン、アスパラギンおよびグルタミンがその特定の位置において許容されることを意味する。

30

【0103】

統計学的有意性は、任意の当技術分野に公知の方法によって決定され得る。例示的な統計学的な検定は、スチューデントのt検定、マン・ホイットニーのUノンパラメトリック検定およびウィルコクソンのノンパラメトリック検定を含む。ある統計学的に有意な関係は、0.05もしくは0.02未満のP値を持つ。特定の結合タンパク質は、例えば特異性もしくは結合において、統計的に有意（例えばP値<0.05もしくは0.02）である差を示し得る。用語「誘導する」、「阻害する」、「増強する」、「上昇する」、「増加する」、「減少する」などは、例えば二つの状態の間の、区別可能な定性的もしくは定量的な差を示し、そして二つの状態の間の差、例えば統計学的に有意な差を指し得る。

40

【0104】

「治療的に有効な量」は、用量においておよび必要な期間において、所望の治療の結果を達成するのに十分な量を指す。組成物の治療的有效量は、個人の疾患の状態、年齢、性別および体重のような要因、ならびに個体において所望の応答を誘発するタンパク質の能力に従って変動し得る。治療的有效量はまた、治療的に有益な効果が組成物の任意の毒性効果もしくは有害な効果を上回る量である。

【0105】

「治療的に有効な用量」は、好ましくは疾患もしくは障害の測定可能なパラメータを調

50

節する。例えば、治療的に有効な用量は、疾患もしくは障害の症状の度合いを、治療前の症状と比較して少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、さらにより好ましくは少なくとも約60%、そしてさらにより好ましくは約80%低減できる。例えば疾患に関連するパラメータのような測定可能なパラメータを調節できる化合物の能力は、ヒトの障害および状態における有効性を予測する動物モデル系において評価できる。代替的に、組成物のこの性質は、インビトロのパラメータを調節する化合物の能力を試験することによって評価できる。

【0106】

対象における疾患もしくは障害の「治療」（例えば疾患もしくは障害を持つかもしくは疾患もしくは障害を発症する危険性のある対象の「治療」を含む）は、例えば薬物投与のような薬品治療を対象に施して、疾患の少なくとも一つの症状が予防、治癒、緩和、減少することなどを指す。

10

【0107】

「タンパク質のミスフォールディングもしくは凝集に関連する疾患」は、少なくとも部分的にはタンパク質の折りたたみプロセスにおける変化、もしくはタンパク質の折りたたみ構造の安定性の変化に起因して起こる疾患である。折りたたみプロセスにおける障害、凝集の増加、および天然タンパク質構造の脱安定化は、機能喪失型もしくは機能獲得型の病態を引き起こし得る。タンパク質のミスフォールディングもしくは凝集に関連する疾患は、全身性アミロイドーシス、クリオグロブリン血症、および鎌状赤血球症を含むがそれらには限定されない。タンパク質のミスフォールディングもしくは凝集に関連する神経性疾患は、ヤコブ クロイツフェルト病（プリオンタンパク質に関連する）、アルツハイマー病、家族性アミロイド多発ニューロパシー（FAP）のような他のアミロイド疾患を含む。

20

【0108】

I. 自己免疫疾患の診断および予後判定のアッセイにおけるバイオマーカーとしての切断型高分子量キニノーゲン（HMWK）の使用

予期せずに、関節リウマチ（RA）、クローン病（CD）および潰瘍性大腸炎（UC）のような自己免疫疾患において切断型HMWKの上昇した濃度が見出された。以下の実施例1を参照できる。したがって、切断型HMWKは、自己免疫疾患（例えばRA、UCおよびCD）の診断、そのような自己免疫疾患の進行の監視、および疾患の治療効果の判定のための信頼できるバイオマーカーとしての役割を果たし得る。

30

【0109】

したがって、患者の候補から取得された生物学的試料（例えば血漿試料）中の切断型HMWKの濃度に基づく自己免疫疾患（例えばRA、UCおよびCD）の診断および予後判定の方法が本明細書に記載される。

【0110】

高分子量キニノーゲン（HMWK）は、ウィリアムズ - フィッツジェラルド - Fla u j e a c 因子、フィッツジェラルド因子、HMWK - カリクレイン因子としてもまた知られ、血液凝固系ならびにキニン - カリクレイン系由来のタンパク質である。それは、インビボで血液と接触する生体材料表面に吸着するタンパク質である。高分子量キニノーゲン（HMWK）は、血漿中で、およそ110kDaの分子量を持つ単一のポリペプチド（1本鎖）のマルチドメイン（ドメイン1～6個）タンパク質として存在する。HMWKは、ドメイン4中でpKa1によって切断され、アミノ酸9個の炎症誘発性ペプチドであるブラジキニンと2本鎖型のHMWK（切断型キニノーゲン）とを放出する。HMWKの2つの鎖は、HMWKのドメイン1～3を含む重鎖、ならびにHMWKのドメイン5および6を持つ軽鎖である。重鎖および軽鎖は、それぞれ、およそ56および46キロダルトンの分子量を持つ。

40

【0111】

HMWKをコードするヒトの遺伝子は、キニノーゲン1（KNG1）である。KNG1は、転写され、そして選択的にスプライシングされて、HMWKもしくは低分子量キニノ

50

ーゲン (LMWK) のいずれかをコードする mRNA を形成する。HMWK の例示的なタンパク質配列は以下に提供される：

> gi | 156231037 | ref | NP_001095886.1 | キニノーゲン
- 1 アイソフォーム 1 前駆体 [Homo sapiens]
MKLITILFLCSRLLSLTQESQSEEDCNDKDLFKAVDAAL
LKKYNSQNQSNNQFVLYRITEATKTVGSDTFYSFKYEIKE
GDCPVQSGKWTWQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFS
VATQTCQITPAEGPVVTAQYDCLGCVHPISTQSPDLEPIL
RHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVVAGLNFRIITYS
IVQTNC SKENFLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLR
IASFSQNCDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDIPTNSPELEE
TLTHTITKLN AENNA T FYFKIDNVKKARVQVVAGKKYFID
FVARETTCSKESNEELTESCETKKLGQSLDCNAEVYVVPW
EKKIYPTVNCQPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGEIKEET
TVSPPHTSMA PAQDEERDSGKEQGHTRRHWDWGHEKQRKHN
LGHGHKHERDQGHGHQRGHGLGHGHEQQHGLGHGHKFKLD
DDLEHQGGHVL DHGHKHKHGHGHGHGKHKNGKKNKNGKHNGWK
TEHLASSSEDS TTPSAQTQEKT EGP TPIPSLAKPGVTVTF
SDFQDSDLIATMMPPISPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLSF
NPISDFPD T TSPKCPGRPWKSVSEINPTTQMKESY YFDLT
DGLS (配列識別番号 5)

【0112】

無傷の高分子量キニノーゲン (HMWK) は、例えば、凝集法もしくは例えばラジオイムノアッセイのような免疫学的方法を用いてアッセイできる (例えば Kerbiriou - Nabias, D.M., Br J Haematol, 1984, 56(2): 2734 ~ 2786 を参照できる)。ヒト HMWK の軽鎖に対するモノクローナル抗体は公知である (例えば、Reddigari, S.R. および Kaplan, A.P., Blood, 1999, 74: 695 ~ 702 を参照できる)。発色基質に基づいた HMWK のアッセイもまた使用できる (例えば、Scott, C.F. ら、Thromb Res, 1987, 48(6): 685 ~ 700; Gallimore, M.J. ら Thromb Res, 2004, 114(2): 91 - 96 を参照できる)。

【0113】

切断型高分子量キニノーゲン (HMWK) は、本明細書において「切断型キニノーゲン」とも呼ばれ、例えば、例えばウェスタンブロットのような実施例 1 に記載される方法を用いてアッセイできる。例えばマウス mAb クローン 11H05 のような、切断型 HMWK に特異的に結合する抗体を使用できる。さらに、切断型 HMWK は、質量分析を用いて評価してもよい。切断型 HMWK の濃度を評価するためのイムノブロット技術は、当技術分野に公知である (例えば、Buhler R. ら、Blood Coagul Fibrinolysis, 1995, 6(3): 223 ~ 232 を参照できる)。

【0114】

切断型キニノーゲンの重鎖および軽鎖の例示的な配列は以下に提供される。

> 切断型キニノーゲン - 1 重鎖
QESQSEEDCNDKDLFKAVDAALKKYNSQNQSNNQFVLYR
ITEATKTVGSDTFYSFKYEIKEGDCPVQSGKWTWQDCEYKD
AKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTA
QYDCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFM
LNEVKRAQRQVVAGLNFRIITYSIVQTNC SKENFLFLTPDC
KSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFSQNCDIYPGKDFVQ
PPTKICVGCPRDIPTNSPELEETLTHTITKLN AENNA T FY
FKIDNVKKARVQVVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTE

SCETKKLGQSLDCNAEVYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMISL
MK (配列識別番号6)

> 切断型キニノーゲン - 1 軽鎖

SSRIGEIKEETTVSPPHTSMAPAQDEERDSGKEQGHTRRH
DWGHEKQRKHNLGHGKHERDQGHGHQRGHGLGHGHEQQH
GLGHGHKFKLDDDLHQQGGHVLDHGKHKHGHGHGKHKNK
GKKNKGKHNKGWKT EHLASSSE DSTTTPSAQTQEKTEGPTPIP
SLAKPGVTVTFSDFDQSDLIATMMPPISPAPIQSDDDWIP
DIQIDP NGLS FNPI SDFPDTTSPKCPGRPWKSVSEINPTT
QMKESYYFDLTDGLS (配列識別番号7)

10

【0115】

ある例において、無傷のHMWKおよび切断型HMWKの濃度は、例えば、Simple Western (商標) Protein Simple (登録商標) ウェスタンブロット解析のようなウェスタンブロット解析によって測定される。Simple Western (商標) アッセイは、当技術分野において公知である (例えば、Rustandiら、「Qualitative and quantitative evaluation of Simon (商標), a new CE-based automated Western blot system as applied to vaccine development.」、Electrophoresis、2012、9月; 33(17): 2790~2797を参照できる)。Simple Western (商標) 製品はまた、市販されている (例えば、カリフォルニア州のSanta ClaraのProtein Simple (登録商標) を参照できる)。

20

【0116】

本明細書に記載される診断および/もしくは予後判定の方法の任意のものを実施するために、切断型HMWKの濃度を測定するための生物学的試料 (例えば、血漿試料もしくは血清試料のような体液) が対象の候補 (例えばヒトの患者の候補) より取得できる。対象は哺乳類であってよく、より好ましくはヒトであってよい。非ヒトの哺乳類は、家畜、競技用動物、ペット、霊長類、ウマ、イヌ、ネコ、マウスおよびラットを含むがそれらに限定されない。ヒトの対象は、例えばRA、CDもしくはUCのような本明細書に記載されるもののような自己免疫疾患を有する疑いのあるヒト患者であってよい。

30

【0117】

対象より取得される生物学的試料は、組織もしくは流体の試料であってよい。流体試料の例は、唾液、血液、血漿、血清および尿を含むがそれらには限定されない。ある実施態様において、対象からの生物学的試料は、例えば血液試料のような白血球を含む。生物学的試料は、例えば静脈穿刺、生検もしくはスワップのような当技術分野に公知の任意の方法を用いて取得できる。分析前に、インビトロでのHMWKの切断を阻害するためのプロテアーゼ阻害剤もしくはプロテアーゼ阻害剤カクテルを生物学的試料に添加できる。当技術分野に公知の任意のプロテアーゼ阻害剤が、本明細書に記載される方法において使用できる。

【0118】

40

切断型HMWKの濃度は、当技術分野に公知の任意の好適なアッセイによって測定できる (例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、J. Sambrookら編、Third Edition、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、ニューヨーク、2001、Current Protocols in Molecular Biology、F.M. Ausubelら編、John Wiley & Sons, Inc.、ニューヨークを参照でき、マイクロアレイ技術はMicroarray Methods and Protocols、R. Matson、CRC Press、2009、もしくはCurrent Protocols in Molecular Biology、F.M. Ausubelら編、John Wil

50

ey & Sons, Inc., ニューヨークに記載される)。

【0119】

ある実施態様において、試料中の切断型HMWKタンパク質の濃度が測定される。切断型HMWKタンパク質濃度を測定するアッセイは、イムノアッセイ(例えば、本明細書においてウェスタンブロット、免疫組織化学およびELISAアッセイのような免疫ベースのもしくはイムノベースのアッセイと呼ばれる)、質量分析、およびマルチプレックスビーズベースのアッセイを含むがそれらに限定されない。そのようなタンパク質濃度検出のためのアッセイは、当技術分野において公知である。

【0120】

ある例において、切断型HMWKの濃度は、本明細書に記載されるように、LiCor 10
検出を含み得るウェスタンブロットアッセイによって測定される。他の例において、切断型HMWKタンパク質の濃度は、切断型HMWKに特異的に結合するか、または切断型HMWKおよび非切断型HMWKに特異的に結合する抗体のような結合パートナーを含み得る、免疫組織化学アッセイによって測定される。

【0121】

タンパク質検出の結合パートナーは、当技術分野に公知の方法および本明細書に記載される方法を用いて設計され得る。ある実施態様において、例えば抗切断型HMWK抗体のような切断型HMWKタンパク質結合パートナーは、HMWKタンパク質のアミノ酸配列の一部分もしくはその全体に結合する。タンパク質の検出および定量方法の他の例は、例えば、米国特許第6,939,720号および米国特許第8,148,171号、ならび 20
に米国特許出願公開第2008/0255766号に記載されるマルチプレックスイムノアッセイ、ならびに、例えば米国特許出願公開第2009/0088329号に記載されるようなタンパク質マイクロアレイを含む。切断型HMWK濃度を検出するために切断型HMWKに対する任意の好適な結合パートナーが意図されている。ある実施態様において、結合パートナーは、HMWKタンパク質もしくは切断型HMWKタンパク質に特異的に結合する任意の分子である。そのような結合パートナーは、HMWKの切断型(例えば切断型HMWK)に対して、非切断型HMWKに対するその結合と比較してさらに高い親和性で結合することができる。ある例において、抗体のような結合パートナーは、HMWKの切断型に対してのみ結合し得る。

【0122】

本明細書に記載される方法において使用すべき抗体は、全長抗体、または、Fab、F(ab)₂、Fv、一本鎖抗体、FabおよびsFab断片、F(ab')₂、Fd断片、scFvもしくはdAb断片のような、その抗原結合断片を含むがそれらに限定されない任意の形態であってよい。抗体の作成方法は当技術分野に周知である(例えば、Sambrookら、"Molecular Cloning: A Laboratory Manual"(第二版)、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、Lewin"Genes IV", Oxford University Press、ニューヨーク(1990)およびRoittら"Immunology"(第二版)、Gower Medical Publishing、ロンドン、ニューヨーク(1989)、WO2006/040153、WO2006/1 40
22786およびWO2003/002609を参照できる。また本明細書の記載を参照できる)。

【0123】

他の実施態様において、切断型HMWKの濃度を測定するのに使用される結合パートナーは、切断型HMWKへと特異的に結合する、非抗体のペプチド分子もしくはアプタマーであってよい。ペプチド分子およびアプタマーを作成する方法はまた、当技術分野に公知である(例えば米国特許出願公開第2009/0075834号、米国特許第7435542号、米国特許第7807351号および米国特許第7239742号を参照できる)。

【0124】

候補の対象から取得された生物学的試料中の切断型HMWKの濃度が決定されると、対象が、RA、CDもしくはUCのような自己免疫疾患を有するか、それらの危険性を持つかまたはそれらを有する疑いがあるかを決定するために、それを対照の濃度と比較することができる。

【0125】

ある実施態様において、対照の濃度は、好ましくは候補の対象と同じ種である健康な対象もしくは健康な対象の集団から取得された細胞、組織もしくは流体のような対照の試料中の切断型HMWKの濃度である。本明細書において使用されるとき、健康な対象は、HMWKの濃度が測定されたときに標的の疾患（例えばRA、CDもしくはUC）を明らかに有しないか、または疾患の病歴を有しない対象である。

10

【0126】

ある実施態様において、対照の濃度は、標準的な検出方法（例えばウェスタンブロットもしくは免疫組織化学）を用いて検出不能であるか、または標準的な検出方法を用いて得られたバックグランド/ノイズレベルより低い切断型HMWKの濃度である。好ましくは、標準的な検出方法は、候補対象の試料中の切断型HMWKの濃度を測定するのに用いられたのと同じ方法である。

【0127】

対照の濃度は、既定の濃度であってもよい。そのような既定の濃度は、本明細書に記載されるような自己免疫疾患を持たないか、その危険性を持たない対象の集団における切断型HMWKの濃度を表し得る。既定の濃度は、さまざまな形態をとり得る。例えば、それは、中央値または平均値などの単一のカットオフ値とすることができる。ある実施態様において、そのような既定の濃度は、標的の自己免疫疾患（例えばRA、UCもしくはCD）を持つことが知られている一つの定義された群と標的の自己免疫疾患を持たないことが知られている他の定義された群のような比較群に基づいて設定できる。代替的に、既定の濃度は、範囲、例えば、既定のパーセンタイル内の対照集団における切断型HMWKの濃度を表す範囲であってもよい。

20

【0128】

既定の濃度は、選択された特定の集団によって決まり得る。例えば、明らかに健康である人（検出可能な疾患を持たない、またはRA、CDもしくはUCのような標的の自己免疫疾患の病歴を持たない）は、その構成員が標的の自己免疫疾患を持つかもしれないか、または寛解期であり得る集団とは異なる切断型HMWKの「正常」範囲を持つであろう。したがって、選択される既定の濃度は、対象が入るカテゴリーを考慮に入れてもよい。当業者は、単なるルーチンの実験作業で適切な範囲およびカテゴリーを選択することができる。

30

【0129】

本明細書に記載される対照の濃度は、通常の技術によって決定され得る。ある例において、対照の濃度は、本明細書に記載されるような対照の試料について従来の方法（例えば、本明細書に記載されるような試験試料中の切断型HMWKの濃度を測るのと同じアッセイ）を行うことによって得ることができる。他の例において、切断型HMWKの濃度を、対照集団の構成員から得ることができ、そして結果を、例えばコンピュータープログラムによって分析することで、対照集団における切断型HMWKの濃度を表す対照の濃度（既定の濃度）を得ることができる。

40

【0130】

候補の対象から得られる試料の切断型HMWKの濃度を、本明細書に記載される対照の濃度と比較することによって、候補の対象が、標的の自己免疫疾患を有するかまたはその危険性があるかについて決定することができる。例えば、候補の対象の切断型HMWKの濃度が対照の濃度から外れる場合（例えば対照の濃度と比べて上昇するかまたは減少する）、候補の対象は標的の自己免疫疾患を有するかもしれないか、またはその危険性があると同定され得る。

【0131】

50

本明細書で使用されるとき、「上昇した濃度、もしくは対照を超える濃度」は、切断型HMWKの濃度が、既定の閾値もしくは対照試料における切断型HMWK濃度のような対照の濃度よりも高いことを意味する。対照の濃度は、より詳細に本明細書に記載される。切断型HMWKの上昇した濃度は、例えば、対照の濃度を1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%もしくはそれ以上超える切断型HMWKの濃度を含む。切断型HMWKの上昇した濃度はまた、ゼロの状態（例えば、対照中に切断型HMWKが存在しないかもしくは検出不能）から非ゼロの状態（例えば、試料中にいくつか切断型HMWKがあるかもしくは検出可能な切断型HMWKがある）へと現象を増加させることを含む。

10

【0132】

本明細書で使用されるとき、「減少した濃度もしくは対照を下回る濃度」は、切断型HMWKの濃度が、既定の閾値もしくは対照試料における切断型HMWKの濃度のような対照の濃度よりも低いことを意味する。対照の濃度は、より詳細に本明細書に記載される。切断型HMWKの減少した濃度は、例えば、対照の濃度を1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%もしくはそれ以上下回る切断型HMWKの濃度を含む。切断型HMWKの減少した濃度はまた、ある現象が、非ゼロの状態（例えば、試料中にいくつか切断型HMWKがあるかもしくは検出可能な切断型HMWKがある）からゼロの状態（例えば、対照中に切断型HMWKが存在しないかもしくは検出不能）に減少することを含む。

20

【0133】

ある実施態様において、高濃度（例えば、少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、90%もしくは100%）の切断型HMWKが、RA候補の患者から得た生物学的試料に観察される場合、その候補は、RA炎症を有するかもしくはその危険性があると診断される。中程度の濃度（例えば約10~30%）の切断型HMWKが、UCもしくはCD候補の患者から得た生物学的試料に観察される場合、その候補は、UCもしくはCDを有するかもしくはその危険性があると診断される。

【0134】

さらに、切断型HMWKの濃度は、RA、UCおよびCDのような自己免疫疾患の進行を監視するためのバイオマーカーとして使用できる。例えば、少なくとも二つの生物学的試料（例えば血清試料もしくは血漿試料）を、RA、UCもしくはCDのような標的の自己免疫疾患を有するか、発症する危険性のあるヒトの対象より、異なる時点で取得できる。ある例において、第二の生物学的試料は、第一の生物学的試料が取得された後、少なくとも1ヶ月（例えば3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月もしくは12ヶ月）目に取得できる。切断型HMWKの濃度は少なくとも二つの生物学的試料において測定できる。切断型HMWKの濃度が、時間と共に上昇する場合（例えば、後に取得された生物学的試料における切断型HMWKの濃度が、先に取得された生物学的試料における濃度よりも、少なくとも20%、50%、70%、90%、1倍、5倍、10倍、20倍、50倍もしくは100倍高い）、対象において疾患が進行していること（例えば、対象において自己免疫疾患を発症する危険性がより高いこともしくは自己免疫疾患が悪化すること）を示す。

30

40

【0135】

その上、切断型HMWKの濃度は、例えば本明細書に記載されるもののような自己免疫疾患の治療に対する対象の応答性を判定するためのバイオマーカーとして使用できる。例えば、治療を施されているヒト患者から複数の生物学的試料を治療期間中に取得でき、そして本明細書に記載されるようなルーチン技術に従って切断型HMWKの濃度を測定できる。治療を施されているヒト患者における切断型HMWKの濃度が、治療期間にわたって、減少したままである場合（例えば、後に取得された生物学的試料中の切断型HMWKの濃度が、先に取得された生物学的試料中の濃度よりも、例えば少なくとも20%、50%、70%、80%、90%、100%、2倍、5倍、10倍、50倍もしくは100倍低

50

い場合)、ヒト患者が治療に応答性であることを示す。一方で、切断型HMWKの濃度が、治療期間にわたって実質的に同じままである場合(例えば、後に取得された生物学的試料中の切断型HMWKの濃度が、先に取得された生物学的試料中の濃度と実質的に同一であるか、またはそれと比べて20%未満、例えば15%、10%もしくは5%未満減少している場合)、ヒト患者が治療に応答性でないことを示す。

【0136】

本明細書に記載される方法のいずれかによって、対象が、自己免疫疾患(例えばRA、UCもしくはCD)を有するか、もしくはその危険性があると同定されるとき、疾患を治療するために好適な治療を実施できる。ある例において、対象は一つもしくはそれ以上の、本明細書に記載されるpKa1阻害剤によって治療され得る。対象が、本明細書に記載される任意の方法によって治療に応答性でないと決定されるとき、より高用量および/もしくは投与回数の治療(例えばpKa1阻害剤)を対象に投与することができる。代替的に、対象を、異なる治療に切り替えることができる。一方で、治療に応答性であるかまたはさらなる治療を必要としないと同定された対象では、治療剤の用量もしくは投与回数を、維持、低減もしくは停止する。

10

【0137】

II. 自己免疫疾患の治療

本明細書にはまた、糖尿病性黄斑浮腫、網膜増殖、脳外傷、急性脊髄損傷、局所性アミロイド症、乾癬、多発性硬化症、炎症性大腸炎、関節リウマチ、脈管炎、全身性エリテマトーデス腎炎などの自己免疫疾患、全身性肥満細胞症、重症熱傷、および神経因性疼痛(糖尿病性およびヘルペス後神経痛)を含むがそれらには限定されない、血漿カリクレイン(pKa1)系に関連する疾患を治療するための方法が記載される。そのような方法は、治療の必要のある対象(例えば、該疾患を有するかまたは該疾患の危険性があるヒト患者)に、有効量の一つもしくはそれ以上のカリクレイン阻害剤を好適な経路で投与することを含む。

20

【0138】

(A) 血漿カリクレイン

それに対する血漿カリクレイン結合タンパク質が開発され得る例示的な血漿カリクレインの配列は、ヒト、マウスもしくはラットの血漿カリクレインアミノ酸配列、それらの配列の一つと、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一である配列、もしくはそれらの断片、例えば以下に提供される配列の断片を含み得る。

30

【0139】

結合タンパク質の選択およびその後のスクリーニングにおいて使用したヒト血漿カリクレインの配列を、以下に示す(受託番号NP__000883.2)。使用したヒト血漿カリクレイン(86kDa)は、商用ベンダーがヒトの血漿から精製して、第XIIa因子によって活性化したものである。第XIIa因子は、単一の部位(Arg371-Ile372の間、以下の配列中で「/」で示される切断部位)においてポリペプチド配列を切断することによってプレカリクレインを活性化して、およそ52kDaの重鎖とおよそ34kDaの触媒ドメインのジスルフィド結合された2個のポリペプチドからなる活性な血漿カリクレインを産生する(ColmanおよびSchmaier(1997)“Contact System: A Vascular Biology Modulator With Anticoagulant, Profibrinolytic, Antiadhesive, and Proinflammatory Attributes”Blood, 90, 3819~3843)。

40

【0140】

ヒト、マウスおよびラットのプレカリクレインアミノ酸配列、それをコードするmRNA配列を、以下に説明する。プレカリクレインの配列は、活性な血漿カリクレイン(pKa1)が単一の位置(「/」で示される)で切断されて2個の鎖を産生する単一のポリペプチド鎖を持つことを除いて血漿カリクレインと同一である。以下に提供される配列は、

50

シグナル配列を含む完全な配列である。発現している細胞からの分泌の際、シグナル配列が除去されると予測される。

【0141】

さまざまな種由来の例示的な血漿カリクレインタンパク質は、NP__000883.2 (ヒトpKa1タンパク質)、NM__000892 (ヒトpKa1 mRNA)、NP__032481.1 (マウスpKa1タンパク質)、NM__008455.2 (マウスpKa1 mRNA)、NP__036857.2 (ラットpKa1タンパク質)およびNM__012725 (ラットpKa1 mRNA)のアクセッション番号でGeneBankにおいて見いだされ得る。

【0142】

(B)カリクレイン阻害剤

Kunitzドメイン阻害剤。組織および/もしくは血漿のカリクレインのいずれのカリクレインにも有用な多数の阻害剤が、Kunitzドメインを含む。例示的なKunitzドメイン阻害剤は、米国特許出願公開US20100183625に記載され、本明細書での参照により本明細書に組み入れられる。

【0143】

本明細書において使用されるとき、「Kunitzドメイン」は、アミノ酸少なくとも51個を持ち、少なくとも2個の、好ましくは3個のジスルフィドを含む、ポリペプチドドメインである。ドメインは、1番目と6番目のシステイン、2番目と4番目の、および3番目と5番目のシステインがジスルフィド結合を形成するように折りたたまれるか(例えば、アミノ酸58個を持つKunitzドメインにおいて、システインは、以下に提供されるBPTI相同配列の付番に従って、5、14、30、38、51および55番目のアミノ酸に対応する位置に存在することができ、そしてジスルフィドは、5番目と55番目、14番目と38番目、および30番目と51番目の位置のシステイン間で形成できる。)、または2個のジスルフィド結合が存在する場合には、それらのシステインの対応するサブセット間でジスルフィド結合を形成することができるように、折りたたまれる。それぞれのシステイン間の間隔は、以下に提供されるBPTI配列の付番に従って、5番目から55番目、14番目から38番目および30番目から51番目に対応する位置の間隔のアミノ酸7、5、4、3、2、1もしくは0個内であり得る。BPTI配列は、任意の一般的なKunitzドメイン中の具体的な位置を参照するための参照として使用できる。関心対象であるKunitzドメインとBPTIとの比較は、整列させたシステインの数が最大となる最適アラインメントを同定することによって実施される。

【0144】

BPTIのKunitzドメインの3D構造(高解像度)は公知である。X線構造の一つは、Brookhaven Protein Data Bankに「6PTI」として寄託されている。いくつかのBPTI相同体の3D構造(Eigenbrotら(1990) Protein Engineering, 3(7): 591~598; Hynesら(1990) Biochemistry, 29: 10018~10022)が公知である。少なくとも81個のKunitzドメイン配列が公知である。公知であるヒトの相同体は、組織因子経路阻害因子(TFPI)としても知られるLACIの3個のKunitzドメイン(Wunら(1988) J. Biol. Chem. 263(13): 6001~6004; Girardら(1989) Nature, 338: 518~520; Novotnyら(1989) J. Biol. Chem., 264(31): 18832~18837)、インタートリプシンヒビターの2個のKunitzドメイン、APP-I(Kidoら(1988) J. Biol. Chem., 263(34): 18104~18107)、コラーゲン由来のKunitzドメイン、TFPI-2の3個のKunitzドメイン(Sprecherら(1994) PNAS USA, 91: 3353-3357)、肝細胞増殖因子活性化因子阻害剤タイプIのKunitzドメイン、肝細胞増殖因子活性化因子阻害剤タイプIIのKunitzドメイン、米国特許公開第2004-0152633に記載されるKunitzドメインを含む。LACIは、3個のKun

10

20

30

40

50

i t zドメインを含む分子量39kDaのヒト血清ホスホグリコタンパク質である。

【0145】

上述のKunitzドメインは、LACI-K1(50~107番目の残基)、LACI-K2(121~178番目の残基)、およびLACI-K3(213~270番目の残基)と呼ばれる。LACIのcDNA配列は、Wunら(J. Biol. Chem., 1988, 263(13):6001~6004)により報告される。Girardら(Nature, 1989, 338:518~520)は3個のKunitzドメインのそれぞれのP1残基が改変された変異研究を報告する。LACI-K1は、第VIIa因子(F. VIIa)が組織因子と複合体を形成するとき、第VIIa因子(F. VIIa)を阻害し、LACI-K2は第Xa因子を阻害する。

10

【0146】

例示的なKunitzドメインを含むタンパク質は、以下を含み、SWISS-PROTアクセッション番号を括弧内に示す。

A4__HUMAN(P05067)、A4__MACFA(P53601)、A4__MACMU(P29216)、A4__MOUSE(P12023)、A4__RAT(P08592)、A4__SAISC(Q95241)、AMBP__PLEPL(P36992)、APP2__HUMAN(Q06481)、APP2__RAT(P15943)、AXP1__ANTAF(P81547)、AXP2__ANTAF(P81548)、BPT1__BOVIN(P00974)、BPT2__BOVIN(P04815)、CA17__HUMAN(Q02388)、CA36__CHICK(P15989)、CA36__HUMAN(P12111)、CRPT__BOOMI(P81162)、ELAC__MACEU(O62845)、ELAC__TRIVU(Q29143)、EPPI__HUMAN(O95925)、EPPI__MOUSE(Q9DA01)、HTIB__MANSE(P26227)、IBP__CARCR(P00993)、IBPC__BOVIN(P00976)、IBPI__TACTR(P16044)、IBPS__BOVIN(P00975)、ICS3__BOMMO(P07481)、IMAP__DROFU(P11424)、IP52__ANESU(P10280)、ISC1__BOMMO(P10831)、ISC2__BOMMO(P10832)、ISH1__STOHE(P31713)、ISH2__STOHE(P81129)、ISIK__HELPO(P00994)、ISP2__GALME(P81906)、IVB1__BUNFA(P25660)、IVB1__BUNMU(P00987)、IVB1__VIPAA(P00991)、IVB2__BUNMU(P00989)、IVB2__DABRU(P00990)、IVB2__HEMHA(P00985)、IVB2__NAJNI(P00986)、IVB3__VIPAA(P00992)、IVBB__DENPO(P00983)、IVBC__NAJNA(P19859)、IVBC__OPHHA(P82966)、IVBE__DENPO(P00984)、IVBI__DENAN(P00980)、IVBI__DENPO(P00979)、IVBK__DENAN(P00982)、IVBK__DENPO(P00981)、IVBT__ERIMA(P24541)、IVBT__NAJNA(P20229)、MCPI__MELCP(P82968)、SBPI__SARBU(P26228)、SPT3__HUMAN(P49223)、TKD1__BOVIN(Q28201)、TKD1__SHEEP(Q29428)、TXCA__DENAN(P81658)、UPTI__PIG(Q29100)、AMBP__BOVIN(P00978)、AMBP__HUMAN(P02760)、AMBP__MERUN(Q62577)、AMBP__MESAU(Q60559)、AMBP__MOUSE(Q07456)、AMBP__PIG(P04366)、AMBP__RAT(Q64240)、IATR__HORSE(P04365)、IATR__SHEEP(P13371)、SPT1__HUMAN(O43278)、SPT1__MOUSE(Q9R097)、SPT2__HUMAN(O43291)、SPT2__MOUSE(Q9WU03)、TFP2__HUMAN(P48307)、TFP2__MOUSE(O35536)、TFPI__HUMAN(P10646)、TFPI__MACMU(Q28864)、TFPI__MOUSE(O54819)、TFPI__RABIT(P19761)、TF

20

30

40

50

PI__RAT(Q02445)、YN81__CAEEL(Q03610)
【0147】

配列データベースからKunitzドメインを同定するためにさまざまな方法が使用できる。例えば、Kunitzドメインの公知のアミノ酸配列、コンセンサス配列もしくはモチーフ(例えばPrositeモチーフ)を、GenBank配列データベース(National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health、ベテスダ、MD)に対して、例えばBLASTを用いて;HMM(隠れマルコフモデル)のPfamデータベースに対して、例えばPfam検索に関するデフォルトパラメータを用いて;SMARTデータベースに対して;もしくはProDomデータベースに対して、検索できる。例えば、Pfamリリース9のPfamアクセッション番号PF00014は、数多くのKunitzドメインおよびKunitzドメイン同定のためのHMMを提供する。Pfamデータベースの説明は、Sonhammerら(1997)Proteins 28(3):405~420に見出すことができ、HMMの詳細な説明は、例えば、Grubskovら(1990)Meth. Enzymol. 183:146~159;Grubskovら(1987)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4355~4358;Kroghら(1994)J. Mol. Biol. 235:1501~1531;およびStultzら(1993)Protein Sci. 2:305~314に見出すことができる。HMMのSMARTデータベース(Simple Modular Architecture Research Tool、EMBL、ハイデルベルク、DE)は、Schultzら(1998)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5857およびSchultzら(2000)Nucl. Acids Res 28:231に記載される通りである。SMARTデータベースは、HMMer2検索プログラム(R. Durbinら(1998)Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids. Cambridge University Press)の隠れマルコフモデルによるプロファイリングによって同定されるドメインを含む。データベースはまた、アノテートされ、モニターされる。ProDomタンパク質ドメインデータベースは、相同なドメインの自動編集物からなる(Corpetら(1999)、Nucl. Acids Res. 27:263~267)。ProDomの現在のバージョンは、SWISS-PROT38およびTREMBLタンパク質データベースの再帰的PSI-BLAST検索(Altschulら(1997)Nucl. Acids Res. 25:3389~3402;Gouzyら(1999)Computers and Chemistry 23:333~340)を用いて構築される。データベースはそれぞれのドメインのコンセンサス配列を自動的に生成する。Prositeは、モチーフとしてKunitzドメインを列挙し、Kunitzドメインを含むタンパク質を同定する。例えばFalquetらNucl. Acids Res. 30:235~238(2002)を参照できる。

【0148】

Kunitzドメインは、主として2個のループ領域(「結合ループ」)中のアミノ酸を用いて目標のプロテアーゼと相互作用する。第一のループ領域は、BPTIの13~20番目のアミノ酸に対応するおよその残基の間にある。第二のループ領域は、BPTIの31~39番目のアミノ酸に対応するおよその残基の間にある。Kunitzドメインの例示的なライブラリは、第一および/もしくは第二のループ領域中の一つもしくはそれ以上のアミノ酸の位置が変化する。カリクレインと相互作用するKunitzドメインに関してスクリーニングするとき、もしくは親和性が改善された変異体に関して選択するとき、変化するのに特に有用な位置は、BPTIの配列に関して13、15、16、17、18、19、31、32、34および39番目の位置を含む。これらの位置の少なくともいくつかは、標的のプロテアーゼに近接すると予測される。同様に他の位置、例えば、三次元構造において上述の位置に隣接する位置を変化させることも有用である。

10

20

30

40

50

【0149】

Kunitzドメインの「フレームワーク領域」は、Kunitzドメインの一部であるが、第一および第二の結合ループ領域中の残基、すなわち、BPTIの13～20番目およびBPTIの31～39番目のアミノ酸に対応するおよその残基、を明確に除く残基として定義される。逆に、結合ループ中に存在しない残基は、広範囲のアミノ酸置換を許容し得る（例えば、保存的および/もしくは非保存的置換）。

【0150】

一実施態様において、これらのKunitzドメインは、ヒトリポタンパク質関連凝固阻害因子(LACI)タンパク質のKunitzドメイン1を含むループ構造の変異体である。LACIは、3個の内部の明確なペプチドループ構造を含み、これは典型的なKunitzドメインである(Girard, T.ら、1989. Nature、338:518～520)。本明細書に記載される、LACIのKunitzドメイン1の変異体は、スクリーンされ、単離されており、そして改善された親和性と特異性をもってカリクレインに結合する(例えば、米国特許第5,795,865号および米国特許第6,057,287号を参照できる)。これらの方法をまた、他のKunitzドメインフレームワークにも適用して、例えば血漿カリクレインのようなカリクレインと相互作用する他のKunitzドメインを得ることができる。カリクレインの機能の有用な調節剤は、カリクレイン結合および阻害アッセイを用いて決定した場合に、典型的にカリクレインに結合および/もしくはカリクレインを阻害する。

【0151】

血漿カリクレインを阻害するKunitzドメインを含む例示的なポリペプチドは、配列識別番号2の3～60番目のアミノ酸によって定義されるアミノ酸配列を持つかもしくは含む。血漿カリクレインを阻害するKunitzドメインを含む他の例示的なポリペプチドは、配列識別番号2のアミノ酸配列を持つかもしくは含む。

【0152】

例示的なポリペプチドは、アミノ酸配列：

Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 X
 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa1
 6 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xa
 a23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29
 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly
 Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44
 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys
 Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58
 (配列識別番号1)

を含む。

【0153】

「Xaa」は、数多くの異なるアミノ酸の任意のものであり得る、ペプチド鎖における位置をさす。第一の例において、Xaaは、システイン以外の任意のアミノ酸であり得る。他の例において、一つもしくはそれ以上の以下のものが適用される：Xaa10はAspもしくはGluであり得る；Xaa11は、Asp、Gly、Ser、Val、Asn、Ile、AlaもしくはThrであり得る；Xaa13は、Pro、Arg、His、Asn、Ser、Thr、Ala、Gly、LysもしくはGlnであり得る；Xaa15は、Arg、Lys、Ala、Ser、Gly、Met、AsnもしくはGlnであり得る；Xaa16は、Ala、Gly、Ser、AspもしくはAsnであり得る；Xaa17は、Ala、Asn、Ser、Ile、Gly、Val、Gln、もしくはThrであり得る；Xaa18は、His、Leu、GlnもしくはAlaであり得る；Xaa19は、Pro、Gln、Leu、AsnもしくはIleであり得る；Xaa21は、Trp、Phe、Tyr、HisもしくはIleであり得る；Xaa31は、Glu、Asp、Gln、Asn、Ser、Ala、Val、Leu、IleもしくはThrであり得

る；Xaa32は、Glu、Gln、Asp、Asn、Pro、Thr、Leu、Ser、Ala、GlyもしくはValであり得る；Xaa34は、Ile、Thr、Ser、Val、Ala、Asn、GlyもしくはLeuであり得る；Xaa35は、Tyr、TrpもしくはPheであり得る；Xaa39は、Glu、Gly、Ala、SerもしくはAspであり得る。アミノ酸Xaa6、Xaa7、Xaa8、Xaa9、Xaa20、Xaa24、Xaa25、Xaa26、Xaa27、Xaa28、Xaa29、Xaa41、Xaa42、Xaa44、Xaa46、Xaa47、Xaa48、Xaa49、Xaa50、Xaa52、Xaa53およびXaa54は任意のアミノ酸であり得る。

【0154】

さらに、配列識別番号1のアミノ酸の最初の4個(Xaa1、Xaa2、Xaa3、Xaa4)および最後の3個(Xaa56、Xaa57もしくはXaa58)の各々は、任意で存在してもしていなくてもよく、存在する場合には、任意のアミノ酸、例えば任意の非システインアミノ酸であり得る。

10

【0155】

一実施態様において、ポリペプチドは、以下の性質の一つもしくはそれ以上を有する配列を持つ：

Xaa11は、Asp、Gly、SerもしくはValであり得る；Xaa13は、Pro、Arg、HisもしくはAsnであり得る；Xaa15は、ArgもしくはLysであり得る；Xaa16は、AlaもしくはGlyであり得る；Xaa17は、Ala、Asn、SerもしくはIleであり得る；Xaa18は、His、LeuもしくはGlnであり得る；Xaa19は、Pro、GlnもしくはLeuであり得る；Xaa21は、TrpもしくはPheであり得る；Xaa31はGluである；Xaa32は、GluもしくはGlnであり得る；Xaa34は、Ile、ThrもしくはSerであり得る；Xaa35はTyrである；ならびにXaa39は、Glu、GlyもしくはAlaであり得る。

20

【0156】

例示的なポリペプチドは、以下のアミノ酸を含み得る：

Xaa10は、Aspである；Xaa11は、Aspである；Xaa13は、ProもしくはArgであり得る；Xaa15は、Argである；Xaa16は、AlaもしくはGlyであり得る；Xaa17は、Alaである；Xaa18は、Hisである；Xaa19は、Proである；Xaa21は、Trpである；Xaa31は、Gluである；Xaa32は、Gluである；Xaa34は、IleもしくはSerであり得る；Xaa35は、Tyrである；ならびにXaa39は、Glyである。

30

【0157】

本明細書に記載されるポリペプチドの部分を使用することもまた可能である。例えば、ポリペプチドは、特異的カリクレインエピトープの結合ドメインを含み得る。例えば、Kunitzドメインの結合ループを環化して単独で使用することができるか、または例えば他のKunitzドメインのフレームワークのような他のドメイン上に移植することができる。本明細書に記載されるアミノ酸配列のN末端から1個、2個、3個もしくは4個のアミノ酸を除去することもまた可能であり、ならびに/または本明細書に記載されるアミノ酸配列のC末端から1個、2個、3個4個もしくは5個のアミノ酸を除去することもまた可能である。

40

【0158】

配列のさらなる例は、例えば上記に提供されるアミノ酸配列のような本明細書に記載されるアミノ酸配列に対して、少なくとも1個であるが、7個、6個、5個、4個、3個もしくは2個未満のアミノ酸が異なる配列を含む。一実施態様において、3個、2個もしくは1個未満の差異は、結合ループの一つに存在する。例えば、第一の結合ループは、例えば上記に提供されるアミノ酸配列のような本明細書に記載されるアミノ酸配列に対して差異を持たないものであり得る。他の実施態様において、第一および第二の結合ループのいずれも、例えば上に提供されるアミノ酸配列のような本明細書に記載されるアミノ酸配列

50

と差異がない。

【0159】

血漿カリクレインを阻害するさらに他のポリペプチドは、配列識別番号2の3～60番目のアミノ酸のアミノ酸約58個の配列もしくは配列識別番号2のアミノ酸60個の配列を持つPEP-1ポリペプチドを含む。本明細書において使用されるとき、用語「PEP-1」および「DX-88」の両方は、配列識別番号2のアミノ酸60個の配列を指す。一実施態様において、該ポリペプチドは、アプロチニン以外であり、例えば、少なくとも1個、2個、3個、5個、10個もしくは15個のアミノ酸がアプロチニンと異なる。

【0160】

本明細書において記載されるポリペプチドは、任意の標準的なポリペプチド合成プロトコールおよび機器を用いて合成により作製できる。例えば、ポリペプチドの段階的合成は、最初の(すなわちカルボキシ末端の)アミノ酸からのアミノ(N)末端保護基の除去、およびそこへの該ポリペプチドの配列の次のアミノ酸のカルボキシル末端のカップリングによって実施できる。アミノ酸はまた、好適に保護される。生じるアミノ酸のカルボキシル基を活性化させて、カルボジイミド、対称型酸無水物、または、ヒドロキシベンゾトリアゾールもしくはペンタフルオロフェニルエステルのような「活性エステル」基の形成のような反応基の形成によって、結合アミノ基のN-末端と反応させることができる。好ましい固相ペプチド合成法は、I-アミノ保護基としてtert-ブチルオキシカルボニルを用いるBOC法、ならびにアミノ酸残基のアルファ-アミノを保護するために9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基を用いるFMOC法を含む。いずれの方法も、当業者に周知である(Stewart, J. および Young, J., Solid-Phase Peptide Synthesis (W. H. Freeman Co., サンフランシスコ1989); Merrifield, J., 1963. Am. Chem. Soc., 85: 2149~2154; Bodanszky, M. および Bodanszky, A., The Practice of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, ニューヨーク1984))。所望なら、追加のアミノ-および/もしくはカルボキシ-末端アミノ酸を、該アミノ酸配列に含むよう設計し、ポリペプチド合成の際に追加できる。

【0161】

ポリペプチドはまた、組換え技術を用いて産生できる。組換え法は、多くの細胞の任意のもの、ならびに細菌発現ベクター、酵母発現ベクター、バキュロウイルス発現ベクター、哺乳動物ウイルス発現ベクターなどを含むがそれらに限定されない対応する発現ベクターの任意のものを利用できる。本明細書に記載されるポリペプチドは、トランスジェニック動物によって、例えばトランスジェニック動物の乳腺中で産生できる。ある場合には、宿主細胞において容易に発現される融合ポリペプチドを形成するために、カリクレインを阻害するポリペプチド(例えばKunitzドメインを含むポリペプチド)をコードする配列と、発現ベクター中の他のコード配列とを融合する必要があるか、または融合することが有益であり得る。追加の配列の部分もしくは全ては、例えばプロテアーゼ消化によって除去できる。

【0162】

カリクレインを阻害するポリペプチド(例えばKunitzドメインを含むポリペプチド)を産生する例示的な組換え発現システムは、阻害剤ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列が、Saccharomyces cerevisiaeのMATプロンプターペプチド配列をコードするヌクレオチド配列と同じリーディングフレームで結合することができ、それにより機能的な酵母プロモーターの制御下となる酵母発現ベクターである。生じる組換え酵母発現プラスミドにより、適切な適合性の酵母宿主の細胞内を標準的な方法によって形質転換でき、該細胞は組換え酵母発現ベクターからの組換えタンパク質を発現することができる。好ましくは、そのような組換え発現ベクターによって形質転換される宿主酵母細胞はまた、融合タンパク質を処理して活性のある阻害剤ポリペプチドを提供できる。組換えポリペプチドを産生するための他の例示的な酵母宿主はP

10

20

30

40

50

*ichia pastoris*である。

【0163】

上述されるように、カリクレインを阻害するポリペプチドは、本明細書に記載される Kunitzドメインを含み得る。いくつかのポリペプチドは、好ましくは長さがアミノ酸 1 ~ 6 個の追加の隣接配列を、アミノおよび/もしくはカルボキシの末端に含むことができるが、ただしそのような追加のアミノ酸は、本明細書に記載される方法および組成物において使用できなくなるほど、カリクレイン結合親和性もしくはカリクレイン阻害活性を著しく減少させない。そのような追加のアミノ酸は、特定の組換え宿主細胞においてポリペプチドを発現させるために意図的に追加できるか、または、追加の機能を提供するために、例えば他の分子とのリンカーを提供するためもしくはポリペプチドの精製を促進するための親和性部分を提供するために追加できる。好ましくは、追加のアミノ酸は、Kunitzドメインのジスルフィド結合と干渉し得るシステインを含まない。

10

【0164】

例示的な Kunitzドメインポリペプチドは、配列識別番号 2 の 3 ~ 60 番目の残基のアミノ酸配列を含む。酵母融合タンパク質発現システムにおいて発現され、そしてプロセシングを受ける際に（例えば組み込む発現プラスミド pHIL-D2 に基づいて）、そのような Kunitzドメインポリペプチドは、*S. cerevisiae* の MAT-プレプロリーダーペプチド配列との融合に由来する追加のアミノ末端 Glu-Ala2 ペプチドを保持する。酵母宿主細胞から分泌される時、リーダーペプチドのほとんどが融合タンパク質からプロセシングされて、配列識別番号 2 のアミノ酸配列を持つ機能的なポリペプチド（本明細書において「PEP-1」と呼ぶ）を得る。

20

【0165】

例えば配列識別番号 1 を含む典型的な Kunitzドメインは、多くの不変の位置、例えば、BPTI の付番規定で、5、14、30、33、38、45、51 および 55 番目の位置に対応する位置はシステインである。これらの位置の間隔は、例えば、3 個のジスルフィド結合が形成されるように、Kunitzドメインの折りたたみの中で許容できる範囲で変化し得る。例えば、6、7、8、9、20、24、25、26、27、28、29、41、42、44、46、47、48、49、50、52、53 および 54 番目、または、これらの位置に対応する位置のような他の位置は、任意のアミノ酸（遺伝的にコードされて生じるものでないアミノ酸を含む）であり得る。特に好ましい実施態様において、一つもしくはそれ以上のアミノ酸は、天然の配列のものに対応する。他の実施態様において、少なくとも一つの可変の位置は、天然の配列のものとは異なる。さらに他の好ましい実施態様において、該アミノ酸はそれぞれ、保存的もしくは非保存的アミノ酸置換によって個別にもしくは集合的に置換され得る。

30

【0166】

保存的アミノ酸置換は、アミノ酸を類似の化学的性質の他のアミノ酸と置換し、そしてタンパク質の機能に影響を与えないことができる。非保存的アミノ酸置換は、アミノ酸を非類似の化学的性質の他のアミノ酸と置換する。保存的アミノ酸の例は、例えば、Asn、Gln、Arg、Lys および Ser、Thr を含む。好ましい実施態様において、これらのアミノ酸の 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、および/もしくは 2 1 個を、個別にもしくは集合的に、任意の組み合わせにおいて、配列識別番号 2 の対応する位置に対応するよう選択することができる。

40

【0167】

例えば、10、11、13、15、16、17、18、19、21、22、23、31、32、34、35、39、40、43 および 45 番目の位置、もしくはそれらの位置に対応する位置のような他の位置は、アミノ酸の選択されたセットの任意のものであり得る。例えば、配列識別番号 1 は、可能性のある配列のセットを規定する。このセットのそれぞれの構成要素は、例えば、5、14、30、51 および 55 番目の位置のシステイン、ならびに 10、11、13、15、16、17、18、19、21、22、23、31、

50

32、34、35、39、40、43および45番目の位置またはこれらの位置に対応する位置のアミノ酸の特定のセットの任意のものを含む。好ましい実施態様において、これらのアミノ酸の1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個および/もしくは19個を、個別にもしくは集合的に、任意の組み合わせにおいて、配列識別番号2の対応する位置に対応するように選択することができる。該ポリペプチドは好ましくは、配列識別番号2と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の同一性を持つ。

【0168】

2つの配列の間の配列の比較および相同性パーセントの決定は、数学アルゴリズムを用いて達成され得る。好ましい実施態様において、2個のアミノ酸配列の相同性パーセントは、B l o s s u m 6 2マトリクスもしくはP A M 2 5 0マトリクスのいずれか、ならびに16、14、12、10、8、6もしくは4のギャップ重みおよび1、2、3、4、5もしくは6の長さ重みを用いる、G C Gソフトウェアパッケージ中のG A Pプログラム中に組み込まれたアルゴリズムであるN e e d l e m a nおよびW u n s c h (1 9 7 0)、J . M o l . B i o l . 4 8 : 4 4 4 ~ 4 5 3を用いて決定される。さらに他の好ましい実施態様において、2個の核酸配列の間の相同性パーセントは、N W S g a p d n a . C M Pマトリクスならびに40、50、60、70もしくは80のギャップ重みおよび1、2、3、4、5もしくは6の長さ重みを用いる、G C Gソフトウェアパッケージ中のG A Pプログラムを用いて決定される。特に好ましいパラメータのセット(および分子が相同性の限定範囲内にあるかを決定するために、どのパラメータを適用すべきかを実施者がわからない場合に使用すべきもの)は、12のギャップペナルティ、4のギャップ伸長ペナルティおよび5のフレームシフトギャップペナルティでのB l o s s u m 6 2スコアリングマトリクスである。

【0169】

結合タンパク質阻害剤

他の実施態様において、カリクレインの阻害剤は、抗体のような結合タンパク質である。抗体のような例示的な結合タンパク質は、例えば、P C T公開WO2012/094587および米国特許出願公開US20100183625に記載され、それらはいずれも、参照によりそのすべての内容において本明細書に組み入れられる。

【0170】

一態様において、本開示は、血漿カリクレイン(例えば、ヒト血漿カリクレイン)に結合し、少なくとも一つのイムノグロブリン可変領域を含むタンパク質(例えば単離したタンパク質)を特徴とする。例えば、該タンパク質は、重鎖(HC)イムノグロブリン可変ドメイン配列および/もしくは軽鎖(LC)イムノグロブリン可変ドメイン配列を含む。該タンパク質は例えばヒト血漿カリクレインのような血漿カリクレインに結合して阻害することができる。

【0171】

該タンパク質は、一つもしくはそれ以上の以下の性質を含み得る：(a)ヒトCDRもしくはヒトフレームワーク領域、(b)本明細書に記載されるHC可変ドメインのCDRと、少なくとも85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一であるCDRを一つもしくはそれ以上(例えば1個、2個もしくは3個)含む、HCイムノグロブリン可変ドメイン配列、(c)本明細書に記載されるLC可変ドメインのCDRと、少なくとも85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一であるCDRを一つもしくはそれ以上(例えば1個、2個もしくは3個)含む、LCイムノグロブリン可変ドメイン配列、(d)本明細書に記載されるLC可変ドメイン(例えば、全体またはフレームワーク領域中もしくはCDR中)と、少なくとも85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一であるLCイムノグロブ

10

20

30

40

50

リン可変ドメイン配列、(e)本明細書に記載されるHC可変ドメイン(例えば、全体またはフレームワーク領域中もしくはCDR中)と、少なくとも85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一であるHCイムノグロブリン可変ドメイン配列、(f)本明細書に記載されるタンパク質が結合するエピトープに結合するか、または本明細書に記載されるタンパク質と結合に関して競合する、タンパク質、(g)霊長類CDRもしくは霊長類フレームワーク領域、(h)本明細書に記載されるHC可変ドメインのCDR1と少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個もしくは3個を超えるアミノ酸が異なることのないCDR1を含むHCイムノグロブリン可変ドメイン配列、(i)本明細書に記載されるHC可変ドメインのCDR2から少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個、3個、4個、5個、6個、7個もしくは8個を超えるアミノ酸が異なることのないCDR2を含むHCイムノグロブリン可変ドメイン配列、(j)本明細書に記載されるHC可変ドメインのCDR3から少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個、3個、4個、5個もしくは6個を超えるアミノ酸が異なることのないCDR3を含むHCイムノグロブリン可変ドメイン配列、(k)本明細書に記載されるLC可変ドメインのCDR1から少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個、3個、4個もしくは5個を超えるアミノ酸が異なることのないCDR1を含むLCイムノグロブリン可変ドメイン配列、(l)本明細書に記載されるLC可変ドメインのCDR2から少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個、3個もしくは4個を超えるアミノ酸が異なることのないCDR2を含むLCイムノグロブリン可変ドメイン配列、(m)本明細書に記載されるLC可変ドメインのCDR3から少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個、3個、4個もしくは5個を超えるアミノ酸が異なることのないCDR3を含むLCイムノグロブリン可変ドメイン配列、(n)本明細書に記載されるLC可変ドメイン(例えば、全体またはフレームワーク領域中もしくはCDR中)から少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個もしくは10個を超えるアミノ酸が異なることのないLCイムノグロブリン可変ドメイン配列、ならびに(o)本明細書に記載されるHC可変ドメイン(例えば、全体またはフレームワーク領域中もしくはCDR中)から少なくとも1個のアミノ酸が異なるが、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個もしくは10個を超えるアミノ酸が異なることのないHCイムノグロブリン可変ドメイン配列。

【0172】

血漿カリクレイン結合タンパク質は、単離したタンパク質(例えば他のタンパク質を少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%不含である)であってよい。血漿カリクレイン結合タンパク質は、例えばヒト血漿カリクレインのような血漿カリクレインを阻害できる。ある実施態様において、血漿カリクレインはプレカリクレイン(例えばヒトプレカリクレイン)には結合しないが、活性型の血漿カリクレイン(例えばヒト血漿カリクレイン)に結合する。

【0173】

ある実施態様において、タンパク質は、血漿カリクレインもしくはその断片の触媒ドメインの活性部位もしくはその近辺に結合するか、または血漿カリクレインの活性部位と重なるエピトープに結合する。ある態様において、該タンパク質は、本明細書に記載されるタンパク質と同じエピトープと結合するかまたは結合に関して競合する。

【0174】

ある実施態様において、該タンパク質は、M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本明細書においてDX-2922とも呼ばれる)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本明細書においてDX-2930とも呼ばれる)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09およびM35-G04と競合するかまたはそれらと同じエピトープと結合する。PCT公開WO2010/094587および

10

20

30

40

50

米国特許出願公開US 20100183625を参照できる。

【0175】

ある実施態様において、該タンパク質は血漿カリクレインの触媒三残基：His 434、Asp 483および/もしくはSer 578（付番はヒトの配列に基づく）からの一つもしくはそれ以上のアミノ酸と結合する。

【0176】

ある実施態様において、該タンパク質は、Ser 479、Tyr 563および/もしくはAsp 585の一つもしくはそれ以上に結合する（付番はヒトの配列に基づく）。

【0177】

タンパク質は例えばヒト血漿カリクレインのような血漿カリクレインと、 10^5 M^{-1} 、 10^6 M^{-1} 、 10^7 M^{-1} 、 10^8 M^{-1} 、 10^9 M^{-1} 、 10^{10} M^{-1} および 10^{11} M^{-1} の結合親和性で結合できる。ある実施態様において、該タンパク質は、ヒト血漿カリクレインと $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ もしくは $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ より遅い K_{off} で結合する。ある実施態様において、該タンパク質は血漿カリクレインに結合するが、組織カリクレインおよび/もしくは血漿プレカリクレインには結合しない（例えば、該タンパク質は、血漿カリクレインに結合するよりも低い効率で組織カリクレインおよび/もしくは血漿プレカリクレインに結合する（例えば、陰性対照と比較して5倍、10倍、50倍、100倍もしくは1000倍低い効率で結合するかまたはまったく結合しない））。

【0178】

ある実施態様において、該タンパク質はヒト血漿カリクレイン活性を、 10^{-5} M 、 10^{-6} M 、 10^{-7} M 、 10^{-8} M 、 10^{-9} M 、および 10^{-10} M より低い K_i で阻害する。該タンパク質は、例えば、100 nM、10 nMもしくは1 nMより低いIC50を持ち得る。例えば、該タンパク質は、血漿カリクレイン活性、ならびに（例えば第XII因子からの）活性化第XII因子の産生および/もしくは（例えば高分子量キニノーゲン（HMWK）からの）ブラジキニンの産生を調節できる。該タンパク質は、血漿カリクレイン活性、ならびに/または（例えば第XII因子からの）活性化第XII因子の産生および/もしくは（例えば高分子量キニノーゲン（HMWK）からの）ブラジキニンの産生を阻害できる。ヒト血漿カリクレインに対する該タンパク質の親和性は、100 nM未満、10 nM未満、もしくは1 nM未満の K_d を特徴とすることができる。ある実施態様において、該タンパク質は血漿カリクレインを阻害するが組織カリクレインを阻害しない（例えば、該タンパク質は、血漿カリクレインを阻害するよりも低い効率で組織カリクレインを阻害する（例えば、陰性対照と比較して5倍、10倍、50倍、100倍もしくは1000倍低い効率で阻害するかまたはまったく阻害しない））。

【0179】

ある実施態様において、該タンパク質は、1000 nM、500 nM、100 nMもしくは10 nM未満の見かけの阻害定数（ $K_{i,app}$ ）を持つ。

【0180】

血漿カリクレイン結合タンパク質は抗体であってよい。血漿カリクレイン結合抗体では、単一のポリペプチド中（例えばscFv）もしくは異なるポリペプチド上（例えばIgGもしくはFab）にそのHCおよびLC可変ドメイン配列が含まれ得る。

【0181】

好ましい実施態様において、該タンパク質は、M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01（本明細書においてDX-2922とも呼ばれる）、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01（本明細書においてDX-2930とも呼ばれる）、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09およびM35-G04からなる群より選択される抗体の軽鎖および/もしくは重鎖を持つ抗体（例えばヒト抗体）である。

【0182】

好ましい実施態様において、該タンパク質は、M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01（本明細書においてDX-2922とも呼ばれる）、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01（本明細書においてDX-2930とも呼ばれる）、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09およびM35-G04からなる重鎖の群の対応するCDRより選択される重鎖CDRを一つもしくはそれ以上（例えば1個、2個もしくは3個）持つ抗体（例えばヒト抗体）である。

10

【0183】

好ましい実施態様において、該タンパク質は、M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01（本明細書においてDX-2922とも呼ばれる）、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01（本明細書においてDX-2930とも呼ばれる）、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09およびM35-G04からなる軽鎖の群の対応するCDRより選択される軽鎖CDRを一つもしくはそれ以上（例えば1個、2個もしくは3個）持つ抗体（例えばヒト抗体）である。

20

【0184】

好ましい実施態様において、該タンパク質は、M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01（本明細書においてDX-2922とも呼ばれる）、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01（本明細書においてDX-2930とも呼ばれる）、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09およびM35-G04からなる軽鎖の群の対応するCDRより選択される重鎖CDRを一つもしくはそれ以上（例えば1個、2個もしくは3個）ならびに軽鎖CDRを一つもしくはそれ以上（例えば1個、2個もしくは3個）持つ抗体（例えばヒト抗体）である。

30

【0185】

ある実施態様において、HCおよびLC可変ドメイン配列は、同じポリペプチド鎖の構成要素である。他の実施態様において、HCおよびLC可変ドメイン配列は、異なるポリペプチド鎖の構成要素である。例えば、該タンパク質は、例えばIgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4のようなIgGである。該タンパク質は可溶性Fabであり得る。他の実施において、該タンパク質はFab2'、scFv、ミニボディー、scFv：Fc融合体、Fab：HSA融合体、HSA：Fab融合体、Fab：HSA：Fab融合体、もしくは、本明細書に記載される結合タンパク質の一つの抗原結合部位を含む他の分子を含む。これらのFabのVHおよびVL領域は、IgG、Fab、Fab2、Fab2'、scFv、ペグ化Fab、ペグ化scFv、ペグ化Fab2、VH：CH1：HSA+LC、HSA：VH：CH1+LC、LC：HSA+VH：CH1、HSA：LC+VH：CH1もしくは他の適切な構造として提供され得る。

40

【0186】

一実施態様において、該タンパク質は、ヒトもしくはヒト化抗体であるか、またはヒトにおいて非免疫原性である。例えば、該タンパク質は、一つもしくはそれ以上のヒト抗体フレームワーク領域、例えば全てのヒトフレームワーク領域、またはヒトフレームワーク領域と少なくとも85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一であるフレームワーク領域を含む。一実施

50

態様において、該タンパク質は、ヒトFcドメイン、またはヒトFcドメインと少なくとも95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるFcドメインを含む。

【0187】

一実施態様において、該タンパク質は霊長類もしくは霊長類化抗体であるか、またはヒトにおいて非免疫原性である。例えば、該タンパク質は、一つもしくはそれ以上の霊長類の抗体フレームワーク領域、例えば全ての霊長類のフレームワーク領域、または霊長類のフレームワーク領域と少なくとも85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一であるフレームワーク領域を含む。一実施態様において、該タンパク質は、霊長類のFcドメイン、または霊長類のFcドメインと少なくとも95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるFcドメインを含む。「霊長類」は、ヒト(Homo sapiens)、チンパンジー(Pan troglodytesおよびPan paniscus(ボノボ))、ゴリラ(Gorilla gorilla)、テナガザル、サル、キツネザル、アイアイ(Daubentonia madagascariensis)ならびにメガネザルを含む。

10

【0188】

ある実施態様において、ヒト血漿カリクレインに対する霊長類の抗体の親和性は、1000nM、500nM、100nMもしくは10nM未満、例えば10nM未満もしくは1nM未満のK_Dを特徴とする。

【0189】

一実施態様において、該タンパク質は、ヒトフレームワーク領域、またはヒトフレームワーク領域と少なくとも95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるフレームワーク領域を含む。ある実施態様において、該タンパク質は、マウスもしくはウサギ由来の配列をまったく含まない(例えば、マウスもしくはウサギの抗体ではない)。

20

【0190】

ある態様において、本開示は、血漿カリクレイン(例えばヒト血漿カリクレイン)に結合し、そして少なくとも一つのイムノグロブリン可変領域を含むタンパク質(例えば、例えば抗体のような結合タンパク質)(例えば本明細書に記載されるタンパク質)の、本明細書に記載される疾患もしくは障害を治療する方法における使用を提供する。例えば、血漿カリクレイン結合タンパク質は、重鎖(HC)イムノグロブリン可変ドメイン配列および軽鎖(LC)イムノグロブリン可変ドメイン配列を含む。多くの例示的な血漿カリクレイン結合タンパク質が本明細書に記載される。

30

【0191】

抗体は、カリクレイン標的を用いてライブラリをスクリーニングすることによって、ならびに他の方法によって発見できる。例えば、カリクレインタンパク質もしくはそれらの領域を、例えばげっ歯動物のような非ヒトの動物における抗原として利用できる。ヒト化抗体は、抗原結合に直接的に関係しないFv可変領域の配列をヒトFv可変領域由来の同等の配列と置換することによって産生できる。ヒト化抗体を産生するための一般的な方法は、Morrisson, S. L., 1985, Science 229: 1202~1207によって、Oira, 1986, BioTechniques 4: 214によって、ならびにQueenら、米国特許第5,585,089号、米国特許第5,693,761号および米国特許第5,693,762号によって提供される。それらの方法は、重鎖もしくは軽鎖の少なくとも一つからのイムノグロブリンFv可変領域のすべてもしくは部分をコードする核酸配列の単離、操作および発現を含む。そのような核酸の数多くの源が使用可能である。例えば、核酸は、上述されるような所定の標的に対する抗体を産生しているハイブリドーマから取得できる。その後、ヒト化抗体をコードする組換えDNA、もしくはその断片を、適切な発現ベクターへとクローニングできる。

40

【0192】

イムノグロブリンカリクレイン結合タンパク質(例えば、IgGもしくはFabのカリクレイン結合タンパク質)は、免疫原性を低減するために改変できる。免疫原性の低減は、治療薬としての使用を意図されているカリクレイン結合タンパク質にとって、対象が治

50

療用分子に対して免疫応答を起こす可能性を減ずるために望ましい。カリクレイン結合タンパク質の免疫原性を低減するのに有用な技術は、潜在的ヒトT細胞エピトープの除去/改変およびCDR外の配列(例えばフレームワークおよびFc)の「生殖細胞系列化(germlining)」を含む。

【0193】

カリクレイン結合抗体は、WO98/52976およびWO00/34317に開示される方法による、ヒトT細胞エピトープの特異的な除去もしくは「脱免疫化(deimmunization)」によって改変できる。要約すると、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域を、潜在的T細胞エピトープを示す(WO98/52976およびWO00/34317において定義されるように)MHCクラスIIに結合するペプチドに関して分析する、。WO98/52976およびWO00/34317に記載されるように、潜在的T細胞エピトープの検出のために「ペプチドスレッディング(threading)」と称するコンピュータモデリングアプローチを適用でき、さらに、ヒトMHCクラスII結合ペプチドのデータベースを、VHおよびVL配列中に存在するモチーフに関して検索できる。これらのモチーフは、18個の主要なMHCクラスIIDRアロタイプの任意のものに結合し、従って、潜在的T細胞エピトープを構成する。検出される潜在的T細胞エピトープは、可変領域中の少数のアミノ酸残基の置換、好ましくは単一のアミノ酸置換によって、排除され得る。可能な保存的置換がなされる限り、しばしばヒト生殖細胞系列の抗体配列中の当該位置に共通のアミノ酸を使用してもよいがこれに限定されない。ヒト生殖細胞系列の配列は、Tomlinson, I. A.ら、1992、J. Mol. Biol. 227:776~798; Cook, G. P.ら、1995、Immunol. Today Vol. 16(5) 237~242; Chothia, D.ら、1992、J. Mol. Bio. 227:799~817に開示される。VBASEディレクトリは、ヒトイムノグロブリン可変領域配列の包括的なディレクトリを提供する(MRC Centre for Protein Engineering、ケンブリッジ、英国のTomlinson, I. A.らによって編集される)。脱免疫化の変化を同定した後、VHおよびVLをコードする核酸を、変異導入もしくは他の合成方法(例えば新規合成、カセット交換など)によって構築することができる。変異導入された可変配列は、任意選択で、例えばIgG1もしくは定常領域のようなヒト定常領域へと融合できる。

【0194】

ある場合、潜在的T細胞エピトープは、抗体の機能に重要であると知られているかもしくはそうであると予測される残基を含むであろう。例えば、潜在的T細胞エピトープは、通常、CDRに対してバイアスを有する。加えて、潜在的T細胞エピトープは、抗体の構造および結合にとって重要なフレームワーク残基中に存在し得る。これらの潜在的ピトープを排除するための改変は、場合によっては、例えば改変を持つ鎖および改変を持たない鎖の作製および試験のような、より多くの精査を必要とする。可能なら、CDRと重なり合う潜在的T細胞エピトープを、CDR外での置換によって排除する。ある場合には、CDR内の改変が唯一の選択肢であり、したがって、この置換のある変異体および置換のない変異体を試験すべきである。他の場合、潜在的T細胞エピトープを除去するのに必要とされる置換が、抗体結合に重要であり得るフレームワーク内の残基位置に存在する。これらの場合には、この置換のある変異体および置換のない変異体を試験すべきである。したがって、ある場合、いくつかの変異体脱免疫化重鎖および軽鎖可変領域を設計して、最適な脱免疫化抗体を同定するために、さまざまな重鎖/軽鎖の組み合わせを試験した。最終的な脱免疫化抗体の選択は、脱免疫化の度合い、すなわち可変領域中に残された、潜在的T細胞エピトープの数と併せて、異なる変異体の結合親和性を考慮してなされる。脱免疫化は、任意の抗体、例えば、非ヒト配列を含む抗体、例えば、合成抗体、マウス抗体、他の非ヒトのモノクローナル抗体、もしくはディスプレイライブラリから単離された抗体を改変するのに利用できる。

【0195】

カリクレイン結合抗体は、フレームワーク領域中の一つもしくはそれ以上の非生殖細胞

系列のアミノ酸を、結合能が実質的に残される限り、抗体の対応する生殖系列のアミノ酸へと転換することによって「生殖細胞系列化」される。同様の方法はまた、例えばイムノグロブリン定常ドメインのような定常領域においても利用できる。

【0196】

例えば本明細書に記載される抗体のようなカリクレインに結合する抗体は、一つもしくはそれ以上の生殖細胞系列の配列により類似する抗体の可変領域を作製するために改変できる。例えば、抗体は、基準となる生殖細胞系列の配列により類似となるように、例えば、フレームワーク、CDRもしくは定常領域において、1個、2個、3個もしくはそれ以上のアミノ酸置換を含み得る。一つの例示的な生殖細胞系列化の方法は、単離した抗体の配列に類似である（例えば特定のデータベースにおいてもっとも類似である）一つもしくはそれ以上の生殖細胞系列の配列を同定することを含み得る。次に、単離した抗体において、漸増的にもしくは他の変異と組み合わせて、変異（アミノ酸レベルでの）を作製する。例えば、部分のもしくは全ての可能性のある生殖細胞系列の変異をコードする配列を含む核酸ライブラリを作製する。次に、変異させた抗体を、例えば、単離した抗体と比べて一つもしくはそれ以上の追加の生殖細胞系列の残基を持つが、それでもなお有用である（例えば機能活性を持つ）抗体を同定するために評価する。一実施態様において、可能な限り多くの生殖細胞系列の残基が単離された抗体に導入される。

10

【0197】

一実施態様において、変異導入を用いて、フレームワークおよび/もしくは定常領域において、一つもしくはそれ以上の生殖細胞系列の残基を、置換もしくは挿入する。例えば、生殖細胞系列のフレームワークおよび/もしくは定常領域の残基は、改変される非可変領域に類似する（例えば最も類似する）生殖細胞の配列由来であり得る。変異導入後、抗体の活性（例えば結合もしくは他の機能活性）を、生殖細胞系列の残基もしくは複数の残基が認容されるかどうかを判定するために評価することができる。同様の変異導入はフレームワーク領域において実施できる。

20

【0198】

生殖細胞系列配列の選別は異なる方法によって実施できる。例えば、生殖細胞系列の配列は、選択性もしくは類似性についての所定の基準、例えば少なくとも特定のパーセントの同一性、例えば少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは99.5%の同一性を満たす場合に選択できる。選別は、少なくとも2個、3個、5個もしくは10個の生殖細胞系列の配列を用いて実施できる。CDR1およびCDR2の場合、類似の生殖細胞系列の配列の同定は、1個のそのような配列の選別を含み得る。CDR3の場合、類似の生殖細胞系列の配列の同定は、1個のそのような配列の選別を含み得るが、アミノ末端部分とカルボキシ末端部分とに別々に寄与する2個の生殖細胞系列の配列を用いることを含み得る。他の実施において、例えばコンセンサス配列を形成するために、1個もしくは2個より多い生殖細胞系列の配列が使用される。

30

【0199】

一実施態様において、例えば本明細書に記載される配列のような特定の基準可変ドメイン配列に関して、関連する可変ドメイン配列は、基準CDR配列における残基と同一ではないCDRアミノ酸の位置を少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%もしくは100%持ち、ヒト生殖細胞系列の配列（すなわちヒト生殖細胞系列の核酸においてコードされるアミノ酸配列）における対応する位置の残基と同一である残基を持つ。

40

【0200】

一実施態様において、例えば本明細書に記載される配列のような特定の基準可変ドメイン配列に関して、関連する可変ドメイン配列は、例えば基準可変ドメイン配列に関連する生殖細胞系列の配列のようなヒト生殖細胞系列の配列由来のFR配列と同一のFR領域を、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%もしくは100%持つ。

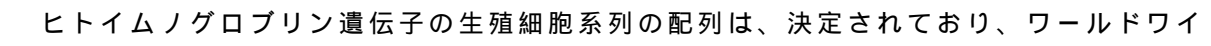
50

【0201】

したがって、関心対象の所定の抗体と類似の活性を持つが、一つもしくはそれ以上の生殖細胞系列の配列、特に一つもしくはそれ以上のヒト生殖細胞系列の配列とより類似である抗体を単離することが可能である。例えば、抗体は、CDRの外側（例えばフレームワーク領域）において、生殖細胞系列の配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは99.5%同一であり得る。さらに、抗体は、CDR領域において、改変される可変領域に類似（例えば最も類似）の生殖細胞系列の配列由来である、少なくとも1個、2個、3個、4個もしくは5個の生殖細胞系列の残基を含み得る。最も関心がある生殖細胞系列の配列はヒト生殖細胞系列の配列である。抗体の活性（例えば、 K_A によって測定される結合活性）は、元の抗体の等倍または100倍、10倍、5倍、2倍、0.5倍、0.1倍および0.001倍の範囲内であり得る。

10

【0202】

ヒトイムノグロブリン遺伝子の生殖細胞系列の配列は、決定されており、ワールドワイドウェブを通じてにおいて入手可能なinternational Immunogenetics information system（登録商標）（IMGT）、およびVBASEディレクトリ（MRC Centre for Protein Engineering、ケンブリッジ、英国のTomlinson, I.A.らによって編集され、ワールドワイドウェブを通じてvbase.mrc-cpe.cam.ac.ukにおいて入手可能である）を含む数多くの供給源より入手可能である。

20

【0203】

V_{kappa} の例示的な生殖細胞系列の基準の配列は：O12/O2、O18/O8、A20、A30、L14、L1、L15、L4/L18a、L5/L19、L8、L23、L9、L24、L11、L12、O11/O1、A17、A1、A18、A2、A19/A3、A23、A27、A11、L2/L16、L6、L20、L25、B3、B2、A26/A10およびA14を含む。例えば、Tomlinsonら、1995、EMBO J. 14(18):4628~3を参照できる。

【0204】

HC可変ドメインの生殖細胞系列基準配列は、例えばH1およびH2の超可変ループにおける1~3個の構造のような特定の標準の構造を持つ配列に基づき得る。イムノグロブリン可変ドメインの超可変ループの標準の構造は、Chothiaら、1992、J. Mol. Biol. 227:799~817; Tomlinsonら、1992、J. Mol. Biol. 227:776~798およびTomlinsonら、1995、EMBO J. 14(18):4628~38に記載されるように、その配列から推測できる。1~3個の構造を有する例示的な配列は：DP-1、DP-8、DP-12、DP-2、DP-25、DP-15、DP-7、DP-4、DP-31、DP-32、DP-33、DP-35、DP-40、7-2、hv3005、hv3005f3、DP-46、DP-47、DP-58、DP-49、DP-50、DP-51、DP-53およびDP-54を含む。

30

40

【0205】

有用なポリペプチドはまた、本明細書に記載されるポリペプチドをコードする核酸にハイブリダイズする核酸によってコードされ得る。該核酸は、中ストリンジェント、高ストリンジェント、もしくは非常に高いストリンジェントな条件においてハイブリダイズできる。本明細書において使用されるとき、用語「低ストリンジェント、中ストリンジェント、高ストリンジェントもしくは非常に高いストリンジェントな条件でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件を記載する。ハイブリダイゼーション反応を実施するためのガイダンスは、参照により組み入れられるCurrent Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、N.Y. (1989)、6.3.1~6.3.6.に見出すことができ

50

る。水性および非水性の方法がその参考文献に記載され、いずれも使用することができる。本明細書に言及される具体的なハイブリダイゼーションの条件は、以下の：(1)約45で6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中の後に、少なくとも50(低ストリンジェント条件において、洗浄温度は55まで上昇させ得る)で0.2×SSC、0.1%SDS中での2回の洗浄を行う低ストリンジェントハイブリダイゼーション条件、(2)約45で6×SSC中の後に、60での0.2×SSC、0.1%SDS中での1回もしくはそれ以上の洗浄を行う中ストリンジェントハイブリダイゼーション条件、(3)約45で6×SSC中の後に、65で0.2×SSC、0.1%SDS中での1回もしくはそれ以上の洗浄を行う高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件であり、そして(4)非常に高いストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、65で0.5Mリン酸ナトリウム、7%SDSの後に、65で0.2×SSC、1%SDS中での1回もしくはそれ以上の洗浄を行う。

10

【0206】

タンパク質産生。標準的な組換え核酸法を用いて、血漿カリクレインに結合するタンパク質を発現させることができる。一般的に、該タンパク質をコードする核酸配列は、核酸発現ベクターへとクローニングされる。当然、タンパク質が複数のポリペプチド鎖を含む場合、それぞれの鎖を、例えば同じもしくは異なるベクターのような、同じもしくは異なる細胞において発現される発現ベクターにおいてクローニングすることができる。

【0207】

抗体産生。例えばFabのようないくつかの抗体は、例えば*E. coli*の細胞のような細菌の細胞において産生できる。例えば、Fabが、ディスプレイ部分とバクテリオファージタンパク質(もしくはその断片)との間に抑制可能なストップコドンを含むファージディスプレイベクター中の配列によってコードされる場合、ベクターの核酸は、ストップコドンを抑制できない細菌細胞中に移入できる。この場合、Fabはgene IIIタンパク質とは融合せず、ペリプラズムおよび/もしくは培地に分泌される。

20

【0208】

抗体はまた、真核細胞においても産生できる。一実施態様において、抗体(例えばscFv)は、*Pichia*(例えばPowersら、2001、*J. Immunol. Methods*、251:123~35を参照)、*Hansenula*、もしくは*Saccharomyces*のような酵母細胞中で発現される。

30

【0209】

一つの好ましい実施態様において、抗体は、哺乳動物細胞において産生される。クローン抗体もしくはその抗原結合断片を発現させるための好ましい哺乳動物宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO細胞)(例えばKaufmanおよびSharp、1982、*Mol. Biol.*、159:601~621に記載されるようなDHFR選別可能マーカーと共に用いられる、UrlaubおよびChasin、1980、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、77:4216~4220に記載されるdhfr-CHO細胞を含む)、例えばNS0ミエローマ細胞およびSP2細胞のようなリンパ球細胞株、COS細胞、HEK293T細胞(*Immunol. Methods*(2004)289(1~2):65~80)、および例えばトランスジェニック哺乳動物のようなトランスジェニック動物由来の細胞を含む。例えば該細胞は乳腺上皮細胞である。

40

【0210】

多様化したイムノグロブリンドメインをコードする核酸配列に加えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列(例えば複製起点)および選別可能なマーカー遺伝子の配列のような追加の配列を有し得る。選別可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選別を促進する(例えば米国特許第4,399,216号、米国特許第4,634,665号および米国特許第5,179,017号を参照できる)。例えば、典型的に、選別可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞に、G418、ハイグロマイシンもしくはメトトレキサートのような薬剤に対す

50

る耐性を付与する。好ましい選別可能なマーカー遺伝子は、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHF R）遺伝子（メトトレキサート選別／増幅によりd h f r^r 宿主細胞中で使用する）ならびにneo遺伝子（G 4 1 8 選別のため）を含む。

【 0 2 1 1 】

抗体もしくはその抗原結合部分の組換え発現のための例示的なシステムにおいて、抗体重鎖および抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターは、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションによってd h f r^r C H O細胞に導入される。組換え発現ベクター内において、抗体重鎖および抗体軽鎖の遺伝子は、遺伝子の高レベルの転写を推進するために、エンハンサー／プロモーター調節エレメント（例えばC M Vエンハンサー／A d M L Pプロモーター調節エレメントもしくはS V 4 0エンハンサー／A d M L Pプロモーター調節エレメントのようなS V 4 0、C M V、アデノウイルスなどに由来するもの）へとそれぞれ作動可能に結合される。組換え発現ベクターはまた、メトトレキサート選別／増幅を用いてベクターがトランスフェクトされているC H O細胞の選別を可能にするためのD H F R遺伝子も有する。選別された形質転換体宿主細胞を、抗体重鎖および軽鎖の発現を可能にするよう培養して、そして完全な抗体を培地より回収する。標準的な分子生物学の技法が、組換え発現ベクターの調製、宿主細胞のトランスフェクト、形質転換体の選別、宿主細胞の培養および培養培地からの抗体の回収のために使用される。例えば、ある抗体は、プロテインAもしくはプロテインG結合マトリクスを持つアフィニティークロマトグラフィーによって単離される。

【 0 2 1 2 】

F cドメインを含む抗体において、抗体産生システムは、F c領域がグリコシル化された抗体を産生できる。例えば、I g G分子のF cドメインは、C H 2ドメインの297番目のアスパラギンにおいてグリコシル化される。このアスパラギンは、2分岐型オリゴ糖による修飾の部位である。このグリコシル化がF c g受容体と補体C 1 qとによって媒介されるエフェクター機能に必要とされることは実証されている（B u r t o nおよびW o o f、1992、A d v . I m m u n o l . 51:1~84; J e f f e r i sら、1998、I m m u n o l . R e v . 163:59~76）。一実施態様において、F cドメインは、297番目のアスパラギンに対応する残基を適切にグリコシル化する哺乳動物発現システムにおいて産生される。F cドメインはまた、他の真核細胞翻訳後修飾を含み得る。

【 0 2 1 3 】

抗体はまた、トランスジェニック動物において産生できる。例えば、米国特許第5,849,992号は、トランスジェニック哺乳動物の乳腺において抗体を発現する方法を記載する。乳汁特異的プロモーターおよび関心対象抗体をコードする核酸、ならびに分泌のためのシグナル配列を含むトランスジーンを構築する。そのようなトランスジェニック哺乳動物の雌によって産生される乳汁は、その中に分泌される関心対象抗体を含む。該抗体を乳汁より精製することができるかまたは、ある用途においては、直接使用することができる。

【 0 2 1 4 】

(C) 修飾

カリクレインを阻害するポリペプチドをさまざまな方法で修飾することが可能である。例えば、化合物を安定化するかまたは、保持時間を、例えば少なくとも2倍、4倍、5倍、8倍、10倍、15倍、20倍、50倍、100倍、500倍もしくは1000倍延長するために、ポリペプチドを一つもしくはそれ以上のポリエチレングリコール部分に結合させることができる。

【 0 2 1 5 】

一実施態様において、カリクレイン結合タンパク質を、循環中で、例えば、血液、血清、リンパ中で、もしくは他の組織においてその安定化および／もしくは保持を、例えば少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍もしくは50倍向上させる部分と物理的に結合させる。例えば、カリクレイン結合タンパク質を、ポリマー、例えばポリアルキレンオキシ

ドもしくはポリエチレンオキシドのような実質的に非抗原性のポリマーのようなポリマーに結合させることができる。好適なポリマーは、実質的に重量に応じて変動するであろう。約200から約35,000（または約1,000から約15,000および2,000から約12,500）の範囲の数平均分子量を持つポリマーを使用できる。例えば、カリクレイン結合タンパク質を、水溶性ポリマー、例えば、親水性ポリビニルポリマー、例えばポリビニルアルコールおよびポリビニルピロリドンに結合させることができる。複数のポリマー部分、例えば2,000から7,000ダルトンの平均分子量を持つ、例えば少なくとも2個、3個もしくは4個のそのような部分を、一つのポリペプチドに結合させることができる。そのようなポリマーの非限定的列挙は、ポリエチレングリコール（PEG）もしくはポリプロピレングリコールのようなポリアルキレンオキシドホモポリマー、

10

【0216】

例えば、ポリペプチドを、水溶性ポリマー、例えば、親水性ポリビニルポリマー、例えばポリビニルアルコールおよびポリビニルピロリドンに結合させることができる。そのようなポリマーの非限定的列挙は、ポリエチレングリコール（PEG）もしくはポリプロピレングリコールのようなポリアルキレンオキシドホモポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール、それらのコポリマー、およびブロックコポリマーの水溶性が維持される限り、それらのブロックコポリマーを含む。さらなる有用なポリマーは、ポリオキシエチレン、

20

【0217】

ポリオキシプロピレン、ならびにポリオキシエチレンおよびポリオキシプロピレン（Pluronics）のブロックコポリマーのようなポリオキシアルキレン；ポリメタクリレート；カルボマー；乳糖、アミロペクチン、デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、アミラーゼ、デキストラン硫酸、デキストラン、デキストリン、グリコーゲン、もしくは例えばヒアルロン酸のような酸ムコ多糖類の多糖類サブユニットのようなホモ多糖およびヘテロ多糖などの、糖単量体であるD-マンノース、D-およびL-ガラクトース、フコース、フルクトース、D-キシロース、L-アラビノース、D-グルクロン酸、シアル酸、D-ガラクトuron酸、D-マンヌロン酸（例えばポリマンヌロン酸、もしくはアルギン酸）、D-グルコサミン、D-ガラクトサミン、D-グルコースおよびノイラミン酸を含む分岐もしくは非分岐の多糖類；ポリソルビトールおよびポリマンニトールのような糖アルコールのポリマー；ヘパリンもしくはヘパランを含む。

30

【0218】

結合タンパク質の一つもしくはそれ以上のフレームワークおよび/もしくはCDRアミノ酸残基が、本明細書に記載される結合タンパク質と比べて一つもしくはそれ以上の変異（例えば置換（例えば、保存的置換もしくは非必須アミノ酸の置換）、挿入もしくは欠失）を含むことは可能である。血漿カリクレイン結合タンパク質は、本明細書に記載される結合タンパク質と比べて、変異（例えば置換（例えば、保存的置換もしくは非必須アミノ酸の置換）、挿入もしくは欠失）（例えば少なくとも1個、2個、3個、もしくは5個の、ならびに/または15個、12個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個もしくは2個未満の、変異）、例えばタンパク質の機能に実質的な影響を与えない変異を有し得る。変異はフレームワーク領域、CDRおよび/もしくは定常領域に存在し得る

40

。ある実施態様において、変異は、フレームワーク領域に存在する。ある実施態様において、変異はCDRに存在する。ある実施態様において、変異は、定常領域に存在する。特定の置換が認容されるかどうか、すなわち、結合活性のような生物学的特性に負の影響を与えないことは、例えば、変異が保存的であるか評価することによってもしくはBowleら（1990）Science 247: 1306~1310の方法によって予想できる。

50

【 0 2 1 9 】

(D) カリクレイン系に関連する自己免疫疾患の治療

本明細書に記載される p K a 1 阻害剤の一つもしくはそれ以上を、糖尿病性黄斑浮腫、網膜増殖、脳外傷、急性脊髄損傷、局所性アミロイド症、乾癬、多発性硬化症、炎症性大腸炎、関節リウマチ、脈管炎、全身性エリテマトーデス腎炎などの自己免疫疾患、全身性肥満細胞症、重症熱傷、および神経因性疼痛（糖尿病およびヘルペス後神経痛）を含むがそれらに限定されない p K a 1 系に関連する疾患の治療のために使用できる。

【 0 2 2 0 】

本明細書に記載される自己免疫疾患もしくは他の p K a 1 関連疾患を発症する危険性のある対象（例えばヒト患者）は、例えば、当該疾患の発症に関連する疾患を有する対象、当該疾患の発症に関連する環境因子に曝されている対象、当該疾患の家族の既往を持つ対象、もしくは当該疾患の発症に関連する遺伝子を持つ対象であり得る。

10

【 0 2 2 1 】

対象は、自己免疫疾患もしくは他の p K a 1 関連疾患の一つの治療を必要とするヒト（例えば疾患を有するかもしくは疾患を発症する危険性のあるヒト）または非ヒトの対象（例えば自己免疫疾患もしくは他の p K a 1 関連疾患の一つの動物モデル）であり得る。

【 0 2 2 2 】

ある実施態様において、対象は、関節リウマチ（ R A ）、クローン病（ C D ）もしくは潰瘍性大腸炎（ U C ）のような自己免疫疾患を発症する危険性のある対象（例えばヒト患者）である。自己免疫疾患は、対象自身の身体に対する異常な免疫応答によって引き起こされる疾患である。異常な免疫応答は、自己免疫疾患の型に応じて、特定の器官もしくは組織に対するものであり得る。

20

【 0 2 2 3 】

R A は、概して、手および/もしくは足の滑膜関節のような関節に影響を与える慢性炎症性疾患である。R A における炎症反応はしばしば軟骨の破壊および関節の癒合を引き起こし、機能および可動性の喪失を生じる。R A の症状は、腫脹したおよび/もしくは熱を持つ関節、こわばり、リウマチ結節、疲労、発熱、ならびに体重減少を含む。R A の例示的な治療は、理学療法、整形術、鎮痛薬、抗炎症薬、ステロイド、および疾患修飾性抗リウマチ薬（ D M A R D ）を含む。

【 0 2 2 4 】

C D は、胃腸管の任意の部分に影響を与え得る炎症性腸疾患である。症状には、腹痛、下痢、発熱、倦怠感および体重減少が含まれる。C D のための例示的な治療は、コルチコステロイド、5 - アミノサリチル酸薬、アザチオプリン、メトトレキサート、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブ、ナタリズマブ、食事の調整、および外科手術を含む。

30

【 0 2 2 5 】

U C は、概して大腸に影響を与える炎症性腸疾患である。症状は血液性下痢および/もしくは粘液含有下痢、体重減少、貧血、腹痛、ならびに直腸内出血を含む。U C の例示的な治療は、5 - アミノサリチル酸薬、コルチコステロイド、アザチオプリン、ブデソニド、インフリキシマブ、アダリムマブ、および外科手術を含む。

40

【 0 2 2 6 】

(E) 併用療法

血漿カリクレイン阻害剤は、本明細書に記載される疾患もしくは障害のために、併用療法の一部として他の治療剤と共に投与できる。

【 0 2 2 7 】

カリクレイン阻害剤と他の治療剤との併用療法は、複数の異なる形態で提供され得る。カリクレイン阻害剤が関節内注射として投与される状況において、カリクレイン阻害剤と治療剤とは単一の組成物として同時投与でき、またはそれらは別々の注射によって投与できる。ある状況において、カリクレイン阻害剤と治療剤とは、時間的に近接して（例えば、同一の治療セッションのあいだのような短い時間間隔で）投与されるか、または、併用

50

療法の2つの成分の望ましい投与スケジュールに応じて、より広い間隔をあけて投与される。カリクレイン阻害剤が、全身（経口）投与されるとき、カリクレイン阻害剤と治療剤とは、併用療法の2つの成分のための意図される投与スケジュールに応じて、時間的に近接して、もしくはより広い間隔において投与され得る。

【0228】

他の実施態様において、カリクレイン阻害剤は、自己免疫疾患に含まれる炎症の治療もしくは防御のために有用な他の化合物と併用して投与され得る。例示的な抗炎症剤は、例えば、ステロイド（例えば、コルチゾール、コルチゾン、フルドロコルチゾン、プレドニゾン、6[]-メチルプレドニゾン、トリアムシノロン、ベタメタゾンまたはデキサメタゾン）、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID（例えば、アスピリン、アセトアミノフェン、トルメチン、イブプロフェン、メフェナム酸、ピロキシカム、ナブメトン、ロフェコキシブ、セレコキシブ、エトドラクもしくはニメスリド））を含む。他の実施態様において、他の治療剤は、抗生剤（例えば、バンコマイシン、ペニシリン、アモキシシリン、アンピシリン、セフトアキシム、セフトリアキソン、セフィキシム、リファンピンメトロニダゾール、ドキシサイクリンもしくはストレプトマイシン）である。他の実施態様において、他の治療剤は、PDE4阻害剤（例えば、ロフルミラストもしくはロリプラム）である。他の実施態様において、他の治療剤は、抗ヒスタミン薬（例えばシクリジン、ヒドロキシジン、プロメタジンもしくはジフェンヒドラミン）である。

【0229】

抗炎症剤のさらなる例は、例えば、アセクロフェナク、アセメタシン、e-アセトアミドカプロン酸、アセトアミノフェン、アセトアミノサロール、アセトアニリド、アセチルサリチル酸、S-アデノシルメチオニン、アルクロフェナク、アルクロメタゾン、アルフェンタニル、アルゲストン、アシルプロジン、アルミノプロフェン、アロキシピリン、アルファプロジン、アルミニウムビス（アセチルサリチル酸）、アムシノニド、アンフェナク、アミノクロルテノキサジン、3-アミノ-4-ヒドロキシ酪酸、2-アミノ-4-ピコリン、アミノプロピロン、アミノピリン、アミキセトリン、サリチル酸アンモニウム、アムピロキシカム、アムトルメチングアシル、アニレリジン、アンチピリン、アントラフェニン、アパゾン、ベクロメタゾン、ベンダザック、ベノリラート、ベノキサプロフェン、ベンズピペリロン、ベンジダミン、ベンジルモルフィン、ベルモプロフェン、ベタメタゾン、ベタメタゾン-17-吉草酸、ベジトラミド、[]-ピサボロール、プロムフェナク、p-プロモアセトアニリド、5-プロモサリチル酸アセタート、プロモサリゲニン、ブセチン、ブクロクス酸、ブコローム、ブデソニド、ブフェキサマク、ブマジゾン、ブプレノルフィン、ブタセチン、ブチブフェン、ブトルファノール、カルバマゼピン、カルピフェン、カルプロフェン、カルサラム、クロロブタノール、クロロプレドニゾン、クロルテノキサジン、サリチル酸コリン、シンコフェン、シンメタシン、シラマドール、クリダナク、クロベタゾール、クロコルトロン、クロメタシン、クロニタゼン、クロニキシン、クロピラク、クロプレドノール、クローブ、コデイン、コデイン臭化メチル、リン酸コデイン、硫酸コデイン、コルチゾン、コルチバゾール、クロプロバミド、クロテタミドおよびシクラゾシンを含む。

【0230】

抗炎症剤のさらなる例は、デフラザコート、デヒドロテストステロン、デソモルヒネ、デソニド、デスオキシメタゾン、デキサメタゾン、デキサメタゾン-21-イソニコチン酸、デキソキサドロール、デキストロモラミド、デキストロプロボキシフェン、デオキシコルチコステロン、デゾシン、ジアムプロミド、ジアモルフォン、ジクロフェナク、ジフェナミゾール、ジフェンピラミド、ジフロラゾン、ジフルコルトロン、ジフルニサル、ジフルプレドナート、ジヒドロコデイン、ジヒドロコデインノンエノールアセタート、ジヒドロモルヒネ、ジヒドロキシアルミニウムアセチルサリチラート、ジメノキサドール、ジメフェブタノール、ジメチルチアムブテン、ジオキサフェチルブチラート、ジピパノン、ジプロセチル、ジピロン、ジタゾール、ドロキシカム、エモルファゾン、エンフェナム酸、エノキソロン、エピリゾール、エプタゾシン、エテルサラート、エテンザミド、エトヘ

10

20

30

40

50

プタジン、エトキサゼン、エチルメチルチアンブテン、エチルモルヒネ、エトドラク、エトフェナマート、エトニタゼン、オイゲノール、フェルピナク、フェンブフェン、フェンクロジン酸、フェンドザール、フェノプロフェン、フェンタニル、フェンチアザク、フェプラジノール、フェプラゾン、フロクタフェニン、フルアザコート、フルクロロニド、フルフェナム酸、フルメタゾン、フルニソリド、フルニキシム、フルノキサプロフェン、フルオシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルオシノロンアセトニド、フルオコルチンブチル、フルオコルトロン、フルオレゾン、フルオロメトロン、フルペロロン、フルビルチン、フルブレドニデン、フルブレドニゾロン、フルプロクアゾン、フルランドレノリド、フルルビプロフェン、フルチカゾン、ホルモコータルおよびフォスフォサルを含む。

【0231】

抗炎症剤のさらなる例は、ゲンチシン酸、グラフェニン、グルカメタシン、サリチル酸グリコール、グアイアズレン、ハルシノニド、ハロベタゾール、ハロメタゾン、ハロブレドノン (haloprednone)、ヘロイン、ヒドロコドン、ヒドロコルタマート、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、コハク酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾンヘミスクシナート、ヒドロコルチゾン 21-リジナート、ヒドロコルチゾンシピオナート、ヒドロモルフォン、ヒドロキシペチジン、イブフェナック、イブプロフェン、イブプロキサム、イミダゾールサリチル酸、インドメタシン、インドプロフェン、イソフェゾラック、イソフルプレドン、酢酸イソフルプレドン、イソラドール (isoladol)、イソメタドン、イソニキシム、イソキセパック、イソキシカム、ケトベミドン、ケトプロフェン、ケトロラク、p-ラクトフェネチド、レフェタミン、レバロルファン、レボルファノール、レボフェナシル-モルファン (levophenacyl-morphane)、ロフェンタニル、ロナゾラク、ロルノキシカム、ロキソプロフェン、アセチルサリチル酸リジン、マジプレドン、メクロフェナム酸、メドリゾン、メフェナム酸、メロキシカム、メベリジン、メブレドニゾン、メブタジノール、メサラミン、メタゾシン、メタドン、メトトリメプラジン、メチルブレドニゾロン、酢酸メチルブレドニゾロン、コハク酸メチルブレドニゾロンナトリウム、メチルブレドニゾロンスレプトナート (methylprednisolone suleptnate)、メチアジン酸、メトホリン、メトボン、モフェブタゾン、モフェゾラク、モメタゾン、モラゾン、モルヒネ、塩酸モルヒネ、硫酸モルヒネ、サリチル酸モルホリンおよびミロフィンを含む。

【0232】

抗炎症剤のさらなる例は、ナブメトン、ナルブフィン、ナロルフィン、サリチル酸 1-ナフチル、ナプロキセン、ナルセイン、ネフォパム、ニコモルフィン、ニフェナゾン、ニフルム酸、ニメスリド、5'-ニトロ-2'-プロボキシアセトアニリド、ノルレボルファノール、ノルメタドン、ノルモルフィン、ノルピパノン、オルサラジン、アヘン、オキサセプロール、オキサメタシン、オキサプロジン、オキシコドン、オキシモルフォン、オキシフェンブタゾン、パパベレタム、パラメタゾン、パラニリン、パルサルミド、ベントラジン、ペリソキサール、フェナセチン、フェナドキシム、フェナゾシン、フェナゾピリジン塩酸塩、フェノコール、フェノペリジン、フェノピラゾン、フェノモルファン、アセチルサリチル酸フェニル、フェニルブタゾン、サリチル酸フェニル、フェニラミドール、ピケトプロフェン、ピミノジン、ピペブゾン、ピペリロン (piperylone)、ピラゾラク (pirazolac)、ピリトラミド、ピロキシカム、ピルプロフェン、プラノプロフェン、プレドニカルパート、プレドニゾロン、プレドニゾン、プレドニバル、プレドニリデン (prednylidene)、プログルメタシン、プロヘブタジン、プロメドール、プロパセタモール、プロペリジン、プロピラム、プロボキシフェン、プロピフェナゾン、プロクアゾン、プロチジン酸、プロキサゾール、ラミフェナゾン、レミフェンタニル、リマゾリウムメチルスルファート (Rimazolium Methylsulfate)、サラセタミド (salacetamide)、サリシン、サリチルアミド、サリチルアミド-O-酢酸、サリチル酸、サリチル硫酸、サルサラート、サルベリン (salverine)、シメトリド、スフェンタニル、スルファサラジン、スリンダク、スーパーオキシドジスムターゼ、スプロフェン、スキシブゾン、タルニフルマート、テニダッ

10

20

30

40

50

ブ、テノキシカム、テロフェナマート、テトランドリン、チアゾリノブタゾン、チアプロフェン酸、チアラミド、チリジン、チノリジン、チキソコルトール (t i x o c o r t o l)、トルフェナム酸、トルメチン、トラマドール、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、トロペシン、ピミノール、キセンブシン (x e n b u c i n)、キシモプロフェン、ザルトプロフェンおよびゾメピラクを含む。

【 0 2 3 3 】

(F) 投与

患者は該してヒトであるが、非ヒトの哺乳動物であってもよい。ヒト患者は、例えば年齢 19 ~ 25、26 ~ 40、41 ~ 55、56 ~ 75 歳の間、および 76 歳ならびにそれ以上の患者のような成人、例えば年齢 0 ~ 2、3 ~ 6、7 ~ 12 および 13 ~ 18 歳の間の患者のような小児患者を含む。

10

【 0 2 3 4 】

用語「医薬的に許容可能な」組成物は、本明細書に記載されるカリクレイン阻害剤と共に患者に投与できる非毒性の担体もしくは賦形剤を指す。担体もしくは賦形剤は、組成物の生物活性もしくは薬理活性と適合するように選択される。本明細書に記載されるカリクレイン阻害剤（および、併用療法の場合には他の治療剤）は、阻害剤および/もしくは他の治療剤の阻害量を患者に送達するための、例えば静脈内および吸入のような全身的投与を含むがそれらに限定されない任意の好適な手段によって局所的にもしくは全身的に投与できる。

【 0 2 3 5 】

非経口投与する場合、カリクレイン阻害剤は、静脈内、筋肉内、腹腔内、もしくは皮下へ注射できる。皮下注射および静脈内投与は、非経口投与のための好ましい経路である。局所（関節内）注射もまた有用である。

20

【 0 2 3 6 】

典型的に、注射による投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液（例えば、リン酸ナトリウム/カリウム緩衝生理食塩水）中の溶液である。他の医薬的に許容可能な担体は、滅菌水、生理食塩水溶液および緩衝生理食塩水（リン酸塩もしくは酢酸塩のような緩衝液を含む）、アルコール、植物油、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、パラフィン等を含むがそれらに限定されない。必要なら、該組成物はまた、可溶化剤、注射部位における痛みを和らげるためのリドカインなどの局所麻酔薬、防腐剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、塩、潤滑剤等を、それらが、活性成分に有害に反応しない限り含むことができる。同様に、該組成物は、例えば、活性成分に有害に反応しない、非経口、経腸もしくは鼻腔内投与に好適な医薬的に許容可能な有機もしくは無機の担体物質のような標準的な賦形剤を含むことができる。概して、成分は、例えば、活性単位で活性剤の量を示すアンプル、小袋、もしくはバイアルなどの密封容器中の凍結乾燥粉末もしくは水を含まない濃縮物として、単位剤形において、別々でもしくは一緒に混合されてのいずれかで供給されるであろう。該組成物が点滴により投与されるとき、それは、滅菌された医薬グレードの「注射用水」もしくは生理食塩水を含む点滴ボトルによって調剤され得る。該組成物が注射によって投与されるとき、注射用水もしくは生理食塩水の容器（例えばアンプルもしくはバイアル）は、活性成分が投与前に混合できるように、供給され得る。

30

40

【 0 2 3 7 】

単離されたカリクレイン阻害剤の皮下投与のための例示的な製剤は、緩衝剤（例えばヒスチジンもしくはリン酸緩衝液）および凍結保護剤（例えば、任意選択でデキストラン 40 のようなデキストランを含むショ糖またはショ糖およびマンニトール）を含む緩衝液を含み、そして、米国特許出願公開 2007 - 0213275（2007年3月9日出願の米国特許出願番号 11 / 716, 278）に記載されるように、貯蔵および分配のために凍結乾燥され得る。

【 0 2 3 8 】

一実施態様において、カリクレイン阻害剤は、任意の承認された手順に従って、静脈内

50

注入として患者に投与される。他の実施態様において、カリクレイン阻害剤は、皮下ボラスとして患者に投与される。他の実施態様において、カリクレイン阻害剤は、関節内注射によって患者に投与される。静脈内投与および関節内投与は、典型的には、臨床の現場（例えば病院、緊急ケア、もしくは診察室）での医療専門家によって実施されるが、皮下注射は、自己投与され得るかもしくは医療専門家により投与され得る。

【0239】

全身投与のためのカリクレイン阻害剤の用量を決定するために評価され得るパラメータは、DX-88（非天然のカリクレイン阻害剤、配列識別番号2）に関連して以下に記載される。血漿中の循環するプレカリクレインの総量は、およそ500 nM～600 nMであると報告される（Silverbergら、“The Contact System and Its Disorders,” in Blood: Principles and Practice of Hematology, Handin, R.ら編集、J B Lippincott Co.、フィラデルフィア、1995）。すべてのプレカリクレインが活性化される場合、化学量論的にカリクレインを阻害するのに、約520 nmole/LのDX-88（DX88）を使用することができる。5リットルの血漿を持つ個人は、7,054ダルトンのDX-88の分子量に基づいて、2.6マイクロモル、もしくはおよそ18 mgのDX-88の用量を必要とするであろう。これは以下のように計算された。DX88の K_i は0.025 nMである。例えば1 nMの血漿カリクレイン（PK）の濃度を持つことが望まれるとき、以下の強結合阻害剤の式は、遊離のDX-88の濃度が12.0 nMであると示す。したがって、必要とされるDX-88の全量は、499 + 12もしくは511 nMとなるであろう。

【数2】

$$[DX88_{全量}] = \frac{K_{i,app}[pKal - DX88]}{[DX88_{遊離}]} + [pKal - DX88]$$

$$511nM = (0.025)(499)/(1) + (499)$$

【0240】

プレカリクレインのすべてが活性化されない場合、もしくは一部分のカリクレインが、例えばC1エステラーゼ阻害剤（C1INH）のような内在性の阻害剤によって不活性化される場合、用量を比例して低減することができる。したがって、ある実施態様において、単一用量において、もしくは24時間の期間にわたって分割された1回もしくはそれ以上の用量において、約5 mg、約10 mg、約15 mg、約20 mg、約30 mg、約40 mg、約60 mg、約80 mg、約120 mg、約250 mg、約500 mg、約600 mg、約700 mg、約800 mg、約1000 mgのDX-88を対象に投与できる。患者の年齢、体重および症状の重篤度のないいくつかの他の要素を考慮することは、実際に必要なDX-88の用量のより正確な推定を提供できる。

【0241】

ある実施態様において、カリクレイン阻害剤ポリペプチドは、約1～500 mg/m²、好ましくは約1～250 mg/m²、1～100 mg/m²の用量で投与される。

【0242】

（G）デバイス及びキット

カリクレイン阻害剤を含む医薬組成物は、医療デバイスによって投与され得る。該デバイスは、病院もしくは救急室/緊急医療施設の外部の状況で（例えば、家庭内もしくは診療室において患者によってまたは介護者によって）使用できるように、可搬性、室温保存、および使用の容易さのような特徴を備えるよう設計され得る。該デバイスは、例えば、単離されたカリクレイン阻害剤を含む医薬製剤を貯蔵するための一つもしくはそれ以上のハウジングを含み得、そして、剤もしくは複数の剤の一つもしくはそれ以上の単位用量を送達するよう構成され得る。

10

20

30

40

50

【0243】

静脈内投与は、適切な注射もしくは注入装置（例えば、カテーテル、注入ポンプ、インプラントなど）を用いてポラスもしくは注入によってなされ得る。皮下注射は、例えば、カテーテルおよび注入ポンプもしくは植え込み可能なデバイスを用いる注入としてもよい。多くの他のデバイス、インプラント、送達システム、およびモジュールもまた公知である。

【0244】

カリクレイン阻害剤が凍結乾燥粉末として分配されるとき、それは、使用前に再構成しなければならない。手作業での再構成（例えば、凍結乾燥製剤を含む容器への注入ポートを通じた注入による、凍結乾燥製剤への希釈剤の手作業での添加）も使用でき、または、

10

【0245】

単離されたカリクレイン阻害剤は、キット中に提供され得る。一実施態様において、キットは、（a）単離されたカリクレイン阻害剤を含む組成物を含む容器、ならびに（b）本明細書に記載される方法および/もしくは治療的恩典を得るための剤の使用に関連する情報資料を含み得る。

【0246】

ある実施態様において、キットはまた、別の治療剤を含む。例えば、キットは、単離されたカリクレイン阻害剤を含む組成物を含む第一の容器、および他の治療剤を含む第二の容器を含む。単離されたカリクレイン阻害剤および他の治療剤は、カリクレイン阻害剤と治療剤が単一の組成物として投与される方法において使用するために、同じ容器において供給されてもよい。

20

【0247】

キットの情報資料は、その形態において限定されない。一実施態様において、情報資料は、化合物の製造、化合物の分子量、濃度、有効期限、バッチもしくは製造場所の情報などについての情報を含み得る。一実施態様において、情報資料は、対象を治療するための、例えば、好適な用量、剤形もしくは投与の様式（例えば、本明細書に記載される用量、剤形、もしくは投与の様式）において、単離されたカリクレイン阻害剤を投与する方法に

30

【0248】

単離されたカリクレイン阻害剤（および、存在する場合には追加の治療剤）に加えて、キット中の組成物は、溶媒もしくは緩衝液、安定剤、または保存剤のような他の成分を含み得る。単離されたカリクレイン阻害剤（および存在する場合には追加の治療剤）は、好ましくは実質的に純粋および/もしくは無菌的である任意の形態、例えば、液体、乾燥もしくは凍結乾燥形態で供給され得る。剤が液体溶液で提供されるとき、該液体溶液は好ましくは水溶液である。剤が乾燥形態として提供されるとき、再構成は一般に、適切な溶媒の添加によってなされる。例えば、滅菌水または緩衝液のような溶媒を、任意選択でキット中に提供することができる。

40

【0249】

キットは、組成物もしくは剤を含む組成物のための、一つもしくはそれ以上の容器を含み得る。ある実施態様において、キットは、組成物および情報資料のために、分離した容器、仕切りもしくは区画を含む。例えば、組成物を、ボトル、バイアルもしくはシリンジ中に含めることができ、情報資料を、プラスチックのスリーブもしくはパッケージ中に含めることができる。他の実施態様において、キットの別々の要素は、単一の区切りのない容器内に含まれる。例えば、ラベルの形態での情報資料がその上に貼付されたボトル、バイアルもしくはシリンジ中に組成物が含まれる。ある実施態様において、キットは、それぞ

50

れが一つもしくはそれ以上の単位剤形（例えば本明細書に記載される剤形）を含む、複数の（例えばパック）の個別の容器を含む。容器は、組み合わせ単位用量、例えば単離されたカリクレイン阻害剤と他の治療剤との両方を、例えば所望の比率で含む単位を含み得る。例えば、キットは、例えば、それぞれが単一の組み合わせ単位用量を含む、複数のシリンジ、アンプル、ホイルパッケージ、ブリストパック、または医療デバイスを含む。キットの容器は、気密性、防水性（例えば、水分の変化もしくは蒸発に対して不透過性）および/もしくは遮光性であってよい。

【0250】

キットは任意選択で、例えばシリンジもしくは他の好適な送達デバイスのような、組成物の投与に好適なデバイスを含む。該デバイスは、該剤の一つもしくは両方をあらかじめ充填されて供給されてもよく、または充填するために好適な空であり得る。

10

（実施例）

【0251】

実施例

以下の実施例は、さらなる説明を提供するが限定するものではない。

【0252】

実施例1 切断型高分子量キニノーゲン（HMWK）と自己免疫疾患との関連

自己免疫疾患における切断型HMWKの濃度を測定するために、関節リウマチ（RA）、潰瘍性大腸炎（UC）およびクローン病（CD）の患者から、ならびに健康な対象から取得された血漿試料中の無傷のHMWKおよび切断型HMWKの量を、以下に記載されるように、Licor検出を伴うウェスタンブロットを用いて測定した。

20

【0253】

（i）試料調製

10 μ Lの10 \times 抗プロテアーゼ阻害剤カクテルを90 μ Lの100% HMWK欠損血漿に添加することによって、処置済のHMWK欠損血漿を調製した。溶液を、使用前に少なくとも30分間静置した。

【0254】

1本鎖のHMWKの1：4中間体は、15 μ Lの処置済HMWK欠損血漿に対して5 μ Lの保存溶液（1.61 mg/ml）を添加することによって調製した。2本鎖のHMWKの1：4中間体は、15 μ Lの処置済HMWK欠損血漿に対して5 μ Lの保存溶液（2.01 mg/ml）を添加することによって調製した。

30

【0255】

45 μ g/mlの処置済HMWK欠損の対照血漿溶液は、23.96 μ Lの処置済HMWK欠損血漿に対して、3.35 μ Lの1：4の1本鎖HMWK中間体と2.69 μ Lの1：4の2本鎖HMWK中間体とを添加することによって調製した。

【0256】

それぞれの試料を、5 μ Lの血漿試料を95 μ Lの1 \times TBSに添加することによって1 \times TBS中で5%血漿（1：20）となるように希釈した。非還元試料は、15 μ Lの5%試料に対して5 μ Lの4 \times 試料緩衝液を添加することによって調製した。還元試料は、13 μ Lの5%試料に対して5 μ Lの4 \times 試料緩衝液と2 μ Lの10 \times 還元剤とを添加することによって調製した。

40

【0257】

すべての試料を、ヒートブロックを用いて95 $^{\circ}$ Cで4分間加熱した。それぞれの試料を、試料チューブのキャップからいかなる溶液も除去するために短時間遠心沈降させた。

【0258】

（ii）ゲルへのローディング、泳動および転写

Tris-酢酸泳動緩衝液は、1900 mLのDI水に対して100 mLの20 \times 泳動緩衝液を添加することによって調製した。4 μ Lの容量の単色のタンパク質マーカ-を、すべてのアッセイにおいて対照として使用した。13 μ Lの容量の非還元試料および還元試料を、ゲル1のゲルのレーンに添加した。ゲルを125ボルトで \sim 2時間泳動した。

50

【0259】

iBlot Filter Paperを、DI水中に入れて、5分間浸した。Anode Stack、Bottomを開封して、銅側を下にしてiBlotのブロッキング表面上に配置した。ゲルの泳動の完了時に、2個のゲルカセットを開けて、ゲルを取り出した。ゲルを、転写用メンブレンに載せた。予め浸したろ紙をゲルの上部に載せた。Cathode Stack、Topを開封して、銅側を上にしてろ紙の上部に載せた。スタック中の気泡を、ブロッキングローラーを用いてゆっくりと押し出した。使い捨てスポンジをiBlotの蓋に配置した。iBlotのスイッチを入れて、プログラムP0を選択した。

【0260】

iBlotの転写完了時に、iBlotを開けて、スポンジ、陰極スタックおよびゲルを廃棄した。それぞれのメンブレンを個別にiBlotから取り出して、20mLのOdyssey Blocking Bufferを含むプラスチックトレイに入れた。メンブレンを、室温で1時間、プレート振とう器上でインキュベートした。

【0261】

(iii) LiCor検出を伴うウェスタンブロットアッセイ

1 μ g/mLの一次抗体溶液は、80mLのOdyssey Blocker + 0.2% Tween-20に対して、57.14 μ Lの Maus抗LC HMWK、クローン#11H05(保存液の濃度1.4mg/mL)を添加することによって調製した。ブロッキング緩衝液を、プラスチックトレイより除去した。20mLの容量の一次抗体溶液をそれぞれのトレイに添加して、メンブレンを、室温で1時間、プレート振とう器上でインキュベートした。ヤギ抗マウスIgG IRDye 680溶液は、80mLのOdyssey Blocker + 0.2% Tween-20に対して、5.33 μ Lの保存溶液を添加することによって、1:15,000希釈で調製した。一次抗体溶液をプラスチックトレイより除去した。メンブレンを20mLの1xPBS + 0.1% Tween-20によって5分間洗浄し、その後洗浄液を廃棄した。洗浄を3回繰り返して全部で4回洗浄した。20mLの容量のヤギ抗マウスIgG IRDye 680溶液をそれぞれのトレイに添加した。メンブレンおよび二次抗体溶液を光から保護するために、トレイをアルミニウムホイルで覆った。メンブレンを、室温で1時間、プレート振とう器上でインキュベートした。二次抗体溶液をプラスチックトレイから除去した。メンブレンを20mLの1xPBS + 0.1% Tween-20で5分間洗浄して、洗浄液を廃棄した。洗浄を3回繰り返して全部で4回洗浄した。メンブレンをPBSで洗浄し、LiCor Odyssey CLx上でスキャンした。メンブレンを、アルミニウムホイルで覆って、一晚乾燥させた。乾燥したメンブレンを、保護カバーシート中に入れて、後の使用のために保存した。

【0262】

(iv) 結果

45 μ g/mLの1本鎖および2本鎖のHMWKを添加した対照の処置済HMWK欠損血漿は、予想通り、120kDaおよび95kDa付近でバンドを生じた。正常ヒト血漿は、120kDaおよび100kDa付近でバンドを生じ、HMWKの21.3%が切断された。抗プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む患者の試料は、クエン酸ナトリウム中で採取した患者の試料とは劇的に異なる結果をもたらした。抗プロテアーゼ阻害剤を添加して採取した患者の試料は、還元型の2本鎖のHMWKよりも有意に多い1本鎖のHMWKを含んだ。この結果は、抗プロテアーゼ阻害剤カクテルの添加が、採取後のHMWKの切断を防ぐのに必要であることを示す。

【0263】

多数のUC、CD、RAおよびHAE患者からの血漿試料を、この試験において調べた。対照の試料および正常ヒト血漿は、予想された結果をもたらした。HAE発作時の試料は、HAEの基準試料よりも多くの切断型HMWKを含んだ。以下の表1および図1において示されるように、自己免疫疾患の患者からの試料、特に関節リウマチの試料の大部分は、46kDaのバンドのみをもたらし、切断型HMWKの濃度がRA、UCおよびCD

10

20

30

40

50

のような自己免疫疾患と関連することを示す。より詳細には、R Aの症状再燃は、大量の切断型HMWKと関連し、クローン病は、中程度の量の切断型HMWKを持つことが見出され、そして潰瘍性大腸炎は、中程度の量の切断型HMWKを持つことが見出された。

【0264】

まとめると、本試験の結果は、C D、U CおよびR Aのような自己免疫疾患の血漿における接触活性化を示す。したがって、p K a 1の阻害剤（例えば本明細書に記載されるもの）のような接触活性化を阻害する剤は、そのような疾患の治療に有効であり得る。さらに、本試験の結果は、切断型HMWKの濃度が、C D、U CおよびR Aのような自己免疫疾患を持つか、その危険性を持つ患者を同定するための信頼できるバイオマーカーとして、ならびに/または、そのような自己免疫疾患の治療の有効性を判定するためのバイオマーカーとして役立つことを示す。

【0265】

【表3】

UID	年齢	性別	投薬	診断	病期	切断型HMWK のパーセント
106659	34	男性	ペンタサ 500mg	クローン病、高コレステロール	症状再燃	3
104006	50	女性	ペンタサ 500mg	クローン病	安定	12.2
100929	59	男性	シプロフラキサシン、フラジール	クローン病	安定	32.7
118166	62	男性	チニダゾール 500mg	クローン病	安定	10.3
105772	22	女性	リアルダ	クローン病	安定	95.7
72211	53	女性	カナサ座剤、ビタミンC	潰瘍性大腸炎	安定	13.1
96319	78	男性	アサコール、カナサ、ヒドロコルチゾン、プリロセック、タイレノール、ASA、ジルチアゼム、ロラゼパム、アラインプロバイオティック、ビタミン	潰瘍性大腸炎	安定	4.4
93587	24	女性	カナサ座剤、カラファート、オメプラゾール、アサコール、レミケード	潰瘍性大腸炎	安定	100
92122	21	女性	プレドニゾン、リアルダ、レミケード、パコーセット	潰瘍性大腸炎	安定	4.9
94441	77	男性	リアルダ、プラビックス	潰瘍性大腸炎	症状再燃	16.5
147603	72	女性	エンブレル、アラバ 20mg、葉酸 1mg、アザルフィジン 500mg、シントロイド 0.175mg	関節リウマチ（症状再燃）、患者5人中4人が100%	症状再燃	100
100953	50	女性	プラケニル、メロキシカム、MTX、プレドニゾン	関節リウマチ（RA）、高血圧（HTN）、滑液包炎	症状再燃	100
72015	36	女性	メトトレキサート；葉酸；MVI；カルシウムおよびビタミンD；プレドニゾン	関節リウマチ（RA）	症状再燃	100
31567	49	女性	エンブレル；タイレノール；メドロール；プリロセック；シタロプラム；HCT；魚油；ナプロシン	関節リウマチ（RA）	症状再燃	100
33503	44	女性	シントロイド；オレンシア；プレドニゾン；アムピエン；メトトレキサート；ヒドロコドン；葉酸	関節リウマチ（RA）	症状再燃	46.2

【0266】

本願全体にわたって引用された参照文献、発行された特許、公開もしくは非公開の特許出願をならびに以下に列挙されたものを含む全ての引用された参照の内容は、本明細書に参照される目的もしくは課題について、その全ての内容について参照により本明細書によって明示的に組み入れられる。矛盾する場合、本明細書中の任意の定義を含む本出願が優先するであろう。

【0267】

10

20

30

40

50

均等物および範囲

当業者は、単なるルーチンの実験を用いて、本明細書に記載される本開示の具体的な実施態様に対する多くの均等物を、認識するかまたは確認することができるであろう。本願の開示の範囲は、上述の説明に限定されないと意図され、むしろ添付の特許請求の範囲に説明される。

【0268】

請求項において、「a」「an」および「the」のような冠詞は、文脈より明らかに反対のものもしくは他のものを示されていない限り、一つもしくは一つ以上を意味することができる。群の一つもしくはそれ以上の構成要素の間の「or」を含む請求項もしくは記載は、文脈から明らかに反対のものもしくは他のものを示されていない限り、与えられた産物もしくはプロセスにおいて、群の構成要素の一つもしくは一つ以上、または全てが、存在し、使用され、もしくはその他で関連している場合を満たされるとみなされる。本開示は、群の正確に一つの構成要素が、与えられた産物もしくはプロセスにおいて存在し、使用されもしくはその他で関連している実施態様を含む。本開示は、群の一つ以上または群の全ての構成要素が、与えられた産物もしくはプロセスにおいて存在し、使用されもしくはその他で関連している実施態様を含む。

10

【0269】

さらに、本開示は、列挙された請求項の一つもしくはそれ以上からの、一つもしくはそれ以上の限定、要素、項および記述用語が他の請求項に導入されるすべての変更、組み合わせ、および置換を包含する。例えば、他の請求項に従属する任意の請求項は、同じ基本請求項に従属する任意の他の請求項に見出される一つもしくはそれ以上の限定を含むよう修飾することができる。要素が、例えばマーカッシュ群形式での列挙として存在するとき、それぞれの要素のサブグループもまた開示され、そして任意の要素を、該群より除去できる。一般的に、本開示もしくは本開示の態様が特定の要素および/もしくは特徴を含むとして示されるとき、本開示の特定の実施態様もしくは本開示の態様は、そのような要素および/もしくは特徴からか、もしくは本質的にそれらからなるということは理解されるべきである。単純化のため、そのような実施態様は、本明細書においてこのとおりの言葉で具体的に説明されていない。用語「含む (comprising)」および「含む (containing)」は、制限がないことを意図し、さらなる要素もしくはステップを含むことを許容する。範囲が与えられるとき、端点は含まれる。さらに、文脈および当業者の理解から他が示されることもしくは他が明確である場合を除き、範囲として表される値は、文脈が明確に他を指示するのでない限り、範囲の下限の単位の10分の1までの、本開示の他の実施態様中に述べられる範囲中の任意の具体的な値もしくはサブ範囲をとることができる。

20

30

【0270】

本願はさまざまな発行された特許、公開された特許出願、雑誌記事および他の刊行物を参照し、そのすべては参照により本明細書に組み入れられる。組み入れられた参考文献の任意のものと本明細書の間で矛盾が存在する場合、本明細書が優先する。さらに、従来技術の範囲内にある本開示の任意の特定の実施態様は、請求項の任意の一つもしくはそれ以上から明確に除外され得る。そのような実施態様は当業者に公知であるとみなされるため、それらは、本明細書に除外が明確に説明されない場合でも、除外できる。本開示の任意の特定の実施態様は、従来技術の存在に関連するか否かによらず、任意の理由により任意の請求項から除外できる。

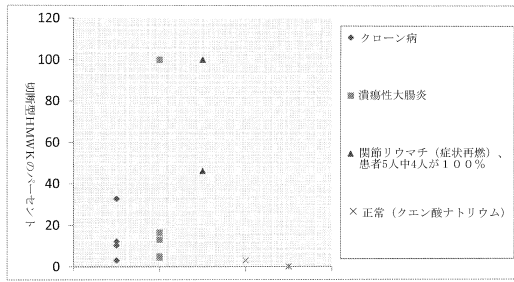
40

【0271】

当業者は、単なるルーチンの実験を用いて、本明細書に記載される具体的な実施態様の多くの均等物を理解するかもしくは確認することができるであろう。本明細書に記載される本実施態様の範囲は、上述の説明を限定しないと意図され、それはむしろ添付の特許請求の範囲に説明される。当業者は、以下の請求項に記載されるような本開示の精神もしくは範囲から離れずに、本説明に対してさまざまな変更および修正を行ってもよいことを認識するであろう。

50

【図1】



【配列表】

0006657098000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 1/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04	
C 0 7 K 16/28	(2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 14/46	(2006.01)	C 0 7 K 14/46	
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00	

- (72)発明者 セックストン, ダニエル, ジェー .
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 7 6 , メルローズ, 5 9 マーヴィン ロード
- (72)発明者 エーデルマン, バート
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ, 2 1 5 ファースト ストリート スイート 4 0 0
- (72)発明者 ニクソン, アンドリュー
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 3 3 9 , ハノーファー, 4 1 エバーグリーン レーン

審査官 磯田 真美

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 2 / 1 7 0 9 4 7 (WO , A 2)
 NIELSEN, E.W. et al. , Hereditary angio-oedema: new clinical observations and autoimmune screening, complement and kallikrein-kinin analyses , Journal of Internal Medicine , 1 9 9 6 年 , Vol. 239 , pp. 119-130
 ISORDIA-SALAS, I. et al. , The Role of Plasma High Molecular Weight Kininogen in Experimental Intestinal and Systemic Inflammation , Archives of Medical Research , 2 0 0 5 年 , Vol. 36 , pp. 87-95
 REDDIGARI, S. et al. , Cleavage of Human High-Molecular Weight Kininogen by Purified Kallikreins and Upon Contact Activation of Plasma , Blood , 1 9 8 8 年 , Vol. 71, No. 5 , pp. 1334-1340
 KHAN, M.M. et al , High-molecular-weight kininogen fragments stimulate the secretion of cytokines and chemokines through uPAR, Mac-1, and gC1qR in monocytes , Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology , 2 0 0 6 年 , Vol. 26 , pp. 2260-2266
 DEVANI, M. et al. , Kallikrein-Kinin System Activation in Crohn's Disease: Differences in Intestinal and Systemic Markers , The American Journal of Gastroenterology , 2 0 0 2 年 8 月 , Vol. 97, No. 8 , pp. 2026-2032

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

专利名称(译)	自身免疫性疾病的诊断和治疗		
公开(公告)号	JP6657098B2	公开(公告)日	2020-03-04
申请号	JP2016549205	申请日	2014-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	戴埃克斯有限公司		
申请(专利权)人(译)	模具斧公司		
当前申请(专利权)人(译)	模具斧公司		
[标]发明人	セックストーンダニエルジェー エーデルマンバート ニクソンアンドリュウ		
发明人	セックストーン,ダニエル,ジェー. エーデルマン,バート ニクソン,アンドリュウ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/02 A61K45/00 A61P43/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P19/02 A61P1/00 A61P1/04 C07K16/28 C07K14/46 C07K19/00		
CPC分类号	A61P1/00 A61P1/04 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/06 A61P43/00 G01N33/564 G01N2333/8139 G01N2800/065 G01N2800/102 G01N2800/52 G01N33/86 G01N2333/745 G01N2800/56		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/543.545.A C12Q1/02 A61K45/00 A61P43/00.111 A61P29/00.101 A61P37/06 A61P19/02 A61P1/00 A61P1/04 C07K16/28 C07K14/46 C07K19/00		
代理人(译)	Iwahori明代		
优先权	61/893542 2013-10-21 US		
其他公开文献	JP2017500584A5 JP2017500584A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于诊断和治疗自身免疫性疾病，如风湿性关节炎，克罗恩病和溃疡性结肠炎的方法，试剂盒和组合物。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6657098号 (P6657098)
(45) 発行日 令和2年3月4日(2020.3.4)		(24) 登録日 令和2年2月7日(2020.2.7)
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01) A61K 45/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)	FI G01N 33/53 ZNAD G01N 33/543 545A C12Q 1/02 A61K 45/00 A61P 43/00	請求項の数 21 (全 57 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2016-549205(P2016-549205)	(73) 特許権者 513168518 ダイアックス コーポレーション	
(86) (22) 出願日 平成26年10月17日(2014.10.17)	アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 O	
(65) 公表番号 特表2017-500584(P2017-500584A)	2421、レキシントン、300 シャイ	
(43) 公表日 平成29年1月5日(2017.1.5)	アーウェイ	
(86) 国際出願番号 PCT/US2014/061242	(74) 代理人 100114775	
(87) 国際公開番号 W02015/061182	弁理士 高岡 亮一	
(87) 国際公開日 平成27年4月30日(2015.4.30)	(74) 代理人 100121511	
審査請求日 平成29年10月16日(2017.10.16)	弁理士 小田 直	
(31) 優先権主張番号 61/893,542	(74) 代理人 100202751	
(32) 優先日 平成25年10月21日(2013.10.21)	弁理士 岩堀 明代	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	(74) 代理人 100191086	
	弁理士 高橋 香元	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患の診断と治療		