

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-513724

(P2019-513724A)

(43) 公表日 令和1年5月30日(2019.5.30)

| | | |
|-------------------------------------|----------------|-------------|
| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| C07K 14/81 (2006.01) | C07K 14/81 ZNA | 4C076 |
| C07K 19/00 (2006.01) | C07K 19/00 | 4C084 |
| C07K 16/00 (2006.01) | C07K 16/00 | 4H045 |
| C07K 1/113 (2006.01) | C07K 1/113 | |
| C07K 14/765 (2006.01) | C07K 14/765 | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く | | |

(21) 出願番号 特願2018-552059 (P2018-552059)
 (86) (22) 出願日 平成29年4月4日 (2017.4.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年11月6日 (2018.11.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/026001
 (87) 国際公開番号 W02017/176798
 (87) 国際公開日 平成29年10月12日 (2017.10.12)
 (31) 優先権主張番号 62/318,003
 (32) 優先日 平成28年4月4日 (2016.4.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507159304
 シャイアー ヒューマン ジェネティック
 セラピーズ インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ○
 2421 レキシントン シャイアー ウ
 ェイ 300
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コンジュゲートされたC1エステラーゼインヒビター及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、特に、遺伝性血管性浮腫 (HAE) を含めた補体媒介性障害の治療を改善するためのコンジュゲートされたC1-INHを提供する。一部の実施形態では、本発明により提供されるコンジュゲートされたC1-INHはPEG化C1-INHである。一部の実施形態では、本発明により提供されるコンジュゲートされたC1-INHはポリシアル酸 (PSA) コンジュゲートC1-INHである。本発明は、特に、HAEを含めた種々の補体媒介性障害を効果的に治療するのに使用可能である、改良型の長時間作用性C1エステラーゼインヒビターを提供するものである。

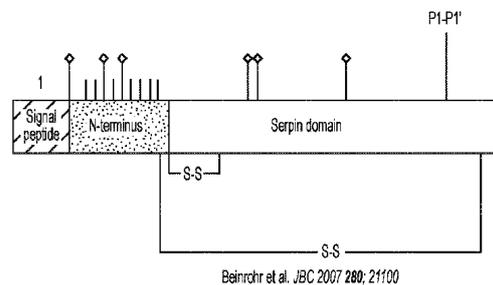


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コンジュゲートされた C 1 エステラーゼインヒビター (C 1 - I N H) を含む組成物であって、

少なくとも 1 つのグリカン残基を含む C 1 - I N H タンパク質と、

少なくとも 1 つのポリエチレングリコール (P E G) 部分と、を備え、

前記少なくとも 1 つのポリエチレングリコール (P E G) 部分が、前記少なくとも 1 つのグリカン残基に共有結合している、組成物。

【請求項 2】

コンジュゲートされた C 1 エステラーゼインヒビター (C 1 - I N H) を含む組成物であって、

少なくとも 1 つのポリエチレングリコール (P E G) 部分を含む C 1 - I N H タンパク質を備え、

前記少なくとも 1 つの P E G 部分が、オキシム結合を介して前記 C 1 - I N H タンパク質に共有結合している、組成物。

【請求項 3】

前記オキシム結合が、前記 P E G 部分と、C 1 - I N H のグリカン残基またはアミン基との間にある、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記グリカン残基がシアル酸残基またはガラクトース残基である、請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記グリカン残基がシアル酸残基である、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記 C 1 - I N H タンパク質が組換えにより生成されるか、または血漿由来である、請求項 1 から請求項 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記 C 1 - I N H タンパク質が、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 7、または配列番号 3 8 に対して少なくとも約 5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する C 1 - I N H ドメインを備える、請求項 1 から請求項 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記 C 1 - I N H タンパク質が融合タンパク質である、請求項 1 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記融合タンパク質が、C 1 - I N H ドメインに直接的または間接的に融合された F c ドメインを含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記 F c ドメインが I g G 1 に由来する、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記 F c ドメインが、E U ナンパリングの L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A に対応するアミノ酸置換を含む、請求項 8 または請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記融合タンパク質が、C 1 - I N H ドメインに直接的または間接的に融合されたアルブミンドメインを含む、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記 C 1 - I N H タンパク質が、P E G 化前に、約 5 0 % 以下、4 5 % 以下、4 0 % 以下、3 5 % 以下、3 0 % 以下、2 5 % 以下、2 0 % 以下、1 5 % 以下、1 0 % 以下、または 5 % 以下の中性グリカン種を含むグリコシル化プロファイルを有する、請求項 1 から請

10

20

30

40

50

求項 1 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 4】

前記 C 1 - I N H タンパク質が、P E G 化前に、約 5 % ~ 約 2 5 % の中性グリカン種を含むグリコシル化プロファイルを有する、請求項 1 から請求項 1 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記 C 1 - I N H タンパク質が、平均して、1 分子当たり少なくとも約 3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の荷電グリカンを含む、請求項 1 から請求項 1 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【請求項 1 6】

前記 C 1 - I N H タンパク質が、P E G 化前に、約 2 0 % 未満、1 5 % 未満、1 0 % 未満、または 5 % 未満の、マンノース、 α -ガラクトース、N G N A、またはオリゴマンノース型のグリコシル化のうちの 1 つ以上を含有する、請求項 1 から請求項 1 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 7】

前記 C 1 - I N H タンパク質が、P E G 化前に、
約 5 % ~ 約 3 0 % の中性グリカン種、
約 1 0 % ~ 約 3 0 % のモノシアリル化グリカン種、
約 3 0 % ~ 約 5 0 % のジシアリル化グリカン種、
約 1 5 % ~ 約 3 5 % のトリシアリル化グリカン種、または
約 5 % ~ 約 1 5 % のテトラシアリル化グリカン種、のうちの 1 つ以上を含むグリコシル化プロファイルを有する、請求項 1 から請求項 1 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 1 8】

前記 C 1 - I N H タンパク質が、P E G 化前に、
3 0 % 以下の中性グリカン種、
約 2 0 % ~ 約 3 0 % のモノシアリル化グリカン種、
約 3 0 % ~ 約 4 0 % のジシアリル化グリカン種、
約 1 0 % ~ 約 2 0 % のトリシアリル化グリカン種、及び
約 5 % ~ 約 1 0 % のテトラシアリル化グリカン種、を含むグリコシル化プロファイルを有する、請求項 1 から請求項 1 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【請求項 1 9】

前記 C 1 - I N H タンパク質が、平均して、1 分子当たり少なくとも約 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 1 個、1 2 個、1 3 個、1 4 個、1 5 個、1 6 個、1 7 個、1 8 個、1 9 個、2 0 個、2 1 個、2 2 個、2 3 個、2 4 個、2 5 個、2 6 個、2 7 個、2 8 個、2 9 個、3 0 個、3 1 個、3 2 個、3 3 個、3 4 個、3 5 個、3 6 個、3 7 個、3 8 個、3 9 個、または 4 0 個のシアリル化グリカン残基を含む、請求項 1 から請求項 1 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記 C 1 - I N H タンパク質が、平均して、タンパク質 1 モル当たり、少なくとも約 5 モル、6 モル、7 モル、8 モル、9 モル、1 0 モル、1 1 モル、1 2 モル、1 3 モル、1 4 モル、1 5 モル、1 6 モル、1 7 モル、1 8 モル、1 9 モル、2 0 モル、2 1 モル、2 2 モル、2 3 モル、2 4 モル、2 5 モル、2 6 モル、2 7 モル、2 8 モル、2 9 モル、3 0 モル、3 1 モル、3 2 モル、3 3 モル、3 4 モル、3 5 モル、3 6 モル、3 7 モル、3 8 モル、3 9 モル、または 4 0 モルのシアル酸を含む、請求項 1 から請求項 1 9 のいずれか 1 項に記載の組成物

40

【請求項 2 1】

前記 P E G の分子量が、約 1 K D a ~ 5 0 K D a、約 1 K D a ~ 4 0 K D a、約 5 K D a ~ 4 0 K D a、約 1 K D a ~ 3 0 K D a、約 1 K D a ~ 2 5 K D a、約 1 K D a ~ 2 0 K D a、約 1 K D a ~ 1 5 K D a、約 1 K D a ~ 1 0 K D a、または約 1 K D a ~ 5 K D

50

aである、請求項1から請求項20のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項22】

前記PEGの分子量が、約1kDa、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、または50kDaである、請求項1から請求項21のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項23】

前記コンジュゲートされたC1-INHのPEG/C1-INHの比が、約1～約25、約1～約20、約1～約15、約1～約10、または約1～約5である、請求項1から請求項22のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項24】

前記コンジュゲートされたC1-INHが、血漿由来ヒトC1-INHに匹敵するか、またはそれよりも長い半減期を有する、請求項1から請求項23のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項25】

前記コンジュゲートされたC1-INHの半減期が、血漿由来C1-INHの半減期の100%～500%の範囲内である、請求項1から請求項24のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項26】

前記コンジュゲートされたC1-INHの半減期が、少なくとも約70時間、75時間、80時間、85時間、90時間、95時間、100時間、105時間、110時間、115時間、120時間、125時間、130時間、135時間、140時間、145時間、150時間、155時間、160時間、165時間、または170時間である、請求項1から請求項25のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項27】

前記コンジュゲートされたC1-INHの半減期が、少なくとも約3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、または14日である、請求項1から請求項26のうちのいずれか1項に記載の組成物。

【請求項28】

前記コンジュゲートされたC1-INHの比活性が、血漿由来ヒトC1-INHの比活性の50%～150%の範囲内である、請求項1から請求項27のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項29】

コンジュゲートされたC1エステラーゼインヒビター(C1-INH)を生成する方法であって、

少なくとも1つのグリカン残基及び/または少なくとも1つのアミノ基を備えるC1-INHタンパク質を供給する工程と、

PEG部分を、前記PEG部分が前記少なくとも1つのグリカン残基及び/または前記少なくとも1つのアミノ基と反応して結合を形成できる条件下で供給し、それによって前記コンジュゲートされたC1-INHを生成する工程と、を含む、方法。

【請求項30】

前記PEG部分がPEG-CH₂-O-NH₂を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記少なくとも1つのグリカン残基がシアル酸残基である、請求項29または請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記少なくとも1つのグリカン残基がガラクトース残基である、請求項29から請求項31のいずれか1項に記載の方法。

【請求項33】

前記方法が、前記PEG部分と反応させる前に、前記少なくとも1つのグリカン残基を酸化させる工程をさらに含む、請求項29から請求項32のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 34】
前記酸化工程が過ヨウ素酸酸化を含む、請求項 33 に記載の方法。
- 【請求項 35】
前記過ヨウ素酸酸化が、過ヨウ素酸：C1 - INH のモル比が約 20 : 1 ~ 約 50 : 1 の間で実施される、請求項 30 に記載の方法。
- 【請求項 36】
PEG に対する過ヨウ素酸のモル比が約 2.5 ~ 約 40 の間である、請求項 35 に記載の方法。
- 【請求項 37】
PEG : C1 - INH のモル比が約 25 : 1 ~ 100 : 1 の間である、請求項 29 から請求項 36 のいずれか 1 項に記載の方法。 10
- 【請求項 38】
前記方法が、前記コンジュゲートされた C1 - INH を精製する工程をさらに含む、請求項 29 から請求項 37 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 39】
前記精製工程が、陰イオン交換、接線流ろ過、透析ろ過、及び透析のうちの 1 つ以上を含む、請求項 38 に記載の方法。
- 【請求項 40】
請求項 29 から請求項 39 のうちのいずれか 1 項に記載の方法によって生成されるコンジュゲートされた C1 エステラーゼインヒビター (C1 - INH)。 20
- 【請求項 41】
請求項 1 から請求項 28、及び請求項 40 のうちのいずれか 1 項に記載のコンジュゲートされた C1 エステラーゼインヒビター (C1 - INH) と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。
- 【請求項 42】
前記組成物が液体である、請求項 41 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 43】
前記組成物が凍結乾燥されている、請求項 41 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 44】
請求項 41 から請求項 43 のいずれかに記載の医薬組成物と、シリンジとを含むキット。 30
- 【請求項 45】
前記シリンジに、前記医薬組成物が予め担持されている、請求項 44 に記載のキット。
- 【請求項 46】
前記医薬組成物が凍結乾燥されており、前記キットが再調整用の緩衝溶液をさらに含む、請求項 44 に記載のキット。
- 【請求項 47】
補体媒介性障害を治療する方法であって、治療を必要とする対象に請求項 41 から請求項 47 のうちのいずれか 1 項に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。
- 【請求項 48】 40
前記補体媒介性障害が、遺伝性血管性浮腫、抗体関連型拒絶反応、視神経脊髄炎関連疾患、外傷性脳損傷、脊椎損傷、虚血性脳損傷、火傷、中毒性表皮壊死症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン病、脳卒中、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (CIDP)、重症筋無力症、多発性運動ニューロパチーから選択される、請求項 47 に記載の方法。
- 【請求項 49】
請求項 1 から請求項 28、及び請求項 40 のうちのいずれか 1 項に記載のコンジュゲートされた C1 エステラーゼインヒビターを含む組成物の、補体媒介性障害を治療するための薬剤の製造における使用。
- 【請求項 50】 50

前記補体媒介性障害が、遺伝性血管性浮腫、抗体関連型拒絶反応、視神経脊髄炎関連疾患、外傷性脳損傷、脊椎損傷、虚血性脳損傷、火傷、中毒性表皮壊死症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、脳卒中、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（CIDP）、重症筋無力症、及び/または多発性運動ニューロパチーから選択される、請求項49に記載の使用。

【請求項51】

コンジュゲートされたC1エステラーゼインヒビター（C1-INH）を含む組成物であって、

少なくとも1つのグリカン残基を含むC1-INHタンパク質と、

少なくとも1つのポリシアル酸（PSA）部分と、を含み、

前記少なくとも1つのポリシアル酸（PSA）部分が、前記少なくとも1つのグリカン残基に共有結合している、組成物。

10

【請求項52】

コンジュゲートされたC1エステラーゼインヒビター（C1-INH）を含む組成物であって、

少なくとも1つのグリカン残基を含むC1-INHタンパク質と、

少なくとも1つのポリシアル酸（PSA）部分と、を含み、

前記少なくとも1つのポリシアル酸（PSA）部分が、オキシム結合またはヒドラゾン結合を介して前記C1-INHタンパク質に共有結合している、組成物。

20

【請求項53】

前記少なくとも1つのポリシアル酸（PSA）部分が、オキシム結合を介して前記C1-INHタンパク質に共有結合している、請求項52に記載の組成物。

【請求項54】

前記少なくとも1つのポリシアル酸（PSA）部分が、ヒドラゾン結合を介して前記C1-INHタンパク質に共有結合している、請求項52に記載の組成物。

【請求項55】

前記オキシム結合が、前記PSA部分と、C1-INHのグリカン残基またはアミン基との間にある、請求項52に記載の組成物。

【請求項56】

前記グリカン残基がシアル酸残基である、請求項51から請求項55のいずれか1項に記載の組成物。

30

【請求項57】

前記C1-INHタンパク質が組換えにより生成されるか、または血漿由来である、請求項51から請求項56のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項58】

前記C1-INHタンパク質が、配列番号1、配列番号2、配列番号37、または配列番号38に対して少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するC1-INHドメインを備える、請求項51から請求項57のいずれか1項に記載の組成物。

40

【請求項59】

前記C1-INHタンパク質が融合タンパク質である、請求項51から請求項58のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項60】

前記融合タンパク質が、C1-INHドメインに直接的または間接的に融合されたFcドメインを含む、請求項58に記載の組成物。

【請求項61】

前記FcドメインがIgG1に由来する、請求項59に記載の組成物。

【請求項62】

前記Fcドメインが、EUナンバリングのL234A及びL235Aに対応するアミノ

50

酸置換を含む、請求項 59 または請求項 60 に記載の組成物。

【請求項 63】

前記融合タンパク質が、C1-INHドメインに直接的または間接的に融合されたアルブミンドメインを含む、請求項 59 に記載の組成物。

【請求項 64】

前記 C1-INHタンパク質が、PEG化前に、約 50% 以下、45% 以下、40% 以下、35% 以下、30% 以下、25% 以下、20% 以下、15% 以下、10% 以下、または 5% 以下の中性グリカン種を含むグリコシル化プロファイルを有する、請求項 51 から請求項 63 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 65】

前記 C1-INHタンパク質が、PEG化前に、約 5% ~ 約 25% の中性グリカン種を含むグリコシル化プロファイルを有する、請求項 51 から請求項 64 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 66】

前記 C1-INHタンパク質が、平均して、1 分子当たり少なくとも約 30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の荷電グリカンを含む、請求項 51 から請求項 65 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 67】

前記 C1-INHタンパク質が、PSA とコンジュゲートする前に、約 20% 未満、15% 未満、10% 未満、または 5% 未満の、マンノース、 α -ガラクトース、NGNA、またはオリゴマンノース型のグリコシル化のうちの一つ以上を含有する、請求項 51 から請求項 66 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 68】

前記 C1-INHタンパク質が、PSA とコンジュゲートする前に、
約 5% ~ 約 30% の中性グリカン種、
約 10% ~ 約 30% のモノシアリル化グリカン種、
約 30% ~ 約 50% のジシアリル化グリカン種、
約 15% ~ 約 35% のトリシアリル化グリカン種、または
約 5% ~ 約 15% のテトラシアリル化グリカン種、のうちの一つ以上を含むグリコシル化プロファイルを有する、請求項 51 から請求項 67 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 69】

前記 C1-INHタンパク質が、PSA とコンジュゲートする前に、
30% 以下の中性グリカン種、
約 20% ~ 約 30% のモノシアリル化グリカン種、
約 30% ~ 約 40% のジシアリル化グリカン種、
約 10% ~ 約 20% のトリシアリル化グリカン種、及び
約 5% ~ 約 10% のテトラシアリル化グリカン種、を含むグリコシル化プロファイルを有する、請求項 51 から請求項 68 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 70】

前記 C1-INHタンパク質が、平均して、1 分子当たり少なくとも約 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、21 個、22 個、23 個、24 個、25 個、26 個、27 個、28 個、29 個、30 個、31 個、32 個、33 個、34 個、35 個、36 個、37 個、38 個、39 個、または 40 個のシアリル化グリカン残基を含む、請求項 51 から請求項 69 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 71】

前記 C1-INHタンパク質が、平均して、タンパク質 1 モル当たり少なくとも約 5 モル、6 モル、7 モル、8 モル、9 モル、10 モル、11 モル、12 モル、13 モル、14 モル、15 モル、16 モル、17 モル、18 モル、19 モル、20 モル、21 モル、22

10

20

30

40

50

モル、23モル、24モル、25モル、26モル、27モル、28モル、29モル、30モル、31モル、32モル、33モル、34モル、35モル、36モル、37モル、38モル、39モル、または40モルのシアル酸を含む、請求項51から請求項69のいずれか1項に記載の組成物

【請求項72】

前記PSAの分子量が、約1kDa～50kDa、約1kDa～40kDa、約5kDa～40kDa、約1kDa～30kDa、約1kDa～25kDa、約1kDa～20kDa、約1kDa～15kDa、約1kDa～10kDa、または約1kDa～5kDaである、請求項51から請求項71のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項73】

前記PSAの分子量が、約1kDa、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、または50kDaである、請求項51から請求項72のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項74】

前記コンジュゲートされたC1-INHのPSA/C1-INHの比が、約1～約25、約1～約20、約1～約15、約1～約10、または約1～約5である、請求項51から請求項73のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項75】

前記コンジュゲートされたC1-INHが、血漿由来ヒトC1-INHに匹敵するか、またはそれよりも長い半減期を有する、請求項51から請求項73のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項76】

前記コンジュゲートされたC1-INHの半減期が、血漿由来C1-INHの半減期の100%～500%の範囲内である、請求項51から請求項73のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項77】

前記コンジュゲートされたC1-INHの半減期が、少なくとも約70時間、75時間、80時間、85時間、90時間、95時間、100時間、105時間、110時間、115時間、120時間、125時間、130時間、135時間、140時間、145時間、150時間、155時間、160時間、165時間、または170時間である、請求項51から請求項76のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項78】

前記コンジュゲートされたC1-INHの半減期が、少なくとも約3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、または14日である、請求項51から請求項76のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項79】

前記コンジュゲートされたC1-INHの比活性が、血漿由来ヒトC1-INHの比活性の50%～150%の範囲内である、請求項51から請求項76のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項80】

コンジュゲートされたC1エステラーゼインヒビター(C1-INH)を生成する方法であって、

少なくとも1つのグリカン残基及び/または少なくとも1つのアミン基を備えるC1-INHタンパク質を供給する工程と、

ポリシアル酸(PSA)部分を、前記PSA部分が前記少なくとも1つのグリカン残基及び/または前記少なくとも1つのアミン基と反応して結合を形成できる条件下で供給し、それによって前記コンジュゲートされたC1-INHを生成する工程と、を含む、方法。

【請求項81】

前記少なくとも1つのグリカン残基がシアル酸残基である、請求項80に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 8 2】
前記方法が、前記 P S A 部分と反応させる前に、前記少なくとも 1 つのグリカン残基を酸化させる工程をさらに含む、請求項 8 0 から請求項 8 1 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 8 3】
前記酸化工程が過ヨウ素酸酸化を含む、請求項 8 2 に記載の方法。
- 【請求項 8 4】
前記過ヨウ素酸酸化が、過ヨウ素酸：C 1 - I N H のモル比が約 2 0 : 1 ~ 約 5 0 : 1 の間で実施される、請求項 8 3 に記載の方法。
- 【請求項 8 5】
P S A に対する過ヨウ素酸のモル比が約 2 . 5 ~ 約 4 0 の間である、請求項 8 4 に記載の方法。 10
- 【請求項 8 6】
P S A : C 1 - I N H のモル比が約 2 5 : 1 ~ 1 0 0 : 1 の間である、請求項 8 0 から請求項 8 5 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 8 7】
前記方法が、前記コンジュゲートされた C 1 - I N H を精製する工程をさらに含む、請求項 8 0 から請求項 8 6 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 8 8】
前記精製工程が、陰イオン交換、接線ろ過、透析ろ過、及び透析のうちの 1 つ以上を含む、請求項 8 7 に記載の方法。 20
- 【請求項 8 9】
請求項 7 8 から請求項 8 6 のうちのいずれか 1 項に記載の方法によって生成されるコンジュゲートされた C 1 エステラーゼインヒビター (C 1 - I N H) 。
- 【請求項 9 0】
請求項 5 1 から請求項 7 9、及び請求項 8 9 のうちのいずれか 1 項に記載のコンジュゲートされた C 1 エステラーゼインヒビター (C 1 - I N H) と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。
- 【請求項 9 1】
前記組成物が液体である、請求項 9 0 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 9 2】
前記組成物が凍結乾燥されている、請求項 9 0 に記載の医薬組成物。 30
- 【請求項 9 3】
請求項 9 0 から請求項 9 2 のいずれかに記載の医薬組成物と、シリンジとを含む、キット。
- 【請求項 9 4】
前記シリンジに前記医薬組成物が予め担持されている、請求項 9 3 に記載のキット。
- 【請求項 9 5】
前記医薬組成物が凍結乾燥されており、前記キットが再調整用の緩衝溶液をさらに含む、請求項 9 3 に記載のキット。
- 【請求項 9 6】
補体媒介性障害を治療する方法であって、治療を必要とする対象に請求項 9 0 から請求項 9 2 のうちのいずれか 1 項に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。 40
- 【請求項 9 7】
前記補体媒介性障害が、遺伝性血管性浮腫、抗体関連型拒絶反応、視神経脊髄炎関連疾患、外傷性脳損傷、脊椎損傷、虚血性脳損傷、火傷、中毒性表皮壊死症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症 (A L S)、パーキンソン病、脳卒中、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (C I D P)、重症筋無力症、多巣性運動ニューロパチーから選択される、請求項 9 6 に記載の方法。
- 【請求項 9 8】
請求項 5 1 から請求項 7 9、及び請求項 8 9 のうちのいずれか 1 項に記載のコンジュゲ 50

ートされたC1エステラーゼインヒビターを含む組成物の、補体媒介性障害を治療するための薬剤の製造における使用。

【請求項99】

前記補体媒介性障害が、遺伝性血管性浮腫、抗体関連型拒絶反応、視神経脊髄炎関連疾患、外傷性脳損傷、脊椎損傷、虚血性脳損傷、火傷、中毒性表皮壊死症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、脳卒中、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（CIDP）、重症筋無力症、及び/または多巣性運動ニューロパチーから選択される、請求項98に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願

本出願は、2016年4月4日に出願された米国仮出願第62/318,003号に対する優先権及びその利益を主張するものであり、該仮出願の内容は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

C1-インヒビター（C1-INH）は、C1エステラーゼインヒビターとしても知られ、セルピタンパク質スーパーファミリーの最も大きなメンバーである。これは重度にグリコシル化されたセリンプロテイナーゼインヒビターであり、その主な機能は、補体系の自発的活性化を阻害することである。C1-INHは、補体カスケード系を調節し、接触（カリクレイン・キニン）増幅カスケードの調節に重要な役割を果たし、凝固系及び線溶系の調節に関与している。Karnaukhova, E., C1-Esterase Inhibitor: Biological Activities and Therapeutic Applications. J Hematol Thromb Dis, 1:113 (2013)を参照されたい。

20

【0003】

対象におけるC1-INHの機能不全及び/または欠損は、C1-INHが補体系の活性化を阻害できなくなることから、種々の自己免疫性疾患と関連付けられてきた。こうした疾患の一例は、遺伝性血管性浮腫（HAE）であり、これは、予測不可能な反復性の炎症発作によって特徴付けられる稀な障害だが場合によっては生命を脅かす障害である。HAE発作の症状として、顔面、口、及び/または気道の腫脹が挙げられ、これらは自然発症的に生じるか、または軽度の外傷によって誘発される。こうした腫脹は、身体の任意の部分にも生じ得る。HAEは、C1-インヒビターの血漿レベルが低いことに関連している場合がある一方で、そのタンパク質が正常または基準以上の量で循環しているが機能不全となっている場合もある。炎症の発症に加えて、自己免疫性疾患または紅斑性狼瘡などのさらに重篤であるか、または生命を脅かす症候を引き起こす可能性もある。

30

【0004】

CINRYZE（登録商標）は、ヒト血漿由来C1エステラーゼインヒビターであり、HAEの急性発作の予防的使用及び治療用に承認されている。ペリナート（登録商標）（同じく血漿由来ヒトC1-INH、CSLベーリング社）は、急性HAE発作の治療に適応している。ルコネスト（登録商標）（コネスタットアルファ、Pharming N.V.社）は、改変ウサギで発現した組換えC1-INHであり、急性HAE発作の治療にIV投与用として必要とされるものである。ルコネスト（登録商標）は、ヒト血漿由来のC1-INHと同一のアミノ酸配列を有するが、トランスジェニックウサギで作製される。ルコネストは約2.4時間～2.7時間という極めて短い半減期を有する。ルコネスト（登録商標）FDAラベル及び処方情報を参照されたい。

40

そこで、種々のC1エステラーゼ媒介性症候の治療及び予防に適する改良型のC1エステラーゼインヒビターが依然として必要となっている。

【先行技術文献】

50

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Karnaukhova, E., C1-Esterase Inhibitor: Biological Activities and Therapeutic Applications. J Hematol Thromb Dis, 1: 113 (2013)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、特に、HAEを含めた種々の補体媒介性障害を効果的に治療するのに使用可能である、改良型の長時間作用性C1エステラーゼインヒビターを提供するものである。

10

【0007】

詳細には、本発明は、血漿由来C1-INHに匹敵するか、またはそれよりも長い半減期を呈示するC1エステラーゼインヒビター-コンジュゲート(「コンジュゲートされたC1エステラーゼインヒビター」とも称される)を提供するものである。本発明は、一つには、PEG化C1-INH及びポリシアリル化C1-INHが、例えば少なくとも4日といった長い血清半減期を有し得るという驚くべき発見に基づいている。コンジュゲートされたC1-INHの長い血清半減期は、優れたin vivo有効性をもたらし、また好ましい投与レジメン及び投与経路を可能にすると考えられる。例えば、本明細書に記載されるコンジュゲートされたC1-INHは、現在承認されているC1-INH治療法と比べて少ない頻度で皮下または静脈内に投与することができるが、なおも所望の有効性(例えば、予防)をもたらす。本明細書に記載のコンジュゲートされたC1インヒビタータンパク質は、血漿由来のC1-INHか、または組換えにより生成したC1-INHを用いて生成されてもよい。したがって、本明細書に記載のコンジュゲートされたC1-INHは、費用対効果が高い方法で、血液の供給に依存せずに製造することができる。これらは培養細胞で組換えによって生成することができるため、ヒト血液、ヒト血液成分(例えば、血漿)、または動物乳から精製された産物よりも、産生及び最終産物において均質性が得られる。したがって、本発明は、HAE及び他の補体媒介性障害の治療に対してさらに安全で効果的なコンジュゲートされたC1エステラーゼインヒビターを提供する。

20

【0008】

一態様では、本発明は、C1-INHタンパク質と、C1-INHタンパク質に共有結合した少なくとも1つのPEG部分を含む、コンジュゲートされたC1-INHを提供する。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は少なくとも1つのグリカン残基を含み、少なくとも1つのPEG部分が少なくとも1つのグリカン残基に共有結合している。一部の実施形態では、少なくとも1つのPEG部分は、オキシム結合を介してC1-INHタンパク質に共有結合している。

30

【0009】

一部の実施形態では、少なくとも1つのPEG部分は、C1-INHのグリカン残基またはアミン基への共有オキシム結合を形成している。一部の実施形態では、少なくとも1つのPEG部分は、グリカン残基への共有オキシム結合を形成している。一部の実施形態では、少なくとも1つのPEG部分は、C1-INHのアミン基への共有オキシム結合を形成している。

40

【0010】

一部の実施形態では、グリカン残基は、C1-INHのシアル酸残基またはガラクトース残基である。一部の実施形態では、グリカン残基はシアル酸残基である。

【0011】

一部の実施形態では、本発明に適したC1-INHタンパク質は、組換えにより生成されるか、または血漿由来である。

【0012】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、配列番号1、配列番号2、配列番号

50

37、または配列番号38に対して少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であるアミノ酸配列を有するC1-INHドメインを備える。

【0013】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は融合タンパク質である。一部の実施形態では、融合タンパク質は、C1-INHドメインに直接的または間接的に融合されたFcドメインを含む。一部の実施形態では、FcドメインはIgG1に由来する。一部の実施形態では、Fcドメインは、EUナンバリングのL234A及びL235Aに対応するアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、Fcドメインは、EUナンバリングによるIgG1のThr250、Met252、Ser254、Thr256、Thr307、Glu380、Met428、His433、及び/またはAsn434に対応する位置に1つ以上のアミノ酸置換を含む。

10

【0014】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、C1-INHドメインに直接的または間接的に融合されたアルブミンドメインを含む。

【0015】

一部の実施形態では、本発明は、約50%以下（例えば、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下）の中性グリカン種を含むグリコシル化プロファイルを有するC1-INHタンパク質を提供する。

20

【0016】

一部の実施形態では、本発明は、約5%～約25%の中性グリカン種を含むグリコシル化プロファイルを有するC1-INHタンパク質を提供する。

【0017】

一部の実施形態では、本発明は、平均して、1分子当たり少なくとも約30%（例えば、少なくとも35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の荷電グリカンを含むC1-INHタンパク質を提供する。

【0018】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、約20%未満（例えば、15%未満、10%未満、または5%未満）の、マンノース、-ガラクトース、NGNA、またはオリゴマンノース型のグリコシル化のうちの一つ以上を含有する。

30

【0019】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、以下に挙げるもののうちの一つ以上を含むグリコシル化プロファイルを有し、それらは、約5%～約30%の中性グリカン種、約10%～約30%のモノシアリル化グリカン種、約30%～約50%のジシアリル化グリカン種、約15%～約35%のトリシアリル化グリカン種、及び/または約5%～約15%のテトラシアリル化グリカン種である。

【0020】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、30%以下の中性グリカン種、約20%～約30%のモノシアリル化グリカン種、約30%～約40%のジシアリル化グリカン種、約10%～約20%のトリシアリル化グリカン種、及び約5%～約10%のテトラシアリル化グリカン種を含むグリコシル化プロファイルを有する。

40

【0021】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、平均して、1分子当たり少なくとも約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、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、または40個のシアリル化

50

グリカン残基を含む。

【0022】

一部の実施形態では、C1 - インヒビターポリペプチドは、平均して、タンパク質1モル当たり、少なくとも約5モル、6モル、7モル、8モル、9モル、10モル、11モル、12モル、13モル、14モル、15モル、16モル、17モル、18モル、19モル、20モル、21モル、22モル、23モル、24モル、25モル、26モル、27モル、28モル、29モル、30モル、31モル、32モル、33モル、34モル、35モル、36モル、37モル、38モル、39モル、または40モルのシアル酸を含む。

【0023】

一部の実施形態では、本明細書に記載のグリコシル化プロファイルを有するC1 - INHタンパク質は、融合タンパク質である。特定の実施形態では、本明細書に記載のグリコシル化プロファイルを有するC1 - INHタンパク質は、コンジュゲートされていないタンパク質である。

10

【0024】

一部の実施形態では、C1 - INHタンパク質にコンジュゲートされたPEGの分子量は、約1KDa ~ 50KDa、約1KDa ~ 40KDa、約5KDa ~ 40KDa、約1KDa ~ 30KDa、約1KDa ~ 25KDa、約1KDa ~ 20KDa、約1KDa ~ 15KDa、約1KDa ~ 10KDa、または約1KDa ~ 5KDaである。一部の実施形態では、C1 - INHタンパク質にコンジュゲートされたPEGの分子量は、約1KDa以上、2KDa以上、3KDa以上、4KDa以上、5KDa以上、10KDa以上、15KDa以上、20KDa以上、25KDa以上、30KDa以上、35KDa以上、40KDa以上、45KDa以上、または50KDa以上である。一部の実施形態では、C1 - INHタンパク質にコンジュゲートされたPEGは、直鎖構造または分岐構造である。一部の実施形態では、分岐したPEG部分は、2本、3本、4本、または5本のアーム分岐を有し得る。

20

【0025】

一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1 - INHは、PEG / C1 - INHの比が、約1 ~ 約25、約1 ~ 約20、約1 ~ 約15、約1 ~ 約10、または約1 ~ 約5である。

【0026】

一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1 - INHは、血漿由来ヒトC1 - INHタンパク質に匹敵するか、またはそれよりも長い半減期を有する。一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1 - INHの半減期は、血漿由来C1 - INHタンパク質の半減期の100% ~ 500%の範囲内である。一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1 - INHタンパク質の半減期は、少なくとも約70時間、75時間、80時間、85時間、90時間、95時間、100時間、105時間、110時間、115時間、120時間、125時間、130時間、135時間、140時間、145時間、150時間、155時間、160時間、165時間、または170時間である。

30

【0027】

一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1 - INHの半減期は、少なくとも約3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、または14日である。

40

【0028】

一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1 - INHの比活性は、血漿由来ヒトC1 - INHタンパク質の比活性の50% ~ 150%の範囲内である。

【0029】

別の態様では、本発明は、コンジュゲートされたC1エステラーゼインヒビター(C1 - INH)を生成する方法であって、少なくとも1つのグリカン残基及び/または少なくとも1つのアミン基を備えるC1 - INHタンパク質を供給する工程と、PEG部分を、該PEG部分が少なくとも1つのグリカン残基及び/または少なくとも1つのアミン基と

50

反応して結合を形成できる条件下で供給し、それによってコンジュゲートされた C 1 - I N H を生成する工程と、を含む方法を提供する。

【 0 0 3 0 】

一部の実施形態では、 P E G 部分は P E G - C H ₂ - O - N H ₂ を含む。一部の特定の実施形態では、少なくとも 1 つのグリカン残基はシアル酸残基である。さらなる実施形態では、少なくとも 1 つのグリカン残基はガラクトース残基である。

【 0 0 3 1 】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法は、 P E G 部分と反応させる前に、少なくとも 1 つのグリカン残基を酸化させる工程をさらに含む。一部の実施形態では、酸化工程は過ヨウ素酸酸化の使用を含む。一部の実施形態では、過ヨウ素酸酸化は、過ヨウ素酸 : C 1 - I N H のモル比が約 2 0 : 1 ~ 約 5 0 : 1 の間で実施される。一部の実施形態では、 P E G に対する過ヨウ素酸のモル比は約 2 . 5 ~ 約 4 0 の間である。一部の実施形態では、 P E G : C 1 - I N H のモル比は 2 5 : 1 ~ 1 0 0 : 1 である。

10

【 0 0 3 2 】

さらなる実施形態では、本方法は、コンジュゲートされた C 1 - I N H を精製する工程をさらに含む。一部の実施形態では、精製工程は、陰イオン交換、接線流ろ過、透析ろ過、及び透析のうちの 1 つ以上を含む。

【 0 0 3 3 】

さらなる態様では、本発明は、コンジュゲートされた C 1 エステラーゼインヒビター (C 1 - I N H) と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

20

【 0 0 3 4 】

一部の実施形態では、コンジュゲートされた C 1 - I N H を含む医薬組成物は液体である。他の実施形態では、コンジュゲートされた C 1 - I N H を含む医薬組成物は凍結乾燥されている。

【 0 0 3 5 】

さらに別の態様では、本発明は、コンジュゲートされた C 1 - I N H を含む医薬組成物 (例えば、液体形態及び凍結乾燥された形態) を備えたキットを提供する。一部の実施形態では、キットはシリンジを含む。一部の実施形態では、シリンジには、コンジュゲートされた C 1 - I N H を含む医薬組成物が予め担持されている。

【 0 0 3 6 】

一部の実施形態では、医薬組成物が凍結乾燥されており、キットは再調整用の緩衝溶液をさらに含む。

30

【 0 0 3 7 】

さらに別の態様では、本発明は、補体媒介性障害を治療する方法であって、治療を必要とする対象に、コンジュゲートされた C 1 エステラーゼインヒビター (C 1 - I N H) の医薬組成物を投与することを含む方法を提供する。

【 0 0 3 8 】

関連する態様では、本発明は、補体媒介性障害を治療するための薬剤の製造における、コンジュゲートされた C 1 エステラーゼインヒビター (C 1 - I N H) を含む組成物の使用を提供する。

40

【 0 0 3 9 】

一部の実施形態では、補体媒介性障害は、遺伝性血管性浮腫、抗体関連型拒絶反応、視神経脊髄炎関連疾患、外傷性脳損傷、脊椎損傷、虚血性脳損傷、火傷、中毒性表皮壊死症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症 (A L S)、パーキンソン病、脳卒中、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (C I D P)、重症筋無力症、及び / または多巣性運動ニューロパチーから選択される。

【 0 0 4 0 】

一部の実施形態では、本発明は、少なくとも 1 つのグリカン残基を含む C 1 - I N H タンパク質と、少なくとも 1 つのポリシアル酸 (P S A) 部分とを備える、コンジュゲートされた C 1 エステラーゼインヒビター (C 1 - I N H) を含む組成物を提供する。一部の

50

実施形態では、少なくとも1つのポリシアル酸（PSA）部分は、少なくとも1つのグリカン残基に共有結合している。

【0041】

別の態様では、本発明は、少なくとも1つのグリカン残基を含むC1-INHタンパク質と、少なくとも1つのポリシアル酸（PSA）部分とを備える、コンジュゲートされたC1エステラーゼインヒビター（C1-INH）を含む組成物を提供する。一部の実施形態では、少なくとも1つのポリシアル酸（PSA）部分が、オキシム結合またはヒドラゾン結合を介してC1-INHタンパク質に共有結合している。一部の実施形態では、ポリシアル酸（PSA）部分が、オキシム結合を介してC1-INHタンパク質に共有結合している。一部の実施形態では、ポリシアル酸（PSA）部分が、オキシム結合を介してC1-INHタンパク質に共有結合している。一部の実施形態では、オキシム結合は、PSA部分と、C1-INHのグリカン残基またはアミン基との間にある。

10

【0042】

一部の実施形態では、グリカン残基はシアル酸残基である。

【0043】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、組換えにより生成されるか、または血漿由来である。

【0044】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、配列番号1、配列番号2、配列番号37、または配列番号38に対して少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するC1-INHドメインを備える。

20

【0045】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は融合タンパク質である。一部の実施形態では、融合タンパク質は、C1-INHドメインに直接的または間接的に融合されたFcドメインを含み得る。一部の実施形態では、FcドメインはIgG1に由来し得る。一部の実施形態では、Fcドメインは、EUナンバリングのL234A及びL235Aに対応するアミノ酸置換を含み得る。一部の実施形態では、融合タンパク質は、C1-INHドメインに直接的または間接的に融合されたアルブミンドメインを含み得る。

【0046】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、PEG化前に、約50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下の中性グリカン種を含むグリコシル化プロファイルを有する。

30

【0047】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、PEG化前に、約5%～約25%の中性グリカン種を含むグリコシル化プロファイルを有する。

【0048】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、平均して、1分子当たり少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の荷電グリカンを含む。

40

【0049】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、PSAとコンジュゲートする前に、約20%未満、15%未満、10%未満、または5%未満の、マンノース、-ガラクトース、NGNA、またはオリゴマンノース型のグリコシル化のうちの1つ以上を含有する。

【0050】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、PSAとコンジュゲートする前に、以下に挙げるもののうちの1つ以上を含むグリコシル化プロファイルを有し、それらは、

50

約 5 % ~ 約 30 % の中性グリカン種、約 10 % ~ 約 30 % のモノシアリル化グリカン種、約 30 % ~ 約 50 % のジシアリル化グリカン種、約 15 % ~ 約 35 % のトリシアリル化グリカン種、または約 5 % ~ 約 15 % のテトラシアリル化グリカン種である。

【 0051】

一部の実施形態では、C1 - INHタンパク質は、PSAとコンジュゲートする前に、30 % 以下の中性グリカン種、約 20 % ~ 約 30 % のモノシアリル化グリカン種、約 30 % ~ 約 40 % のジシアリル化グリカン種、約 10 % ~ 約 20 % のトリシアリル化グリカン種、及び約 5 % ~ 約 10 % のテトラシアリル化グリカン種を含むグリコシル化プロファイルを有する。

【 0052】

一部の実施形態では、C1 - INHタンパク質は、平均して、1分子当たり少なくとも約 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、21 個、22 個、23 個、24 個、25 個、26 個、27 個、28 個、29 個、30 個、31 個、32 個、33 個、34 個、35 個、36 個、37 個、38 個、39 個、または 40 個のシアリル化グリカン残基を含む。

10

【 0053】

一部の実施形態では、C1 - INHタンパク質は、平均して、タンパク質 1 モル当たり、少なくとも約 5 モル、6 モル、7 モル、8 モル、9 モル、10 モル、11 モル、12 モル、13 モル、14 モル、15 モル、16 モル、17 モル、18 モル、19 モル、20 モル、21 モル、22 モル、23 モル、24 モル、25 モル、26 モル、27 モル、28 モル、29 モル、30 モル、31 モル、32 モル、33 モル、34 モル、35 モル、36 モル、37 モル、38 モル、39 モル、または 40 モルのシアリル酸を含む。

20

【 0054】

一部の実施形態では、PSAの分子量は、約 1 KDa ~ 50 KDa、約 1 KDa ~ 40 KDa、約 5 KDa ~ 40 KDa、約 1 KDa ~ 30 KDa、約 1 KDa ~ 25 KDa、約 1 KDa ~ 20 KDa、約 1 KDa ~ 15 KDa、約 1 KDa ~ 10 KDa、または約 1 KDa ~ 5 KDaである。

【 0055】

一部の実施形態では、PSAの分子量は、約 1 KDa、5 KDa、10 KDa、15 KDa、20 KDa、25 KDa、30 KDa、35 KDa、40 KDa、45 KDa、または 50 KDaである。

30

【 0056】

一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1 - INHは、PSA / C1 - INHの比が、約 1 ~ 約 25、約 1 ~ 約 20、約 1 ~ 約 15、約 1 ~ 約 10、または約 1 ~ 約 5である。

【 0057】

一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1 - INHは、血漿由来ヒトC1 - INHに匹敵するか、またはそれよりも長い半減期を有する。

【 0058】

一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1 - INHの半減期は、血漿由来C1 - INHの半減期の 100 % ~ 500 % の範囲内である。

40

【 0059】

一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1 - INHの半減期は、少なくとも約 70 時間、75 時間、80 時間、85 時間、90 時間、95 時間、100 時間、105 時間、110 時間、115 時間、120 時間、125 時間、130 時間、135 時間、140 時間、145 時間、150 時間、155 時間、160 時間、165 時間、または 170 時間である。

【 0060】

一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1 - INHの半減期は、少なくとも約 3

50

日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、または14日である。

【0061】

一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1-INHの比活性は、血漿由来ヒトC1-INHの比活性の50%~150%の範囲内である。

【0062】

さらなる態様では、本発明は、コンジュゲートされたC1エステラーゼインヒビター(C1-INH)を生成する方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、少なくとも1つのグリカン残基及び/または少なくとも1つのアミン基を備えるC1-INHタンパク質を供給する工程と、ポリシアル酸(PSA)部分を、該PSA部分が少なくとも1つのグリカン残基及び/または少なくとも1つのアミン基と反応して結合を形成できる条件下で供給し、それによってコンジュゲートされたC1-INHを生成する工程と、を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのグリカン残基はシアル酸残基である。

10

【0063】

一部の実施形態では、本方法は、PSA部分と反応させる前に、少なくとも1つのグリカン残基を酸化させる工程をさらに含む。一部の実施形態では、酸化工程は過ヨウ素酸酸化を含む。一部の実施形態では、過ヨウ素酸酸化は、過ヨウ素酸:C1-INHのモル比が約20:1~約50:1の間で実施され得る。一部の実施形態では、PSAに対する過ヨウ素酸のモル比は約2.5~約40の間であり得る。

【0064】

一部の実施形態では、PSA:C1-INHのモル比は約25:1~100:1の間である。

20

【0065】

一部の実施形態では、本方法は、コンジュゲートされたC1-INHを精製する工程をさらに含む。

【0066】

一部の実施形態では、精製工程は、陰イオン交換、接線ろ過、透析ろ過、及び透析のうちの一つ以上を含む。

【0067】

さらに別の態様では、本発明は、上記の態様または実施形態の方法で生成されたコンジュゲートされたC1エステラーゼインヒビター(C1-INH)を提供する。

30

【0068】

なおも別の態様では、本発明は、上記の態様または実施形態に記載のコンジュゲートされたC1エステラーゼインヒビター(C1-INH)と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態では、医薬組成物の成分は液体である。一部の実施形態では、医薬組成物の成分は凍結乾燥されている。

【0069】

一態様では、本発明は、上記の態様または実施形態に記載の医薬組成物とシリンジとを含むキットを提供する。一部の実施形態では、シリンジには、医薬組成物が予め担持されている。一部の実施形態では、医薬組成物は凍結乾燥されており、キットは再調整用の緩衝溶液をさらに含む。

40

【0070】

別の態様では、本発明は、補体媒介性障害を治療する方法であって、治療を必要とする対象に、上記の態様または実施形態に記載の医薬組成物を投与することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、補体媒介性障害は、遺伝性血管性浮腫、抗体関連型拒絶反応、視神経脊髄炎関連疾患、外傷性脳損傷、脊椎損傷、虚血性脳損傷、火傷、中毒性表皮壊死症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病、脳卒中、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)、重症筋無力症、多巣性運動ニューロパチーから選択される。

【0071】

50

さらなる態様では、本発明は、補体媒介性障害を治療するための薬剤の製造における、上記の態様または実施形態に記載のコンジュゲートされたC1エステラーゼインヒビターを含む組成物の使用を提供する。一部の実施形態では、補体媒介性障害は、遺伝性血管性浮腫、抗体関連型拒絶反応、視神経脊髄炎関連疾患、外傷性脳損傷、脊椎損傷、虚血性脳損傷、火傷、中毒性表皮壊死症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、脳卒中、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（CIDP）、重症筋無力症、及び/または多巣性運動ニューロパチーから選択される。

【0072】

本発明の他の特徴、目的、及び利点は、以下の詳細な説明において明らかになる。しかしながら、以下の詳細な説明は本発明の実施形態を示すが、単に例示のためであり、制限するものではないことを理解すべきである。本発明の範囲内の様々な変更及び修正は、以下の詳細な説明から当業者に明らかになるであろう。

10

【図面の簡単な説明】

【0073】

図面は、単に例示を目的とするものであり、制限するためのものではない。

【0074】

【図1】図1はC1-INHの概略図である。右から左に3つのドメインがあり、それらはシグナルペプチドと、N末端（N末端ドメインとも称される）と、セルピンドメインである。N結合型グリカンはダイヤモンド形の先端部を持つ長い垂直線として表示されており、O結合型グリカンは短い垂直線として表示されている。

20

【0075】

【図2】図2は成熟C1-INHのアミノ酸配列と、PEG化される可能性がある部位とを示す。

【0076】

【図3】図3はアミン媒介性PEG化の例を示す化学反応式の概略図である。

【0077】

【図4】図4Aはグリカン媒介性アミノキシ（aminoxy）PEG化の例を示す化学反応式の概略図である。図4Bはシアル酸媒介性（SAM）アミノキシPEG化の例を示す化学反応式の概略図である。

【0078】

【図5】図5はガラクトース媒介性（GAM）PEG化の例を示す化学反応式の概略図である。

30

【0079】

【図6】図6はパネルA及びパネルBは、アミノ基を介するPEG化とシアル酸を介するPEG化とを比較した、PEG化したC1-INH（5KDaまたは40KDa）のラットの予備検討の結果を示す。rhC1-INHとCINRYZEは対照薬として供給されている。パネルCは、5KDaまたは40KDaのPEGのどちらかでPEG化されたC1-INHのSDS-PAGEゲルを示す。

【0080】

【図7】図7はPEG化プロセスAの例の概略図である。

40

【0081】

【図8】図8はPEG化プロセスBの例の概略図である。

【0082】

【図9】図9A-9EはPEG化C1-INHに好適なPEG化プロトコルの数例をまとめた概略図である。

【0083】

【図10-1】図10Aは5KSAM KHR5オクチル担持サンプルのC1-INH-PEGのIC50を示す。図10BはTFPで遊離PEGを除去する前及び除去した後のC1-INH-PEGのIC50を示す。

【図10-2】同上。

50

- 【0084】
- 【図11】図11は遊離PEG及び他の不純物からの例示的な40KDaPEG化C1-INH精製物のクロマトグラフィー結果を示す。
- 【0085】
- 【図12】図12は遊離PEG及び他の不純物からの例示的な20KDaPEG化C1-INH精製物のクロマトグラフィー結果を示す。
- 【0086】
- 【図13】図13は遊離PEG及び他の不純物からの例示的な5KDaPEG化C1-INH精製物のクロマトグラフィー結果を示す。
- 【0087】
- 【図14】図14はIV投与されたPEG化rhC1-INHとrhC1-INHとの、非ヒト霊長類(NHP)PK試験結果を示す。
- 【0088】
- 【図15】図15は種々のC1-INH-PEG負荷量がNHPに投与された場合のNHPのPK試験結果を示す。
- 【0089】
- 【図16】図16はPEG化rhC1-INHのIV対SCのNHP試験結果を示す。
- 【0090】
- 【図17】図17は5KPEGが種々負荷されているC1-INH-PEGサンプルのラットPK力価分析の結果を示す。
- 【0091】
- 【図18-1】図18はパネルA~パネルEは、C1-INH-PEGの純度を示す一連のゲルとグラフとを示す。パネルA及びパネルBは、C1-INH-PEGサンプル中の遊離PEGを検出するのに使用された、バリウム-ヨウ素染色されたSDS-PAGEゲルである。パネルC及びパネルDは、C1-INH-PEGサンプル中の遊離PEG1K及び2Kを検出するのに使用されたRP-HPLCグラフである。パネルEは、C1-INHサンプルが負荷された2つのSDS-PAGEゲルを示す。
- 【図18-2】同上。
- 【図18-3】同上。
- 【図18-4】同上。
- 【0092】
- 【図19-1】図19はパネルA~パネルCは、SAMプロセスでコンジュゲートされたC1-INH-PEGサンプルの純度と、IC50と、PKデータとを表す一連のグラフ及びゲルを示す。パネルAは、種々のC1-INHサンプルのIC50グラフである。パネルBは、C1-INHサンプルの純度を示すSDS-PAGEゲルと、随伴するC1-INHサンプルのIC50値とを示す。パネルCは、ラットが静脈内にC1-INH-PEG及び非PEG化C1-INHを与えられている場合の、ラット試験からのPK値を示すグラフである。
- 【図19-2】同上。
- 【0093】
- 【図20-1】図20はパネルA、パネルB、及びパネルCは、C1-INHのIC50値を表す一連のグラフを示す。
- 【図20-2】同上。
- 【図20-3】同上。
- 【0094】
- 【図21】図21はC1-INHのアミンカップリングPEG化プロセスの一例を示す概略図である。
- 【0095】
- 【図22-1】図22はパネルA~パネルDは、C1-INH-PEGの純度を表す一連のゲルとグラフとを示す。パネルAは、C1-INH-PEGサンプル中の遊離PEGを

10

20

30

40

50

検出するのに使用された、バリウム - ヨウ素染色された SDS - PAGE ゲルを示す。パネル B は、遊離 PEG 1 K 及び 2 K を検出するための RP - HPLC グラフである。パネル C 及びパネル D は、遊離 NHS - PEG 20 K (パネル C) と遊離 NHS - PEG 40 K (パネル D) の精製クロマトグラムを示す。

【図 22 - 2】同上。

【図 22 - 3】同上。

【0096】

【図 23 - 1】図 23 はパネル A ~ パネル C は、C1 - INH サンプルの純度と、IC50 と、PK データとを表す一連のグラフ及びゲルを示す。パネル A は、種々の C1 - INH サンプルの IC50 グラフである。パネル B は、ラットが静脈内に C1 - INH - PEG 及び非 PEG 化 C1 - INH を与えられている場合の、ラット試験からの PK 値を示すグラフである。パネル C は、C1 - INH サンプルの純度を示す SDS - PAGE ゲルと、随伴する C1 - INH サンプルの IC50 値とを示す。

10

【図 23 - 2】同上。

【0097】

【図 24 - 1】図 24 はパネル A 及びパネル B は、シアル酸媒介性 (SAM) プロセスで生成された C1 - INH - PSA の純度を表すゲル及びグラフを示す。パネル A は SDS ゲルであり、パネル B は C1 - INH - PSA の IC50 を示すグラフである。

【図 24 - 2】同上。

【0098】

20

【図 25 - 1】図 25 はパネル A、パネル B、及びパネル C は、ラットが静脈内に C1 - INH - PEG、C1 - INH - PSA、CINRYZE - PEG、C1 - INH、または CINRYZE を与えられている場合の、ラット試験からの PK 値を表す一連のグラフを示す。

【図 25 - 2】同上。

【発明を実施するための形態】

【0099】

定義

本発明をより容易に理解するために、いくつかの用語を最初に以下に定義する。以下の用語および他の用語の追加の定義は、明細書全体を通して述べられている。

30

【0100】

動物：本明細書で使用される場合、用語「動物」は、動物界の任意のメンバーを意味する。一部の実施形態では、「動物」は、発達の任意の段階でのヒトを意味する。一部の実施形態では、「動物」は、発達の任意の段階での非ヒト動物を意味する。特定の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳類（例えば、ゲッ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、及び/またはブタ）である。一部の実施形態では、動物には、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類、及び/または蠕虫類が含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子組換え動物、及び/またはクローンであり得る。

【0101】

40

およそまたは約：本出願において使用される場合、「約」及び「およそ」という用語は同意語として用いられている。本出願において使用される任意の数字は、約/およそを伴っても伴わなくても、当業者により認識される任意の正常変動を含むことが意図されている。本明細書で使用する場合、関心のある 1 つ以上の値に適用される「約 (approximately)」または「約 (about)」という用語は、記載された基準値に類似する値を指す。特定の実施形態では、「約 (approximately)」または「約 (about)」という用語は、特段の記載がない限り、または文脈から明らかでない限り（そのような数が可能な値の 100% を超える場合を除く）、いずれかの方向（より大きいまたは小さい）で 25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2

50

%、1%またはそれ未満の値の範囲を指す。

【0102】

生物学的利用度：本明細書で使用される場合、用語「生物学的利用度」は、概して、投与された用量のうち対象の血流に到達する割合を意味する。

【0103】

生物学的に活性である：本明細書で使用される場合、「生物学的に活性である」という句は、生物学的系において、特に生物において活性を有する任意の作用物質の特性を指す。例えば、生物に投与されたときに、その生物に対して生物学的効果を有する薬剤は、生物学的に活性であると考えられる。ペプチドが生物学的活性である特定の実施形態では、該ペプチドの少なくとも1つの生物活性を共有する該ペプチドの一部が「生物学的活性」部分と称されるのが典型的である。

10

【0104】

担体または希釈剤：本明細書で使用される場合、「担体」または「希釈剤」という用語は、医薬製剤の調製に有用な薬学的に許容される（例えば、ヒトへの投与に対して安全かつ無毒である）担体または希釈物質を意味する。希釈剤の例には、滅菌水、注射用静菌水（B W F I）、pH緩衝溶液（例えばリン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩水、リンガー溶液またはデキストロース溶液が含まれる。

【0105】

C1-インヒビターまたはC1エステラーゼインヒビターまたはC1-INH：本明細書で使用される場合、「C1-インヒビター」または「C1エステラーゼインヒビター」または「C1-INH」という用語は、全て交換可能に使用することができ、別段の指定がない限り、実質上のC1-INHの生物学的活性を保持する、野生型、天然型、天然に存在する、組換えにより生成された、及び/または修飾型の任意のC1-INHタンパク質（例えば、1つ以上のアミノ酸変異、欠失、トランケーション、挿入、及び/または融合タンパク質を有するC1-INHタンパク質）を意味する。「C1-インヒビター」または「C1エステラーゼインヒビター」または「C1-INH」は融合タンパク質であり得る。一部の実施形態では、C1-INH融合タンパク質はC1-INHポリペプチドまたはC1-INHドメインとFcドメインとを含む。一部の実施形態では、C1-INH融合タンパク質はC1-INHポリペプチドまたはC1-INHドメインとアルブミンドメインとを含む。一部の実施形態では、融合タンパク質はリンカーをさらに含む。C1-INHタンパク質は、組換え細胞内で組換え発現され得る。特定の実施形態では、C1-INHは、哺乳類細胞で、好ましくはCHO細胞またはヒト細胞で、好ましくはHT1080細胞またはHEK細胞で発現する。

20

30

【0106】

コンジュゲート：本明細書で使用される場合、用語「コンジュゲート」は、あるタンパク質に直接的または間接的に共有結合した部分を意味し得る。通例、あるタンパク質がコンジュゲートに結合している場合、そのタンパク質はコンジュゲートされたタンパク質またはタンパク質コンジュゲートと称され得る。一部の実施形態では、本明細書に記載のコンジュゲートはポリエチレングリコール（PEG）である。あるタンパク質がPEG部分に結合している場合、そのタンパク質はPEG化タンパク質と称され得る。

40

【0107】

機能的等価物または機能的誘導体：本明細書で使用される場合、「機能的等価物」または「機能的誘導体」という用語は、アミノ酸配列の機能的誘導体の文脈では、元来の配列の生物学的活性と実質的に同様の生物活性（機能的または構造的いずれか）を保持する分子を意味する。機能的誘導体または機能的等価物は、天然の誘導体であり得るか、または合成で調製される。例示的な機能的誘導体として、1つ以上のアミノ酸の置換、欠失、または付加を有するが、タンパク質の生物学的活性が保持されているアミノ酸配列が挙げられる。置換したアミノ酸は、望ましくは、置換されたアミノ酸と類似する化学物理的性質を有する。類似した望ましい化学物理的性質として、電荷、嵩高さ、疎水性、親水性などにおける類似性が挙げられる。

50

【0108】

融合タンパク質：本明細書で使用される場合、「融合タンパク質」または「キメラタンパク質」という用語は、2種以上の元来は別々のタンパク質またはそれらの一部分を連結することによって作製されたタンパク質を意味する。一部の実施形態では、リンカーまたはスペーサーが各タンパク質の間に存在することになる。

【0109】

半減期：本明細書で使用される場合、用語「半減期」は、タンパク質濃度またはタンパク質活性などの量が、ある期間の開始時に測定された値の半分まで下がるのに要する時間である。

【0110】

遺伝性血管性浮腫またはHAE：本明細書で使用される場合、「遺伝性血管性浮腫」または「HAE」という用語は、予測不可能な反復性の炎症発作によって特徴付けられる血液障害を意味する。HAEはC1-INH欠損と関連しているのが典型的であり、この欠損は、C1-INHが低レベルであることか、またはC1-INHの活性が損なわれている、もしくは低下していることに起因し得る。症状として、顔面、四肢、生殖器、胃腸管、及び上気道などの身体の任意の部位に生じ得る腫脹が挙げられるが、これらに限定されない。

【0111】

改善、増加または低減：本明細書で使用される場合、「改善」、「増加」、もしくは「低減」という用語、または文法的等価物は、本明細書に記載される治療の開始前の同一個体での測定値、または本明細書に記載される治療を受けていない対照被験体（または複数の対照被験体）での測定値などの基準測定値に対する相対的な値を示唆するものである。「対照被験体」とは、治療を受けている対象と同じ疾患形態を患っており、治療を受けている対象とほぼ同じ年齢の対象のことである。

【0112】

in vitro：本明細書で使用される場合、用語「*in vitro*」は、多細胞生物体内ではなく、例えば、試験管または反応容器中、細胞培養液中などの人工的な環境で生じる事象を意味する。

【0113】

in vivo：本明細書で使用される場合、用語「*in vivo*」は、ヒト及び非ヒト動物などの多細胞生物体内で生じる事象を意味する。細胞型系の文脈において、該用語は、生細胞内で生じる事象を意味するのに（例えば*in vitro*系の対語として）使用され得る。

【0114】

リンカー：本明細書で使用される場合、用語「リンカー」は、融合タンパク質において、天然タンパク質の特定の位置に見られるもの以外のアミノ酸配列を意味し、可撓性を持つか、または2つのタンパク質部分構造の間に - ヘリックスなどの構造を挿入するように設計されているのが一般的である。リンカーはスペーサーとも呼ばれる。リンカーまたはスペーサーは、一般的に、それ自体には生物学的機能を持たない。

【0115】

ポリペプチド：用語「ポリペプチド」は、本明細書で使用される場合、ペプチド結合を介して互いに連結したアミノ酸の連続鎖を意味する。この用語は、任意の長さのアミノ酸鎖について言及するのに使用されるが、当業者が理解するように、この用語は長い鎖に限定されることはなく、ペプチド結合を介して互いに連結した2つのアミノ酸を含めた極めて短い鎖についても言及することができる。当業者に知られるように、ポリペプチドはプロセッシング及び/または修飾されてもよい。本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」及び「ペプチド」という用語は交換可能に使用される。

【0116】

予防：本明細書で使用される場合、「予防する」または「予防」という用語は、疾患、障害、及び/または症状の発病に関連して使用される場合、疾患、障害、及び/または症

10

20

30

40

50

状発症の危険性を低下させることを意味する。後述の「危険性」の定義を参照されたい。

【0117】

タンパク質：本明細書で使用される用語「タンパク質」は、個別単位として機能する1つ以上のポリペプチドを意味する。単一のポリペプチドが個別の機能性単位であり、個別の機能性単位を形成するために他のポリペプチドと永続的または一時的に物理的会合することを必要としない場合、用語「ポリペプチド」と用語「タンパク質」は交換可能に用いることができる。個別の機能性単位が相互に物理的会合した2つ以上のポリペプチドで構成される場合、用語「タンパク質」は、物理的に結合し、かつ個別単位として合わせて機能する複数のポリペプチドを意味する。

【0118】

危険性：文脈から理解されるとおり、疾患、障害、及び/または症状の「危険性」は、特定の個体が疾患、障害、及び/または症状（例えば、筋ジストロフィー）を発症する可能性を包含する。一部の実施形態では、危険性は割合として表される。一部の実施形態では、危険性は0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%から100%までである。一部の実施形態では、危険性は、参照試料または参照試料群に関連する危険性と比較した危険性として表される。一部の実施形態では、参照試料または参照試料群は、疾患、障害、症状、及び/または事象（例えば、筋ジストロフィー）の既知の危険性を有している。一部の実施形態では、参照試料または参照試料群は、ある特定の個体と比較可能な個体由来である。一部の実施形態では、相対危険性は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上である。

【0119】

対象：本明細書で使用される場合、用語「対象」は、ヒトまたは任意の非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、または霊長類）を意味する。ヒトには、出生前及び出生後の形態が含まれる。多くの実施形態では、対象はヒトである。対象は患者である場合があり、これは、疾患の診断または治療のために医療機関に来院するヒトを意味する。用語「対象」は、本明細書において「個体」または「患者」と交換可能に使用される。対象は、疾患または障害に罹患している可能性があるか、またはそれに感受性を有するが、疾患または障害の症状を表していてもいなくてもよい。

【0120】

実質的：本明細書で使用される場合、用語「実質的」は、関心対象の特徴または特性の全てもしくはほぼ全ての範囲または程度を示す、定性的な状態を意味する。生物学分野の当業者であれば、生物学的及び化学的な現象が、完了すること及び/もしくは完了の域に到達すること、または絶対的な結果を達成もしくは回避することが、仮にあったとしても稀であることを理解するであろう。したがって、用語「実質的」は、本明細書において、多くの生物学的及び化学的現象に固有の潜在的な完全性の欠如を捉えるのに用いられる。

【0121】

実質的相同性：本明細書では、「実質的相同性」という句は、アミノ酸または核酸配列間の比較を指すために使用される。当業者には理解されるように、2つの配列は、それらに対応する位置に相同残基を含む場合、一般的に「実質的に相同」と考えられる。相同残基は同一残基であってもよい。代替的に、相同な残基は、非同一の残基であってもよく、構造的特徴および/または機能的特徴が適切に類似である。例えば、当業者には周知のとおり、ある特定のアミノ酸は、「疎水性」または「親水性」アミノ酸として、及び/または「極性」または「非極性」の側鎖を有するとして分類されるのが典型的である。1つのアミノ酸を同一種の別のアミノ酸で置換することは、多くの場合「相同性」置換と見なされ得る。

【0122】

この技術分野でよく知られているように、アミノ酸配列または核酸配列は、ヌクレオチド配列のBLASTN、およびアミノ酸配列のBLASTP、ギャップドBLAST、お

10

20

30

40

50

よびPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラムで利用可能なものを含む様々なアルゴリズムのいずれかを用いて比較することができる。こうしたプログラムの例は、Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3):403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; 及び Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999に記載されている。相同配列を同定することに加えて、上記のプログラムは、典型的には、相同性の程度の指標を提供する。いくつかの実施形態では、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上のそれらの対応する残基が、関連ストレッチの残基にわたって相同である場合、2つの配列は実質的に相同であると考えられる。いくつかの実施形態では、関連ストレッチは完全なシーケンスである。いくつかの実施形態では、関連ストレッチは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500またはそれ以上の残基を含む。

【0123】

実質的同一性：本明細書では、「実質的同一性」という句は、アミノ酸または核酸配列間の比較を指すために使用される。当業者には理解されるように、2つの配列は、それらが対応する位置に同一の残基を含む場合、一般に「実質的に同一」と考えられる。この技術分野でよく知られているように、アミノ酸配列または核酸配列は、ヌクレオチド配列のBLASTN、およびアミノ酸配列のBLASTP、ギャップドBLAST、およびPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラムで利用可能なものを含む様々なアルゴリズムのいずれかを用いて比較することができる。こうしたプログラムの例は、Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3):403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; and Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999に記載されている。同一の配列を同定することに加えて、上記のプログラムは、典型的には、同一性の程度の指標を提供する。いくつかの実施形態では、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上のそれらの対応する残基が、関連ストレッチの残基にわたって同一である場合、2つの配列は実質的に同一であると考えられる。いくつかの実施形態では、関連ストレッチは完全なシーケンスである。いくつかの実施形態では、関連ストレッチは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、1

50、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500またはそれ以上の残基を含む。

【0124】

罹患：疾患、障害、及び/または症状に「罹患」している個体は、その疾患、障害、及び/または症状を持つと診断されているか、またはその疾患、障害、及び/または症状の1つ以上の徴候を示している。

【0125】

感受性を有する：疾患、障害、及び/または症状に感受性を有する個体は、その疾患、障害、及び/または症状を持つとは診断されていない。一部の実施形態では、疾患、障害、及び/または症状に感受性を有する個体は、その疾患、障害、及び/または症状の徴候を呈していない場合がある。一部の実施形態では、疾患、障害、症状、または事象（例えば、DMD）に感受性を有する個体は、以下のうちの1つ以上によって特徴付けることができる：（1）疾患、障害、及び/または症状の発症と関連する遺伝子変異；（2）疾患、障害、及び/または症状の発症と関連する遺伝子多型；（3）疾患、障害、及び/または症状と関連するタンパク質の発現及び/または活性の増加及び/または減少；（4）疾患、障害、症状、及び/または事象の発症と関連する習慣及び/または生活様式；（5）移植を受けたか、受ける予定であるか、または移植を必要としていること。一部の実施形態では、疾患、障害、及び/または症状に感受性を有する個体は、その疾患、障害、及び/または症状を発症することになる。一部の実施形態では、疾患、障害、及び/または症状に感受性を有する個体は、その疾患、障害、及び/または症状を発症することがない。

【0126】

治療有効量：本明細書で使用される場合、治療剤の「治療有効量」という用語は、疾患、障害、及び/もしくは症状に罹患しているか、または感受性を有する対象に投与される場合、その疾患、障害、及び/または症状の徴候を治療する、診断する、予防する、及び/またはその開始を遅延するのに十分な量を意味する。当業者は、治療有効量が少なくとも1つの単位用量を含む投与レジメンによって投与されるのが典型的であることを理解するであろう。

【0127】

治療：本明細書で使用される場合、用語「治療する」、「治療」または「治療している」は、ある特定の疾患、障害、及び/または症状の1つ以上の徴候または特徴を、部分的にまたは完全に軽減する、寛解させる、緩和する、抑制する、予防する、その開始を遅延する、その重症度を低減する、及び/またはその発症率を低減するために使用する任意の方法を意味する。疾患の症状を提示していない対象、及び/または疾患の初期の症状のみを提示している対象に対して、該疾患に関連する病態を発症させる危険性を減らすために、治療が行われる場合もある。

発明を実施するための形態

【0128】

本発明は、特に、遺伝性血管性浮腫（HAE）を含めた補体媒介性障害の治療を改善するためのコンジュゲートされたC1-INHを提供する。詳細には、本発明により提供されるコンジュゲートされたC1-INHはPEG化C1-INHである。

【0129】

コンジュゲートされたC1-INH（例えば、PEG化C1-INHまたはポリシアル酸（PSA）コンジュゲートC1-INH）は、コンジュゲートされていないが（例えば、非PEG化）それ以外の点では同一のC1-INHよりも長い半減期を有すると考えられる。本発明によると、以下に限定されないが、血漿由来C1-INHタンパク質または組換え発現C1-INHタンパク質を含めた任意のC1-INHタンパク質がコンジュゲート（例えば、PEG化またはPSAコンジュゲート）され得る。一部の実施形態では、コンジュゲート（例えば、PEG化またはPSAコンジュゲート）され得るC1-INHタンパク質は融合タンパク質である。以下に説明するように、本発明に従ってコンジュゲート（例えば、PEG化またはPSAコンジュゲート）した結果により *in vivo* で

の半減期が延びるが、意外なことに、C1-INHタンパク質の良好な生物学的利用度及び/または生物活性は保持される。したがって、本明細書に記載のコンジュゲート（例えばPEG化またはPSAコンジュゲート）されたC1-INHによって、例えば、投与頻度を低減し、予防有効性を向上させることで、HAE及び他の補体媒介性疾患、障害、または症状の治療を改善することができる。

【0130】

本発明の様々な態様は、以下のセクションで詳細に説明される。セクションの使用は、本発明を限定することを意味しない。各セクションは、本発明の任意の態様に適用することができる。本出願において、「または」の使用は、他に記載がない限り、「および/または」を意味する。本明細書で引用される技術の全ての開示は、参照によりその全体が援用される。

10

【0131】

C1-INHタンパク質

本発明を用いて、任意のC1-INHタンパク質をコンジュゲートすることができる。ヒトC1-INHは、広範な抑制性及び非抑制性の生物学的活性を有する重要な抗炎症性血漿タンパク質である。ヒトC1-INHは、配列相同性、そのC末端ドメインの構造、及びプロテアーゼ阻害の機序により、血漿プロテアーゼインヒビターの最大クラスであるセルピンスーパーファミリーに属する。このセルピンスーパーファミリーには、抗トロンピン、1-プロテイナーゼインヒビター、プラスミノゲン活性化因子インヒビター、及び多種多様な生理学系を調節する構造上類似した多くの他のタンパク質も含まれる。C1-INHは、補体系、キニン生成の接触系、及び固有凝固経路におけるプロテアーゼのインヒビターである。Cai, S. & Davis, A. E., Complement Regulatory Protein C1 Inhibitor Binds to Selectins and Interferes with Endothelial-Leukocyte Adhesion, J Immunol, 171: 4786-4791 (2003)。具体的には、C1-INHは、補体系のC1r及びC1sを阻害することが示されている。C1-INHは、凝固第XI因子及び凝固第XII因子、ならびにカリクレイン、及び凝固系と線溶系の他のセリンプロテアーゼ（例えば、組織型プラスミノゲン活性化因子及びプラスミンなど）の主要レギュレーターでもある。

20

【0132】

C1-INHの低い血漿含有量またはその機能不全により、補体カスケード及び接触血漿カスケードの両方が活性化され、同様に他の系も影響を受ける恐れがある。C1-INHの血漿含有量が55 µg/mL（正常値の約25%）未満のレベルに低下すると、C1の自発的活性化が誘導されることがわかっている。

30

【0133】

C1-INHの構造を示す概略図を図1に示す。シグナルペプチド、N末端ドメイン、及びセルピンドメインが示されている。C1-INHの22個のアミノ酸シグナルペプチドは分泌に必要であり、C1-INHタンパク質の残部から切断される。C1-INHは2つのドメインを有しており、それらは、典型的なセルピンドメインである365個のアミノ酸を有するC末端ドメインと、113個のアミノ酸を有するN末端ドメインである。このタンパク質は、ドメインを接続する2つのジスルフィド架橋によって安定化されている。これらのジスルフィド架橋は、N末端ドメインのCys101とC末端（セルピン）ドメインのCys406とが形成するジスルフィド結合、及びN末端ドメインのCys108とC末端ドメインのCys183とが形成するジスルフィド結合により形成される。セルピンドメインは、C1-INHのプロテアーゼ活性を担っている。P1-P1'は、Arg444-Thr445被切断結合を表す。

40

【0134】

グリコシル化タンパク質の重量のうちの26%超は炭水化物である。グリカンは、ヒトC1-INHの全体にわたって不均一に分布している。N末端は重度にグリコシル化されており、3つのN結合型（ダイヤモンド形の先端部を持つ長い垂直線として表示）炭水化

50

物基と少なくとも7つのO結合型（短い垂直線として表示）炭水化物基とを有する。3つのN結合型グリカンは、セルピンドメインのアスパラギン残基であるAsn216、Asn231、及びAsn330に結合している（ダイヤモンド形の先端部を持つ長い垂直線として表示）。極めて長くかつ重度にグリコシル化されたN末端ドメインの機能的役割は依然として不明ではあるが、これは、タンパク質の高次構造安定性、認識、エンドトキシン及びセレクチンに対する親和性、ならびにクリアランスに不可欠である可能性がある。炭水化物部分の固有の不均一性はC1-INH全体の不均一性の大きな原因となっており、血漿由来C1-INHの性質を模倣する組換えC1-INHの産生が困難である理由の1つになっている。

【0135】

本明細書で使用される場合、本発明のコンジュゲーション及び使用に適したC1-INHタンパク質は、実質上のC1-INH生物学的活性を保持する野生型または修飾型のアミノ酸配列（例えば、アミノ酸の変異、欠失、トランケーション、及び/または挿入を有するC1-INHタンパク質）を備えた、C1-INHポリペプチドまたはC1-INHドメインを含む。典型的には、C1-INHタンパク質は、組換え技術を用いて生成されるが、血漿由来である場合もある。

【0136】

一部の実施形態では、本発明に適したC1-INHポリペプチドまたはC1-INHドメインとして、以下の野生型ヒトC1-INHタンパク質（アミノ酸1～478）（アミノ酸1～97を下線引きで表示）に対して少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一または相同であるアミノ酸配列が挙げられる：

【化1】

NPNATSSSSQDPESLQDRGEGKVATTVISKMLFVEPILEVSSLPTTNSTNSATKITANTTDEPTTQPTTEPTTQPTIQPTQ
PTTQLPTDSPTQPTTGSFCGPGVTLCSDLSEHSTEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAG
 ENTKTNLESILSYPKDFTCVHQALKGFTTKGVTSVSIQIFHSPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWVAK
 NTNNKISRLLDSLPSDTRLVLLNAIYLSAKWKTTDFPKKTRMEPFHFKNVSVIKVPMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGGQLQLS
 HNLVILVLPQNLKHRLDMEQALSPSVFKAIMKLEMSKFQPTLLTLPRIKVTTSQDMLSIMEKLEFFDFSYDLNLCGLTE
 DPDLQVSAMQHQTIVLELTETGVEAAAAAISVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPA（配列番号1）。

【0137】

一部の実施形態では、本発明に適したC1-INHポリペプチドまたはC1-INHドメインとして、以下の成熟野生型ヒトC1-INHタンパク質（アミノ酸98～478）に対して少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一または相同であるアミノ酸配列が挙げられる：

【化2】

GSFCGPGVTLCSDLSEHSTEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTKTNLESILSYPK
 DFTCVHQALKGFTTKGVTSVSIQIFHSPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWVAKNTNNKISRLLDSLPS
 DTRLVLLNAIYLSAKWKTTDFPKKTRMEPFHFKNVSVIKVPMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGGQLQLSHNLVILVLPQNLKH
 RLEDMEQALSPSVFKAIMKLEMSKFQPTLLTLPRIKVTTSQDMLSIMEKLEFFDFSYDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTIVL
 ELTETGVEAAAAAISVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPA（配列番号2）

【0138】

一部の実施形態では、本発明に適したC1-INHポリペプチドまたはC1-INHドメインとして、E165Q変異（変異したアミノ酸を太字にし下線引きで表示）を有するヒトC1-INHタンパク質（アミノ酸1～478）に対して少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一または相同であるアミノ酸配列が挙げられる：

10

20

30

40

50

【化3】

NPNATSSSSQDPESLQDRGEGKVATTVISKMLFVEPILEVSSLPTTNSATKITANTTDEPTTQPTTEPTTQPTIQPTQ
 PTTQLPTDSPTQPTTGSFCGPGVTLCSDLSEHSTEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAG
ENTKTNLESILSYPKDFTCVHQALKGFTTKGVTSVSQIFHSPDLAIRDFTVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWVAK
 NTNNKISRLLDLSPLSDTRLVLLNAIYLSAKWKTTFDPKKTREMPFHFKNVSVIKVPMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGQLQLS
 HNLSLVILVPQNLKHRLDMEQALSPSVFKAIMEKLEMSKFQPTLLTLPRIKVTTSQDMLSIMEKLEFFDFSIDLNLCLGTE
 DPDFLQVSAMQHQTIVLELTETGVEAAAASAI SVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPA (配列番号3
 7)。

【0139】

10

一部の実施形態では、本発明に適したC1-INHポリペプチドまたはC1-INHドメインとして、E165Q変異(変異したアミノ酸を太字にし下線引きで表示)を有する成熟ヒトC1-INHタンパク質(アミノ酸98~478)に対して少なくとも50%(例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)同一または相同であるアミノ酸配列が挙げられる:

【化4】

GSFCGPGVTLCSDLSEHSTEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTKTNLESILSYPK
 DFTCVHQALKGFTTKGVTSVSQIFHSPDLAIRDFTVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWVAKNTNNKISRLLDLSPLS
 DTRLVLLNAIYLSAKWKTTFDPKKTREMPFHFKNVSVIKVPMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGQLQLSHNLSLVILVPQNLKH
 RLEDMEQALSPSVFKAIMEKLEMSKFQPTLLTLPRIKVTTSQDMLSIMEKLEFFDFSIDLNLCLGTEPDFLQVSAMQHQTIVL
 ELTETGVEAAAASAI SVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPA (配列番号38)。

20

【0140】

ヒトC1-INHタンパク質の相同体または類似体は、当業者に既知のポリペプチド配列変更方法(かかる方法をまとめた参考文献において参照されるものなど)により調製することができる。当業者には理解されるように、2つの配列は、それらに対応する位置に相同残基を含む場合、一般的に「実質的に相同」と考えられる。相同残基は同一残基であってもよい。代替的に、相同な残基は、非同一の残基であってもよく、構造的特徴および/または機能的特徴が適切に類似である。例えば、当業者には周知のとおり、ある特定のアミノ酸は、「疎水性」または「親水性」アミノ酸として、及び/または「極性」または「非極性」の側鎖を有するものとして分類されるのが典型的である。1つのアミノ酸を同じタイプの別のアミノ酸へと置換することは、「相同的」置換と見なされ得ることが多い。一部の実施形態では、アミノ酸の保存的置換には、以下の群内のアミノ酸間で行われる置換が含まれる:(a)M、I、L、V、(b)F、Y、W、(c)K、R、H、(d)A、G、(e)S、T、(f)Q、N、及び(g)E、D。一部の実施形態では、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸置換が行われる箇所ですタンパク質の相対的電荷またはサイズ特性が変更されないアミノ酸置換を意味する。

30

【0141】

この技術分野でよく知られているように、アミノ酸配列または核酸配列は、ヌクレオチド配列のBLASTN、およびアミノ酸配列のBLASTP、ギャップドBLAST、およびPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラムで利用可能なものを含む様々なアルゴリズムのいずれかを用いて比較することができる。こうしたプログラムの例は、Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinform

40

50

matics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; and Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999に記載されている。相同配列を同定することに加えて、上記のプログラムは、典型的には、相同性の程度の指標を提供する。

【0142】

一部の実施形態では、本発明に適したC1-INHポリペプチドまたはC1-INHドメインは、トランケートされたC1-INHタンパク質であり得る。例えば、本発明に適したC1-INHポリペプチドまたはC1-INHドメインとして、配列番号1、配列番号2、配列番号37、または配列番号38のうちのいずれかの一部または断片が挙げられる。

10

【0143】

C1-INH融合タンパク質

一部の実施形態では、本発明に従ってコンジュゲートされ得るC1-INHタンパク質にはC1-INH融合タンパク質が含まれる。C1-INH融合タンパク質は、C1-INHドメイン(C1-INHポリペプチドとも称される)と他のドメインまたは部分とを含み得るが、これらは通例、例えばC1-INHタンパク質の半減期、安定性、効力、及び/もしくは送達を増強もしくは増加させることにより、または免疫原性、クリアランス、もしくは毒性を低減もしくは排除することによって、C1-INHの治療効果を促すことができるものである。C1-INH融合タンパク質に好適なドメインまたは部分として、以下に限定されないが、Fcドメイン及びアルブミンドメインが挙げられる。好適な融合ドメインまたは部分(例えば、Fcドメインまたはアルブミンドメイン)は、直接的または間接的に、N末端、C末端に、もしくはC1-INHタンパク質内部に連結されるか、融合されるか、または結合され得る。以下のセクションでは、コンジュゲートされ得るC1-INH融合タンパク質の例を説明する。

20

【0144】

Fcドメイン

一部の実施形態では、好適なC1-INH融合タンパク質は、FcRn受容体に結合するFcドメインまたはその一部を含有する。非限定的な例として、好適なFcドメインは、IgGなどの免疫グロブリンのサブクラスに由来し得る。一部の実施形態では、好適なFcドメインは、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4に由来する。一部の実施形態では、好適なFcドメインは、IgM、IgA、IgD、またはIgEに由来する。特に好適なFcドメインとして、ヒト抗体またはヒト化抗体に由来するものが挙げられる。一部の実施形態では、好適なFcドメインは、修飾されたヒトFc部分などの修飾型Fc部分である。

30

【0145】

C1-インヒビターFc融合タンパク質は、図1に示すように、二量体として存在し得る。

40

【0146】

一部の実施形態では、本発明に適したFcドメインとして、以下の野生型ヒトIgG1のFcドメインに対して少なくとも50%(例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)同一であるアミノ酸配列が挙げられ得る：

【化5】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号3)。

50

【0147】

一部の実施形態では、好適なFcドメインは、補体活性化及び/または抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)活性(「エフェクター機能」とも称される)を低減または排除する1つ以上の変異を含み得る。例えば、好適なFcドメインは、EUナンバリングによるIgG1のL234A及びL235A(LALA)に対応する変異を含み得る。LALA変異(下線を引いた変異残基)を有するヒトIgG1のFcドメインの例を以下に示す:

【化6-1】

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号4)。

10

一部の実施形態では、本発明に適したFcドメインとして、配列番号4に対して少なくとも50%(例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)同一であるが、EUナンバリングによるIgG1のL234A及びL235A(LALA)に対応する変異を維持している、アミノ酸配列が挙げられる。

【0148】

FcドメインとFcRn受容体との間の結合を改良すると血清半減期が延びると考えられる。したがって、一部の実施形態では、好適なFcドメインは、FcRnへの結合の改良をもたらす1つ以上のアミノ酸変異を含む。FcRnへの結合の改良に影響を及ぼすFcドメイン内の様々な変異が当技術分野で知られており、これらを本発明の実施に適合させることができる。一部の実施形態では、好適なFcドメインは、EUナンバリングによる、ヒトIgG1のThr250、Met252、Ser254、Thr256、Thr307、Glu380、Met428、His433、及び/またはAsn434に対応する1つ以上の位置に1つ以上の変異を含む。

20

【0149】

例えば、好適なFcドメインは、H433K(His433Lys)及び/またはN434F(Asn434Phe)の変異を含有し得る。非限定的な例として、好適なFcドメインは、H433K(His433Lys)及びN434F(Asn434Phe)の変異を含有し得る。Fcドメインに含まれ得る追加的なアミノ酸置換としては、例えば、米国特許第6,277,375号、同第8,012,476号、及び同第8,163,881号に記載のものが挙げられ、これらの文献は参照により本明細書に援用される。

30

【0150】

一部の実施形態では、本発明に適したFcドメインとして、ヒトIgG1のFcドメインに対して少なくとも50%(例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)同一であるが、EUナンバリングによるヒトIgG1のThr250、Met252、Ser254、Thr256、Thr307、Glu380、Met428、His433、及び/またはAsn434に対応する1つ以上の変異(下記の下線部)を維持している、アミノ酸配列が挙げられる:

40

【化6-2】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALKFHYTQKSLSLSPGK (配列番号5)。

【0151】

一部の実施形態では、本発明に適したFcドメインとして、ヒトIgG1のFcドメインに対して少なくとも50%(例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)

50

0%) 同一であるが、EUナンバリングによる、IgG1のL234A及びL235A(LALA)に対応する変異、ならびにヒトIgG1のThr250、Met252、Ser254、Thr256、Thr307、Glu380、Met428、His433、及び/またはAsn434に対応する1つ以上の変異(下線を引いた変異残基)を維持している、アミノ酸配列が挙げられる:

【化7】

DKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALKFHYTQKLSLSLSPGK (配列番号6)。

10

【0152】

一部の実施形態では、IgG4に由来するFcドメインが本発明に使用される。いかなる理論に束縛されることを望むものではないが、IgG4は野生型のIgG1よりも補体活性化能が低いと報告されている。したがって、本発明の一部の実施形態では、野生型ヒトIgG4のFcドメインが用いられている。一部の実施形態では、本発明に適したFcドメインは、EUインデックスによるコアヒンジ領域の配列において、S228Pの置換に相当する変異を有するヒトIgG4由来である。この置換は、Kabataら(1987 Sequences of proteins of immunological interest, United States Department of Health and Human Services, Washington DC.)によればS241Pとも称されている。いかなる理論に束縛されることを望むものではないが、この置換は、ヒンジ領域のコアの配列を、野生型IgG1またはIgG2のアイソタイプ抗体の配列と同一にする効果を有し、IgG4抗体の相同形態を生成し、したがって、往々にしてヘテロ二量体のIgG4抗体を生成させる重鎖の解離及び再会合を阻害すると考えられる。さらに、IgG4由来のFcドメインは、高濃度での安定性のために用いられ得る。

20

【0153】

したがって、一部の実施形態では、本発明に適したFcドメインとして、以下の野生型ヒトIgG4のFcドメインに対して少なくとも50%(例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)同一であるアミノ酸配列が挙げられる:

30

【化8】

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (配列番号9)。

【0154】

一部の実施形態では、本発明に適したFcドメインとして、ヒトIgG4のFcドメインに対して少なくとも50%(例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)同一であるが、EUナンバリングのS241P置換に対応する変異(下線を引いた変異残基)を維持している、アミノ酸配列が挙げられる:

40

【化9】

ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (配列番号10)。

【0155】

一部の実施形態では、本明細書に記載のFcドメインはシグナルペプチドを含み得る。本発明に適したシグナルペプチドの例として、

50

【化10】

METPAQLLFLLLLWLPDTTG

に対して少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であるアミノ酸配列が挙げられる。

【0156】

例えば、好適なFcドメインは、シグナルペプチドを有しかつFcRn受容体への結合を増強する変異を有する（シグナルペプチドと変異残基を下線引きで表示）、ヒトIgG1のFcドメインに対して少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であるアミノ酸配列を備え得る：

10

【化11】

METPAQLLFLLLLWLPDTTGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALKFHYTKQSLSLSPGK（配列番号7）。

【0157】

一部の実施形態では、本発明に適したFcドメインとして、シグナルペプチドを有しかつLALAとFcRn受容体への結合を増強する変異（下線を引いた変異残基）とを有する、ヒトIgG1のFcドメインに対して少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であるアミノ酸配列が挙げられる：

20

【化12】

METPAQLLFLLLLWLPDTTGDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALKFHYTKQSLSLSPGK（配列番号8）。

30

【0158】

C1-INH-Fc融合タンパク質の例

特定の実施形態では、好適なC1-INH融合タンパク質は、C1-INHポリペプチドまたはC1-INHドメインとFcドメインとを含む。一部の実施形態では、好適なC1-INH融合タンパク質は、C1-INHポリペプチドまたはC1-INHドメインをFcドメインに会合させるリンカーを含む。特定の実施形態では、図2に示すように、Fc部分は完全長（1~478aa）ならびに成熟（98~478）C1-インヒビターのN末端領域に直接融合されてもよい。非限定的な例として、好適なC1-INH-Fc融合タンパク質は、以下に示すアミノ酸配列を有し得る：

【化 1 3 - 1】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKNPNATSSSSQDPESLQDRG
 EGKVATTVISKMLFVEPILEVSSLPTNSTNSATKITANTTDEPTTQPTTEPTTQPTIQPTQPTTQLPTDSPTQPTTGSFC
 PGPVTLCSDLSEHSTEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTKTNLESILSYPKDFTC
 VHQALKGFTTKGVTSVSQIFHSPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWAKNTNKKISRLDLSLPSDTRL
 VLLNAIYLSAKWKTTFDPKKTRMEPFHFKNVSVIKVPMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGQLQLSHNLSLVILVPQNLKHRLED
 MEQALSPSVFKAIMEKLEMSKFQPTLLTLPRIKVTTSDMLSIMEKLEFFDFSIDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTIVLELTE
 TGVEAAAASAVISVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPA (配列番号 1 1)

10

または

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSFCPGPVTLCSDLSEHST
 EAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTKTNLESILSYPKDFTCVHQALKGFTTKGVTS
 VSQIFHSPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWAKNTNKKISRLDLSLPSDTRLVLLNAIYLSAKWKTT
 FDPKKTRMEPFHFKNVSVIKVPMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGQLQLSHNLSLVILVPQNLKHRLEDMEQALSPSVFKAIME
 KLEMSKFQPTLLTLPRIKVTTSDMLSIMEKLEFFDFSIDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTIVLELTETGVEAAAASAVISVAR
 TLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPA (配列番号 1 2)

20

または

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKNPNATSSSSQDPESLQDRG
 EGKVATTVISKMLFVEPILEVSSLPTNSTNSATKITANTTDEPTTQPTTEPTTQPTIQPTQPTTQLPTDSPTQPTTGSFC
 PGPVTLCSDLSEHSTEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTKTNLESILSYPKDFTC
 VHQALKGFTTKGVTSVSQIFHSPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWAKNTNKKISRLDLSLPSDTRL
 VLLNAIYLSAKWKTTFDPKKTRMEPFHFKNVSVIKVPMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGQLQLSHNLSLVILVPQNLKHRLED
 MEQALSPSVFKAIMEKLEMSKFQPTLLTLPRIKVTTSDMLSIMEKLEFFDFSIDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTIVLELTE
 TGVEAAAASAVISVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPA (配列番号 1 3)

30

または

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSFCPGPVTLCSDLSEHST
 EAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTKTNLESILSYPKDFTCVHQALKGFTTKGVTS
 VSQIFHSPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWAKNTNKKISRLDLSLPSDTRLVLLNAIYLSAKWKTT
 FDPKKTRMEPFHFKNVSVIKVPMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGQLQLSHNLSLVILVPQNLKHRLEDMEQALSPSVFKAIME
 KLEMSKFQPTLLTLPRIKVTTSDMLSIMEKLEFFDFSIDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTIVLELTETGVEAAAASAVISVAR
 TLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPA (配列番号 1 4)

40

または

【化 1 3 - 2】

ESKYGPCPCSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKPNATSSSSQDPESLQD
 RGEQKVAATVISKMLFVEPILEVSSLPTTSTNSATKITAANTDEPTTQPTTEPTTQPTIQPTQPTTQLPTDSPTQPTTGS
 FCPGPVTLCSDLSESHSTEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTKTNLESILSYPKDF
 TCVHQALKGFTTKGVTSVSQIFHSPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWVAKNTNKKISRLLDLSPSDT
 RLVLNNAIYLSAKWKTTFDPKTRMEPFHFKNVSVIKVPMNSKYPVAHFIDQTLKAKVGGQLQLSHNLSLVILVPQNLKHLR
 EDMEQALSPSVFKAIMKLEMSKFQPTLLTLPRIKVTTSDMLSIMKLEFFDFSYDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTVELEL
 TETGVEAAAASAI SVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPA (配列番号 3 2)

10

または

ESKYGPCPCSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKSFPCPGPVTLCSDLSESH
 STEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTKTNLESILSYPKDFTCVHQALKGFTTKGV
 TSVSQIFHSPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWVAKNTNKKISRLLDLSPSDTRLVLNNAIYLSAKWK
 TTFDPKTRMEPFHFKNVSVIKVPMNSKYPVAHFIDQTLKAKVGGQLQLSHNLSLVILVPQNLKHLREDMEQALSPSVFKAI
 MEKLEMSKFQPTLLTLPRIKVTTSDMLSIMKLEFFDFSYDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTVELEL TETGVEAAAASAI SV
 ARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPA (配列番号 3 3)

20

または

ESKYGPCPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKSFPCPGPVTLCSDLSESH
 RGEQKVAATVISKMLFVEPILEVSSLPTTSTNSATKITAANTDEPTTQPTTEPTTQPTIQPTQPTTQLPTDSPTQPTTGS
 FCPGPVTLCSDLSESHSTEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTKTNLESILSYPKDF
 TCVHQALKGFTTKGVTSVSQIFHSPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWVAKNTNKKISRLLDLSPSDT
 RLVLNNAIYLSAKWKTTFDPKTRMEPFHFKNVSVIKVPMNSKYPVAHFIDQTLKAKVGGQLQLSHNLSLVILVPQNLKHLR
 EDMEQALSPSVFKAIMKLEMSKFQPTLLTLPRIKVTTSDMLSIMKLEFFDFSYDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTVELEL
 TETGVEAAAASAI SVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPA (配列番号 1 5)

30

または

ESKYGPCPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKSFPCPGPVTLCSDLSESH
 STEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTKTNLESILSYPKDFTCVHQALKGFTTKGV
 TSVSQIFHSPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWVAKNTNKKISRLLDLSPSDTRLVLNNAIYLSAKWK
 TTFDPKTRMEPFHFKNVSVIKVPMNSKYPVAHFIDQTLKAKVGGQLQLSHNLSLVILVPQNLKHLREDMEQALSPSVFKAI
 MEKLEMSKFQPTLLTLPRIKVTTSDMLSIMKLEFFDFSYDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTVELEL TETGVEAAAASAI SV
 ARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPA (配列番号 1 6)。

40

【 0 1 5 9 】

一部の実施形態では、好適な C 1 - I N H - F c 融合タンパク質は、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 3 2、または配列番号 3 3 に対して少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、またはそれ以上相同または同一であるアミノ酸配列を有する。

【 0 1 6 0 】

C 1 - I N H - F c 融合タンパク質は、ホモ二量体または単量体の構成を含めた様々な構成で提供され得ることが考慮される。例えば、好適なホモ二量体構成は、融合パートナー（例えば、C 1 - I N H ポリペプチド + リンカー）の C 末端が両方の F c ポリペプチド鎖の N 末端に結合するように設計され得る。好適な単量体構成は、融合パートナー（例え

50

ば、C1-INHポリペプチド+リンカー)のC末端が1つのFc二量体に融合するように設計され得る。

【0161】

単量体形態は、本明細書において一価形態とも称されるが、特定の用途、及び特定の投与経路(例えば、皮下投与)に使用され得る。単量体構成は、立体障害を減らし、半減期を増加させる、及び/または生物学的利用度を増加させることができる。

【0162】

いかなる理論に束縛されることを望むものではないが、C1-INHが自殺インヒビターであるために、一価形態はC1-INH-Fc融合構築物に特に有用である可能性があると考えられる。C1-INHは自殺インヒビターであるので、二量体のFc融合のうち1つのC1-INH「アーム」の結合によって、別のアームが結合されていない状態であっても、結合C1-INH融合タンパク質のクリアランス量が増えることになる。

10

【0163】

Fc融合タンパク質の利点は、単量体であれ二量体であれ、Fcの発現が、C1-INH単体の発現よりも高レベルで生じると判明したことである。二量体のC1-INH-Fc構築物とFc融合を含まないC1-INHとの比較を行う活性アッセイによると、同様のC1q結合活性を有することが示されていた。リンカーを含めた場合も評価し、C1-INH-Fc融合タンパク質がその標的を結合させる性能に影響を与えないことがわかっていた。

【0164】

単量体抗体融合タンパク質を作製する方法としては、例えば、PCT国際公開第2011/063348号、同第2012/020096号、同第2013/138643号、同第2014087299号、Dumont, J. et al., Monomeric Fc Fusions: Impact on Pharmacokinetic and Biological Activity of Protein Therapeutics, *Biodrugs*, 20(3): 151-160 (2006)、Ishino, T. et al., Protein Structure and Folding: Half-life Extension of Biotherapeutics Modality by N-Glycosylation for the Engineering a Monomeric Fc Domain, *J. Biol. Chem.*, 288: 16529-16537 (2013)に記載された方法が挙げられる。

20

30

【0165】

一価のC1-インヒビターは、Fc単体を発現するプラスミドと同時トランスフェクトされる、Fc-C1を含むプラスミドを用いることによって作製され得る。さらに、一方のFc-C1生成プロモーターと他方のFc単体生成プロモーターとを有する2つのプロモータープラスミドを用いることによっても作製できるであろう。一価のFcはまた、Fcのヒンジ領域の特定のアミノ酸を変異させてFc領域の安定性を付与する、二重特異性技術(例えば、一価C1の形成を促進させるノブ・アンド・ホール技術または他の安定化変異)を用いて作製することもできるであろう。

【0166】

アルブミンドメイン

一部の実施形態では、好適なC1-INH融合タンパク質はアルブミンドメインを含有する。アルブミンは可溶性であり、血清タンパク質の約半分を含む単量体タンパク質である。アルブミンは、主に、ステロイド、脂肪酸、及び甲状腺ホルモンのキャリアタンパク質として機能し、細胞外液量の安定化に役立つものである。アルブミンは、分子量が66,500の球状の非グリコシル化血清タンパク質を有する。アルブミンは、N末端ペプチドを有するプレプロアルブミンとして肝臓で合成され、該ペプチドが除去された後に、新生タンパク質が粗面小胞体から放出される。次に、その産物であるプロアルブミンがゴルジ小胞で切断されて、分泌アルブミンを産生する。

40

【0167】

50

アルブミンは3つの相同ドメイン(I~III)で構成されており、その各々は2つのサブドメイン(A及びB)から構成されている。ヒト血清アルブミンへの主要なリガンド結合領域は、サブドメインIIA及びIIIAにおける空洞に位置し、その大部分が疎水性残基及び正荷電残基で形成されており、類似した化学的性質を呈している。ヒト血清アルブミンは585個のアミノ酸と、66,500Daの分子質量を有する。アミノ酸は35個のシステインを含み、そのうちの1つを除いて全てが17個の安定化ジスルフィド結合の形成に参与している。

【0168】

アルブミンは19日の長時間にわたる血清半減期を有するのが典型的である。FcRnはアルブミンの長い血清半減期を制御する。FcRnは、アルブミンに加えてIgGをも結合させる二重結合受容体であり、細胞内分解から両方のタンパク質を保護するものである。アルブミン分子のC末端ドメインは、FcRnに結合するために重要であることが判明している。詳細には、ドメインIIIBがFcRnに結合するために重要であることが判明している。一部の実施形態では、ドメインIIIBの欠如、または464His、510His、及び535Hisの変異は、FcRn結合を阻止する。

10

【0169】

本発明のアルブミン融合タンパク質は単量体であるのが典型的である。一部の実施形態では、この特徴は、単量体Fc融合の実施形態に関して上述した理由から、二量体Fc融合の実施形態よりも有利であり得る。

【0170】

一部の実施形態では、本発明に適したアルブミンポリペプチドとして、以下の野生型ヒト血清アルブミンに対して少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であるアミノ酸配列が挙げられる：

20

【化14】

MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDDAHKSEVAHRFKDLGEEFNKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
AENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYL
EIARRHPYFYAPPELLFFAKRYKAAFTCECCQAADKAACLLPKLDLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQR
FPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS
LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVL LRLAKTYKTTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN
LIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTP
VSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
FAAFVEKCKKADDKETCFAEKGKLVAAASRAALGL（配列番号17）。

30

【0171】

一部の実施形態では、本発明に適したアルブミンポリペプチドとして、以下の野生型ヒト血清アルブミンのD3ドメインに対して少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であるアミノ酸配列が挙げられる：

【化15】

METPAQLLFLLLLWLPD TTGV EEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEKGKLVAAASRAALGL（配列番号20）。

40

【0172】

リンカーまたはスペーサー

C1-INHポリペプチドまたはC1-INHDドメインは、Fcドメインまたはアルブミンドメインに、直接的または間接的に結合され得る。一部の実施形態では、好適なC1-INH融合タンパク質は、C1-INHポリペプチドまたはC1-INHDドメインと、Fcドメインまたはアルブミンドメインとを連結させるリンカーまたはスペーサーを含む

50

。アミノ酸のリンカーまたはスペーサーは、概して、可撓性があるように、またはアルファヘリックスなどの構造を2つのタンパク質部分の間に挿入するように設計されている。リンカーまたはスペーサーは、比較的短くてもよく、または長くてもよい。典型的には、リンカーまたはスペーサーは、例えば、長さ3～100（例えば、5～100、10～100、20～100、30～100、40～100、50～100、60～100、70～100、80～100、90～100、5～55、10～50、10～45、10～40、10～35、10～30、10～25、10～20）のアミノ酸を有する。一部の実施形態では、リンカーまたはスペーサーは、長さ2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、15以上、20以上、25以上、30以上、35以上、40以上、45以上、50以上、55以上、60以上、65以上、70以上、75以上、80以上、85以上、90以上、95以上、または100以上のアミノ酸である。長いリンカーは通例、立体障害を減らし得る。一部の実施形態では、リンカーは、グリシン残基及びセリン残基の混合物を含むことになる。一部の実施形態では、リンカーはさらに、スレオニン残基、プロリン残基、及び/またはアラニン残基を含み得る。したがって、一部の実施形態では、リンカーは、10～100個、10～90個、10～80個、10～70個、10～60個、10～50個、10～40個、10～30個、10～20個、10～15個のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、リンカーは、少なくとも10個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、または95個のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、リンカーは、ALEVLFQGP（配列番号37）からなるリンカーではない。

10

20

【0173】

非限定的な例として、本発明に好適なリンカーまたはスペーサーとしては、以下に限定するものではないが、GGGリンカーとGGGGS（GGGS）2リンカー、配列番号27）が挙げられる。一部の実施形態では、リンカーは、配列GGG及び/または配列番号27の配列を含む。

【0174】

他の好適なリンカーとして、

【化16】

GAPGGGGGAAAAAGGGGGGGAP（GAGリンカー、配列番号34）、GAPGGGGGAAAAAGGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGGAP（GAG2リンカー、配列番号35）、及びGAPGGGGGAAAAAGGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGGAP（GAG3リンカー、配列番号36）

30

が挙げられる。

【0175】

好適なリンカーまたはスペーサーとして、上記の例示的なリンカー、例えば、GGGリンカー、GGGGS（GGGS）2リンカー、配列番号27）、GAGリンカー（配列番号34）、GAG2リンカー（配列番号35）、またはGAG3リンカー（配列番号36）に対して、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上相同または同一であるアミノ酸配列を有するものが挙げられる。一部の実施形態で使用するのに好適なさらなるリンカーは、2012年3月2日に出願された米国特許出願公開第2012/0232021号に見い出すことができ、この出願の開示はその全体が参照により本明細書に援用される。

40

【0176】

通例、リンカーとして、C1-INHポリペプチドまたはC1-INHドメインが同種

50

リガンド（例えば、C1sなど）のいずれかに結合する性能に実質的に影響を与えるかまたは該性能を実質的に低減させることなく、C1-INHポリペプチドまたはC1-INHドメインをFcドメインまたはアルブミンドメインに会合させるリンカーが挙げられる。

【0177】

C1-INHタンパク質のグリコシル化/グリカンマッピング（プロファイル）

本発明によると、C1-INHタンパク質は、グリカン残基及び/またはアミン基を介してコンジュゲートされ得る。詳細には、C1-INHタンパク質は、例えばシアル酸残基またはガラクトース残基などのグリカン残基でコンジュゲートされ得る。したがって、本発明のコンジュゲーションに適したC1-INHタンパク質は、特有のグリカンマップ、詳細にはシアル酸含有量で特徴付けられ得る。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、血漿由来C1-INHのグリコシル化プロファイルと同様のグリコシル化プロファイルを有する。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、血漿由来C1-INHのグリコシル化プロファイルとは異なるグリコシル化プロファイルを有する。

10

【0178】

いかなる理論に束縛されることを望むものではないが、枝分かれ構造という形状や複雑性を伴うグリカン結合を含むグリカンマップは、*in vivo*クリアランス、生物学的利用度、及び/または有効性に影響を及ぼし得ると考えられる。

【0179】

グリカンマップは、通例、酵素消化法及びそれに続くクロマトグラフィー分析によって測定され得る。種々の酵素を酵素消化法に用いることができ、酵素には、好適であるグリコシラーゼ、ペプチダーゼ（例えば、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼ）、プロテアーゼ、及びホスファターゼが含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、好適な酵素はアルカリホスファターゼである。一部の実施形態では、好適な酵素はノイラミニダーゼである。グリカンはクロマトグラフィー分析によって検出され得る。例えば、グリカンは、パルスアンペロメトリック検出を備えた高速陰イオン交換クロマトグラフィー（HPAE-PAD）か、またはサイズ排除高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって検出され得る。グリカンマップの各ピークにより表されるグリカンの量は、当該技術分野で既知の方法及び本明細書で開示された方法に従って、グリカンの検量線を用いて計算することができる。

20

30

【0180】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質はグリカンマップで特徴付けられ得る。各ピーク群に対応するグリカンの相対量は、既定の参照標準での該当ピーク群の面積に対する該各ピーク群の面積に基づいて算出することができる。グリカンマッピング用の種々の参照標準が当該技術分野で知られており、本発明の実施に用いることができる。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、中性、モノシアル化、ジシアル化、トリシアル化、またはテトラシアル化のC1-INHタンパク質を示すピーク群から選択される5つ以下のピーク群を含むグリカンマップで特徴付けられ得る。

【0181】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、中性グリカン種、モノシアル化種、ジシアル化種、トリシアル化種、及び/またはテトラシアル化種のうちの少なくとも1種を含むグリコシル化プロファイルを有する。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、中性グリカン種、モノシアル化種、ジシアル化種、トリシアル化種、及びテトラシアル化種を含むグリコシル化プロファイルを有する。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、約50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下の中性グリカン種を含むグリコシル化プロファイルを有する。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、約5%～約30%の中性グリカン種を含むグリコシル化プロファイルを有する。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、約5%～約25%の中性グリカン種を含むグリコシル化プロファイルを有する。一部の実施形態では、C1-INHタ

40

50

ンパク質は、約10%～約20%の中性グリカン種を含むグリコシル化プロファイルを有する。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、平均して、1分子当たり少なくとも約80%（例えば、1分子当たり約85%超、90%超、95%超、または99%超）の荷電グリカンを含む。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、約10%～約30%のモノシアリル化種を含むグリコシル化プロファイルを有する。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、約30%～約50%のジシアリル化種を含むグリコシル化プロファイルを有する。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、約15%～約35%のトリシアリル化種を含むグリコシル化プロファイルを有する。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、約5%～約15%のテトラシアリル化種を含むグリコシル化プロファイルを有する。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、30%以下の中性グリカン種、約20%～約30%のモノシアリル化グリカン種、約30%～約40%のジシアリル化グリカン種、約10%～約20%のトリシアリル化グリカン種、及び約5%～約10%のテトラシアリル化グリカン種を含むグリコシル化プロファイル

10

20

30

40

50

【0182】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、血漿由来C1-INHのシアリル化プロファイルと同様のシアリル化プロファイルを有する。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、血漿由来C1-INHのシアリル化プロファイルとは異なるシアリル化プロファイルを有する。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、半減期を血漿由来C1-INHの半減期と同様にするかまたは該半減期よりも長くする、シアリル化プロファイル

【0183】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、約20%未満、15%未満、10%未満、または5%未満の、マンノース、 α -ガラクトース、N-グリコシルノイラミン酸(NGNA)、またはオリゴマンノース型のグリコシル化のうちの一つ以上を含有する。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、約20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下の、マンノース、 α -ガラクトース、N-グリコシルノイラミン酸(NGNA)、またはオリゴマンノース型のグリコシル化のうちの一つ以上を含有する。

【0184】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質は、免疫原性ではないグリコシル化プロファイル

【0185】

タンパク質のグリコシル化プロファイルを操作する様々な方法が当該技術分野で知られている。これらの方法に加えて、まだ見出されていない他の方法も、本発明により考慮される。本発明のC1-INHタンパク質及びポリペプチドのグリコシル化プロファイルを操作する方法には、*in vitro*、*in situ*、及び*in vivo*での方法が含まれる。一部の実施形態では、発現したタンパク質またはポリペプチドのグリコシル化プロファイルは、発現したタンパク質またはポリペプチドの発現後化学修飾により変わる

。一部の実施形態では、細胞培養条件は、所望のグリコシル化プロファイルを有するタンパク質を発現させるように操作される。これらの細胞培養条件には、培養の期間、培養培地への添加物、及び/またはグリコシル化を増やすための遺伝子の共発現を含めた、産生及び培養プロセスの制御が含まれる。宿主細胞、及び形質移入された宿主細胞の特異的クローンの選択も、グリコシル化を増大させるために利用されてもよい。グリコシル化を増やすいくつかの方法として、所望のグリコシル化プロファイルを有するタンパク質またはポリペプチドを濃縮する精製プロセスが挙げられる。

【0186】

一部の実施形態では、C1-INHタンパク質を発現するように操作された細胞は、グリコシル化を改変するように、詳細には、発現したC1-INHのシアリル化を増加させるようにも操作され得る。例えば、細胞は、グリコシル化経路で異種酵素を発現して（野生型または変異型）、所望のグリコシル化を実現する（例えば、シアリル化を増加させる）ように操作され得る。一部の実施形態では、細胞はまた、内因性酵素を過剰発現して、所望のグリコシル化を実現する（例えば、シアリル化を増加させる）ように操作され得る。一部の実施形態では、細胞は、シアリル化を低減、阻害、もしくは劣化させる内因性酵素の発現を低減させるか、または妨げるように（例えば、アンチセンス構築物を用いて）操作されている。

10

【0187】

本明細書に記載される種々のグリコシル化パターン/グリカンマップ、特にシアリル化プロファイルまたはシアリル化レベルは、C1-INHドメイン単体またはC1-INHポリペプチド単体に適用可能であるか、または融合タンパク質の状況（例えば、C1-INH-Fc融合タンパク質またはC1-INH-アルブミン融合タンパク質）で適用可能である。本明細書に記載されるグリコシル化パターン/グリカンマップ、特にシアリル化プロファイルまたはシアリル化レベルを有するC1-INHタンパク質は、コンジュゲートされる場合もあり、コンジュゲートされない場合もある。所望のシアリル化プロファイルまたはレベルを含めた所望のグリコシル化パターン/グリカンマップは、C1-INHタンパク質の*in vivo*半減期を伸ばすことができると考えられる。詳細には、所望のシアリル化プロファイルまたはレベルを含めた所望のグリコシル化パターン/グリカンマップは、Fc融合またはアルブミン融合と組み合わせると、コンジュゲートされない場合であっても、本出願に記載のC1-INHタンパク質の望ましい*in vivo*半減期を実現することができる。しかしながら、コンジュゲーション（例えばPEG化）によって、所望のグリコシル化パターンまたはシアリル化レベルを有するC1-INHタンパク質を含めたC1-INHタンパク質の*in vivo*半減期がさらに長くなる。

20

30

【0188】

PEG化

本発明によると、ある化学的部分または生物学的部分が、本明細書に記載のC1-INHタンパク質に、直接的または間接的にコンジュゲートされ得る。詳細には、こうした部分は、ポリエチレングリコール（PEG）部分であり、これには、以下に限定されないが、モノPEG部分またはポリ（例えば2つ～4つの）PEG部分が含まれる。本明細書で使用される場合、PEG部分を、あるタンパク質に直接的または間接的にコンジュゲートするプロセスはPEG化と称される。PEG化は、本明細書に記載されるように、C1-INHの半減期の増加をもたらすことができる。

40

【0189】

PEG化は、当該技術分野で既知の任意の好適な反応によって実施され得る。PEG化タンパク質を調製する方法には、通例、（a）ポリペプチドをポリエチレングリコール（PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）と、ポリペプチドが1つ以上のPEG基に結合するようになる条件下で反応させることと、（b）その反応物を得ることとが含まれ得る。反応条件は、一般的に、既知のパラメータ及び所望の結果に基づいて個別に決定され得る。

【0190】

50

当業者に使用可能な多くのPEG結合方法があり、例えば、欧州特許第0401384号、Malik et al., Exp. Hematol., 20:1028-1035 (1992)、欧州特許第0154316号、欧州特許第0401384号、国際公開第92/16221号、及び国際公開第95/34326号に記載されている。例えば、本明細書に記載の治療用分子をPEG化する工程は、反応性ポリエチレングリコール分子とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。

【表1】

| 標的部位 | 活性化PEG |
|-----------------------------|---|
| N末端アミノ基 | PEG-NHS、PEG-アルデヒド、PEG-p-ニトロフェニルオキシカルボニル |
| リジンの-NH ₂ | PEG-NHS、PEG-アルデヒド、PEG-p-ニトロフェニルオキシカルボニル |
| カルボキシル基 | PEG-NH ₂ |
| チオール/システイン | PEG-マレイミド、PEG-ヨードアセトアミド |
| グリカン/アルデヒド (シアル酸及び末端ガラクトース) | PEG-アミノキシ、PEG-ヒドラジド |

10

20

30

40

50

【0191】

一部の実施形態では、コンジュゲーション用のPEG部分は活性化PEGである。例えば、好適なPEG部分はアミノキシ官能基を含み得る。一部の実施形態では、好適なPEG部分はヒドラジド官能基を含み得る。一部の実施形態では、好適なPEG部分は、マレイミド官能基またはヨードアセトアミド官能基を含み得る。一部の実施形態では、好適なPEG部分はN-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHS)を含み得る。したがって、PEG部分は、オキシム結合、アミド結合、ヒドラゾン結合、チオエーテル結合、または他の種類の結合を介して、C1-INHタンパク質にコンジュゲートされ得る。

【0192】

一部の実施形態では、PEG部分は直鎖構造または分岐構造を有し得る。例えば、PEG部分は、2本、3本、4本、または5本のアーム分岐を有し得る。好適なPEG-NHS部分として、直鎖PEG-NHS1K、直鎖PEG-NHS2K、直鎖PEG-NHS5K、分岐鎖PEG-NHS5K、分岐鎖PEG-NHS20K、または分岐鎖PEG-NHS40Kが挙げられ得る。さらなる例としては、PEG-アミノキシ部分として、直鎖または分岐鎖のPEG-アミノキシ2K、PEG-アミノキシ5K、PEG-アミノキシ5K、PEG-アミノキシ10K、PEG-アミノキシ20K、またはPEG-アミノキシ40Kが挙げられ得る。

【0193】

一部の実施形態では、PEGは、C1-INHタンパク質の1つ以上のアミノ酸残基を介してC1-INHにコンジュゲートされる。図3を参照されたい。

【0194】

一部の実施形態では、PEGは、C1-INHタンパク質の1つ以上のガラクトース残基を介してC1-INHにコンジュゲートされる。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質の1つ以上のガラクトース残基を酸化した後に、PEGがそのガラクトース残基にコンジュゲートされる。

【0195】

一部の実施形態では、PEGは、C1-INHタンパク質の1つ以上のシアル酸残基を介してC1-INHにコンジュゲートされる。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質の1つ以上のシアル酸残基を酸化した後に、PEGがそのシアル酸残基にコンジュゲートされる。

【0196】

一部の実施形態では、PEGは酸化したシアル酸にオキシム結合を介してコンジュゲートされる。一部の実施形態では、PEGは酸化したシアル酸にヒドラゾン結合を介してコンジュゲートされる。

【0197】

C1-INHタンパク質は、本発明に従って様々なレベルでPEG化され得る。例えば、PEG:C1-INHのモル比は、約5:1~100:1、約10:1~100:1、約15:1~100:1、約20:1~100:1、約25:1~100:1、約30:1~100:1、約40:1~100:1、約50:1~100:1、約10:1~90:1、約10:1~80:1、約10:1~70:1、約10:1~60:1、約10:1~50:1、約10:1~40:1、約15:1~35:1、または約20:1~30:1の範囲になり得る。一部の実施形態では、PEG:C1-INHのモル比は、少なくとも約1:1、少なくとも約5:1、少なくとも約10:1、少なくとも約15:1、少なくとも約20:1、少なくとも約25:1、少なくとも約30:1、少なくとも約35:1、少なくとも約40:1、少なくとも約45:1、または少なくとも約50:1であり得る。

【0198】

一部の実施形態では、PEG:シアル酸のモル比は、少なくとも約1:1、少なくとも約1:5、少なくとも約1:10、少なくとも約1:15、少なくとも約1:20、少なくとも約1:25、少なくとも約1:30、少なくとも約1:35、少なくとも約1:40、少なくとも約1:45、少なくとも約1:50である。一部の実施形態では、PEG:シアル酸のモル比は、約1:1~1:50、約1:1~1:45、約1:1~1:40、約1:1~1:35、約1:1~1:30、約1:1~1:25、約1:1~1:20、約1:1~1:15、約1:1~1:10、または約1:1~1:5である。

【0199】

ポリシアル酸コンジュゲーション

ポリシアル酸(PSA)は、コロミン酸(CA)とも称され、天然に存在する多糖類である。これは、(2,8)ケトシド結合を有するN-アセチルノイラミン酸のホモポリマーであり、ピシナルジオール基をその非還元末端に含む。また、負に帯電しており、ヒトの身体の天然成分である。

【0200】

PSAはN-アセチルノイラミン酸のポリマー(通例ホモポリマー)からなる。その第二級アミノ基は通常アセチル基を持つが、代わりにグリコシル基を持つ場合もある。ヒドロキシル基の置換基になり得るものとして、アセチル基、ラクチル基、エチル基、硫酸基、及びリン酸基が挙げられる。

【0201】

PSA及び修飾型PSA(mPSA)は、通例、2,8-グリコシド結合もしくは2,9-グリコシド結合またはこれらの組み合わせ(例えば、交互の2,8-結合と2,9-結合)によって連結されたN-アセチルノイラミン酸部分から本質的になる直鎖ポリマーを含む。一部の実施形態では、PSAとmPSAのグリコシド結合は2,8である。こうしたPSA及びmPSAはコロミン酸に由来する。典型的なPSA及びmPSAは、少なくとも2個、好ましくは少なくとも5個、より好ましくは少なくとも10個、最も好ましくは少なくとも20個のN-アセチルノイラミン酸部分を含む。したがって、これらは、2個~300個のN-アセチルノイラミン酸部分、好ましくは5個~200個のN-アセチルノイラミン酸部分、または最も好ましくは10個~100個のN-アセチルノイ

10

20

30

40

50

ラミン酸部分を含み得る。P S A 及び C A は、好ましくは、N - アセチルノイラミン酸以外の糖部分を本質的に含まない。一部の実施形態では、P S A は、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、及び / または少なくとも 98 % の N - アセチルノイラミン酸部分を含む。

【 0 2 0 2 】

P S A が N - アセチルノイラミン酸以外の部分を含む場合（例えば m P S A におけるように）、これらはポリマー鎖の末端の一方または両方に位置することが好ましい。こうした「他の」部分は、例えば、酸化または還元によって末端 N - アセチルノイラミン酸部分から誘導された部分であってもよい。

【 0 2 0 3 】

例えば、国際公開第 2 0 0 1 / 0 8 7 9 2 2 号には、非還元末端 N - アセチルノイラミン酸単位が過ヨウ素酸ナトリウムとの反応によってアルデヒド基に変換された m P S A について記載されている。さらに、国際公開第 2 0 0 5 / 0 1 6 9 7 4 には、還元末端 N - アセチルノイラミン酸単位が還元を受けて、該還元末端 N - アセチルノイラミン酸単位で還元的に開環し、それによりピシナルジオール基が形成され、続いて酸化されて、ピシナルジオール基をアルデヒド基に変換した m P S A について記載されている。

【 0 2 0 4 】

様々な P S A 誘導体が、非還元末端に単一アルデヒド基を含む酸化された P S A から調製され得る。アミノオキシ P S A の調製については、例えば国際公開第 2 0 1 2 / 1 6 6 6 2 2 号に記載されており、その内容は参照により本明細書に援用される。末端アミノ基を含む P S A - N H ₂ は、N H ₄ C l と、P S A - N H ₂ を 2 - イミノチオラン（トラウト試薬）と反応させて生じる末端スルフヒドリル基を含む P S A - S H と、を用いた還元的アミノ化により調製することができ、両方の手順は米国特許第 7 , 6 4 5 , 8 6 0 B 2 号に記載されている。P S A ヒドラジンは、米国特許第 7 , 8 7 5 , 7 0 8 B 2 号に従って、酸化した P S A とヒドラジンの反応によって調製され得る。P S A ヒドラジドは、酸化した P S A とアジピン酸ジヒドラジドとの反応によって調製され得る（国際公開第 2 0 1 1 / 0 1 2 8 5 0 A 2 号）。

【 0 2 0 5 】

コロミン酸（P S A のサブクラス）は、（ 2 8 ）ケトシド結合を有する N - アセチルノイラミン酸（N A N A）のホモポリマーであり、中でも、K 1 抗原を持つ大腸菌の特定の株により産生される。コロミン酸は、多くの生理的機能を有する。これらは、薬剤及び化粧品の原材料として重要である。

【 0 2 0 6 】

本明細書で使用される場合、「シアル酸部分」は、シアル酸モノマーまたはポリマー（「多糖類」）を含み、これらは、水溶液または水性懸濁液に可溶であり、P S A - 血液凝固タンパク質コンジュゲートを薬学的有効量で投与する際に、哺乳類に副作用などの悪影響をほとんど及ぼさないか、または全く及ぼさないものである。そのポリマーは、一態様では、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、1 0 個、2 0 個、3 0 個、4 0 個、5 0 個、6 0 個、7 0 個、8 0 個、9 0 個、1 0 0 個、2 0 0 個、3 0 0 個、4 0 0 個、または 5 0 0 個のシアル酸単位を有するとして特徴付けられる。特定の態様では、様々なシアル酸単位が鎖に結合される。

【 0 2 0 7 】

一部の実施形態では、多糖類化合物のシアル酸部分の親水性が高く、別の実施形態では化合物全体の親水性が高い。親水性は、主に、シアル酸単位のペンダントカルボキシル基によって付与され、ヒドロキシル基によっても同様に付与される。糖単位は、アミン基、ヒドロキシル基、もしくは硫酸基、またはそれらの組み合わせなどの他の官能基を含んでもよい。これらの基は、天然に存在する糖化合物に存在してもよく、誘導体の多糖類化合物に導入されてもよい。

【 0 2 0 8 】

天然に存在するポリマー P S A は、幅広いサイズ分布（例えば、S i g m a C - 5 7

10

20

30

40

50

62)と高い多分散性(PD)とを示す多分散調製物として使用可能である。多糖類は通常、エンドトキシンを共精製するという固有のリスクを持つバクテリアで産生されるため、長いシアル酸ポリマー鎖の精製によって、エンドトキシン含有量が増加する可能性を高める恐れがある。1個~4個のシアル酸単位を有する短いPSA分子を合成して調製することもでき(Kang SH et al., Chem Commun. 2000; 227-8; Ress DK and Linhardt RJ, Current Organic Synthesis. 2004; 1:31-46)、したがって、エンドトキシンレベルが高くなるというリスクを最小限にすることができる。一方で、狭いサイズ分布と低い多分散性を有し、エンドトキシンも含まれていないPSA調製物を、現在では製造することができる。本開示の特定用途の多糖類化合物は、一態様では、バクテリアによって産生されたものである。これらの天然に存在する多糖類の一部は、糖脂質として知られている。一部の実施形態では、多糖類化合物は、末端ガラクトース単位を実質的に含まない。

10

【0209】

一部の実施形態では、PSAは、C1-INHタンパク質の1つ以上のシアル酸残基を介してC1-INHにコンジュゲートされる。一部の実施形態では、C1-INHタンパク質の1つ以上のシアル酸残基を酸化した後に、PSAがシアル酸残基にコンジュゲートされる。

【0210】

一部の実施形態では、PSAは酸化したシアル酸にオキシム結合を介してコンジュゲートされる。一部の実施形態では、PSAは酸化したシアル酸にヒドラゾン結合を介してコンジュゲートされる。

20

【0211】

C1-INHタンパク質は、本発明に従って様々なレベルでPSAとコンジュゲートされ得る。例えば、PSA:C1-INHのモル比は、約5:1~100:1、約10:1~100:1、約15:1~100:1、約20:1~100:1、約25:1~100:1、約30:1~100:1、約40:1~100:1、約50:1~100:1、約10:1~90:1、約10:1~80:1、約10:1~70:1、約10:1~60:1、約10:1~50:1、約10:1~40:1、約15:1~35:1、または約20:1~30:1の範囲になり得る。一部の実施形態では、PSA:C1-INHのモル比は、少なくとも約1:1、少なくとも約5:1、少なくとも約10:1、少なくとも約15:1、少なくとも約20:1、少なくとも約25:1、少なくとも約30:1、少なくとも約35:1、少なくとも約40:1、少なくとも約45:1、または少なくとも約50:1であり得る。

30

【0212】

一部の実施形態では、PSA:シアル酸のモル比は、少なくとも約1:1、少なくとも約1:5、少なくとも約1:10、少なくとも約1:15、少なくとも約1:20、少なくとも約1:25、少なくとも約1:30、少なくとも約1:35、少なくとも約1:40、少なくとも約1:45、少なくとも約1:50である。一部の実施形態では、PSA:シアル酸のモル比は、約1:1~1:50、約1:1~1:45、約1:1~1:40、約1:1~1:35、約1:1~1:30、約1:1~1:25、約1:1~1:20、約1:1~1:15、約1:1~1:10、または約1:1~1:5である。

40

【0213】

延長された半減期

本発明によると、コンジュゲーション(例えば、PEG化またはPSAコンジュゲート)によって、C1-INHのin vivoでの半減期が延びる。コンジュゲート(例えばPEG化またはPSAコンジュゲート)されたC1-INHは、コンジュゲートされていない(例えば非PEG化またはPSAコンジュゲートされていない)C1-INHよりも長い半減期を有するのが一般的である。一部の実施形態では、コンジュゲート(例えばPEG化またはPSAコンジュゲート)されたC1-INHは、血漿由来ヒトC1-IN

50

Hタンパク質に匹敵するか、またはそれよりも長い半減期を有する。一部の実施形態では、コンジュゲート（例えばPEG化またはPSAコンジュゲート）されたC1-INHの半減期は、血漿由来C1-INHタンパク質の半減期の約80%～500%、90%～500%、100%～500%、110%～500%、120%～500%、80%～400%、90%～300%、100%～300%、100%～250%、100%～200%、または100%～150%の範囲内である。

【0214】

一部の実施形態では、コンジュゲート（例えばPEG化またはPSAコンジュゲート）されたC1-INHタンパク質の半減期は、少なくとも約70時間、75時間、80時間、85時間、90時間、95時間、100時間、105時間、110時間、115時間、120時間、125時間、130時間、135時間、140時間、145時間、150時間、155時間、160時間、165時間、または170時間である。一部の実施形態では、コンジュゲート（例えばPEG化またはPSAコンジュゲート）されたC1-INHの*in vivo*における半減期は、約2日以上、2.5日以上、3日以上、3.5日以上、4日以上、4.5日以上、5日以上、5.5日以上、6日以上、6.5日以上、7日以上、7.5日以上、8日以上、8.5日以上、9日以上、9.5日以上、10日以上、11日以上、12日以上、13日以上、または14日以上である。一部の実施形態では、コンジュゲート（例えばPEG化またはPSAコンジュゲート）されたC1-INHタンパク質の*in vivo*における半減期は、約0.5日～14日、0.5日～10日、1日～10日、1日～9日、1日～8日、1日～7日、1日～6日、1日～5日、1日～4日、1日～3日、2日～10日、2日～9日、2日～8日、2日～7日、2日～6日、2日～5日、2日～4日、2日～3日、2.5日～10日、2.5日～9日、2.5日～8日、2.5日～7日、2.5日～6日、2.5日～5日、2.5日～4日、3日～10日、3日～9日、3日～8日、3日～7日、3日～6日、3日～5日、3日～4日、3.5日～10日、3.5日～9日、3.5日～8日、3.5日～7日、3.5日～6日、3.5日～5日、3.5日～4日、4日～10日、4日～9日、4日～8日、4日～7日、4日～6日、4日～5日、4.5日～10日、4.5日～9日、4.5日～8日、4.5日～7日、4.5日～6日、4.5日～5日、5日～10日、5日～9日、5日～8日、5日～7日、5日～6日、5.5日～10日、5.5日～9日、5.5日～8日、5.5日～7日、5.5日～6日、6日～10日、7日～10日、8日～10日、9日～10日、10日～11日、11日～12日、12日～13日、13日～14日の範囲である。

【0215】

医薬組成物

本発明は、本明細書に記載のコンジュゲートされたC1-INHと生理学的に許容される担体とを含有する医薬組成物をさらに提供する。担体とコンジュゲートされたC1-INHタンパク質は、通例、無菌状態であり、投与様式に適するように製剤化される。

【0216】

好適な薬学的に許容される担体として、以下に限定されないが、水、塩溶液（例えば、NaCl）、食塩水、緩衝食塩水、アルコール、グリセロール、エタノール、アラビアゴム、植物油、ベンジルアルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、炭水化物（ラクトース、アミロース、またはデンプンなど）、糖（マンニトール、スクロース、またはその他など）、デキストロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、珪酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなど、及びこれらの組み合わせが挙げられる。医薬製剤は、必要に応じて、活性化化合物と有害な反応を起こさないか、またはそれらの活性を妨げない助剤（例えば、潤滑剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼす塩類、緩衝剤、着色料、香味料、及び/または芳香剤など）と混合され得る。好ましい実施形態では、静脈内投与に適した水溶性担体が用いられる。

【0217】

所望に応じて、好適な医薬組成物または薬剤は、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、または

pH緩衝剤を含むこともできる。組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放性製剤、または粉末であり得る。組成物はまた、従来の結合剤及び担体（トリグリセリドなど）を用いて座薬としても製剤化され得る。経口製剤は、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含み得る。

【0218】

医薬組成物または薬剤は、ヒトに対する投与に適した医薬組成物として、慣行的な手順に従って製剤化され得る。例えば、一部の実施形態では、静脈内投与用の組成物は、無菌等張水性緩衝溶液であるのが典型的である。必要に応じて、組成物はまた、可溶化剤、及び注射部位の痛みを軽減するための局所麻酔薬を含んでもよい。一般的に、成分は、例えば凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、活性作用剤の量を提示するアンプルまたはサシェ（sachette）などの密封容器に、別々に、または単位剤形の形態で混合されて供給される。組成物を注入によって投与しようとする場合、無菌医薬品グレードの水、食塩水、またはデキストロース/水を含む注入瓶を用いて調剤することができる。組成物を注射によって投与する場合、注射用の無菌水か、または食塩水のアンプルを供給することができ、投与に先立って成分を混合できるようにする。

10

【0219】

本明細書に記載のコンジュゲートされたC1-INHは、中性形態または塩形態として製剤化され得る。薬学的に許容される塩として、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸、その他の由来の塩などの遊離アミノ基で形成される塩、及びナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン、その他の由来の塩などの遊離カルボキシル基で形成される塩が挙げられる。

20

【0220】

好ましい製剤は、50mMのNaPO₄（pH7.2）と、50mMのソルビトールと、150mMのグリシンとを含む。製剤は液体であってもよく、または凍結乾燥され、投与前に元に戻されてもよい。

【0221】

投与経路

30

本明細書に記載のコンジュゲートされたC1-INH（または本明細書に記載のコンジュゲートされたC1-INHを含む組成物または薬剤）は、任意の適正な経路により投与される。一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1-INHまたはそれを含有する医薬組成物は、全身に投与される。全身投与は、静脈内、皮内、頭蓋内、鞘内、吸入、経皮（局所的）、眼内、筋肉内、皮下、筋肉内、経口、及び/または経粘膜的投与であり得る。一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1-INHまたはそれを含有する医薬組成物は、皮下に投与される。本明細書で使用される場合、用語「皮下組織」は、皮膚直下の疎性不規則性結合組織の層として定義される。例えば、皮下投与は、組成物を、以下に限定されないが、大腿部、腹部、殿部、または肩甲部を含めた領域に注射することによって行われ得る。一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1-INHまたはそれを含有する医薬組成物は、静脈内に投与される。一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1-INHまたはそれを含有する医薬組成物は、経口投与される。一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1-INHまたはそれを含有する医薬組成物は、頭蓋内に投与される。一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1-INHまたはそれを含有する医薬組成物は、髄腔内に投与される。所望の場合には、2つ以上の経路を同時に用いることができる。

40

【0222】

一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1-INHまたはそれを含有する医薬組成物は、皮下（すなわち皮膚下）投与により対象に投与される。かかる目的に対して、シリンジを用いて製剤を注射してもよい。しかしながら、注射デバイス（例えば、Inje

50

ct - ease (商標) デバイス及び Genject (商標) デバイス)、注射ペン (GenPen (商標) など)、無針デバイス (例えば、Medijector (商標) 及び Biojector (商標))、ならびに皮下パッチ送達系といった製剤投与用の他のデバイスが使用可能である。それゆえに、本発明は、コンジュゲートされた C1 - INH を含む医薬組成物 (例えば、液体形態及び凍結乾燥された形態) と、シリンジなどの注射デバイスと、を備えたキットをさらに提供する。一部の実施形態では、シリンジには、コンジュゲートされた C1 - INH を含む医薬組成物が予め担持されている。医薬組成物が凍結乾燥されている場合、キットは再調整用の緩衝溶液をさらに含み得る。

【0223】

本発明は、本明細書に記載のコンジュゲートされた C1 - INH またはそれを含有する医薬組成物の治療有効量の単回投与及び複数回投与を企図している。コンジュゲートされた C1 - INH またはそれを含有する医薬組成物は、対象の症状 (例えば、遺伝性血管性浮腫) の性質、重症度、及び程度に応じて規則的な間隔で投与され得る。一部の実施形態では、コンジュゲートされた C1 - INH またはそれを含有する医薬組成物の治療有効量を、規則的な間隔で (例えば、年に 1 回、6 か月に 1 回、5 か月に 1 回、3 か月に 1 回、隔月 (2 か月に 1 回)、毎月 (月に 1 回)、隔週 (2 週間に 1 回)、毎週、毎日、または連続して)、周期的に投与することができる。

【0224】

一部の実施形態では、投与により個体において単に局所的効果を得るだけであるが、他の実施形態では、投与により個体の複数の部位にわたる効果 (例えば、全身効果) を得る。投与の結果、通例、コンジュゲートされた C1 - INH が 1 つ以上の標的組織に送達される。一部の実施形態では、コンジュゲートされた C1 - INH は、以下に限定されないが、心臓、脳、皮膚、血液、脊髄、横紋筋 (例えば、骨格筋)、平滑筋、腎臓、肝臓、肺、及び / または脾臓を含めた 1 つ以上の標的組織に送達される。一部の実施形態では、コンジュゲートされた C1 - INH は心臓に送達される。一部の実施形態では、コンジュゲートされた C1 - INH は中枢神経系、特に脳及び / または脊髄に送達される。一部の実施形態では、コンジュゲートされた C1 - INH は、三頭筋、前脛骨筋、ヒラメ筋、腓腹筋、二頭筋、僧帽筋、三角筋、四頭筋、及び / または横隔膜に送達される。

【0225】

剤形及び投与レジメン

一部の実施形態では、組成物は、治療有効量で、及び / または特定の所望の結果 (例えば、HAE などの補体媒介性慢性疾患の予防) と相関する投与レジメンに従って投与される。

【0226】

本発明に従って投与される特定の用量または量は様々であり、例えば、所望の結果の性質及び / もしくは程度、投与経路及び / もしくはタイミングの詳細、ならびに / または 1 つ以上の特徴 (例えば、体重、年齢、個人歴、遺伝的特徴、ライフスタイルパラメータ、心臓障害の重症度、及び / もしくは心臓障害の危険性レベルなど、またはそれらの組み合わせ) に依存する。こうした用量または量は、当業者によって決定され得る。一部の実施形態では、適正な用量または量は、標準的な臨床技術に従って決定される。別の方法として、または加えて、一部の実施形態では、適正な用量または量は、所望のまたは至適な投与用量範囲または量を特定するのに役立つ 1 つ以上の *in vitro* アッセイまたは *in vivo* アッセイを通して決定される。

【0227】

種々の実施形態では、コンジュゲートされた C1 - INH は治療有効量で投与される。一般に、治療有効量は、対象に対して意義のある利益を得る (例えば、基礎疾患または症状を予防する、治療する、調節する、治癒する、防止する、及び / または寛解させる) のに十分な量である。一般に、治療剤 (例えば、コンジュゲートされた C1 - INH) の量であって、治療剤を必要とする対象に投与される量は、対象の特徴によって決まる。このような特徴には、対象の状態、疾患重症度、全般的健康、年齢、性別および体重が含まれ

10

20

30

40

50

る。当業者は、これらおよび他の関連因子に応じて適切な用量を容易に決定することができるであろう。さらに、最適な投薬量範囲を同定するために、客観的および主観的アッセイの両方を任意に用いることができる。特定の一部の実施形態では、適正な投与用量または投与量を、*in vitro*または動物モデル評価系由来の用量反応曲線から外挿することができる。

【0228】

一部の実施形態では、組成物は医薬製剤として提供される。一部の実施形態では、医薬製剤は、HAE発作の発症率または危険性を低減させることと関連した投与レジメンに従う投与用の単位用量であるか、または該単位用量を含む。

【0229】

一部の実施形態では、本明細書に記載のコンジュゲートされたC1 - INHを含む製剤は、単回投与として投与される。一部の実施形態では、本明細書に記載のコンジュゲートされたC1 - INHを含む製剤は、規則的間隔で投与される。本明細書で使用される「間隔」での投与は、治療有効量が周期的（1回限りの投与とは区別される）に投与されることを示している。間隔は、標準的な臨床技術で決定され得る。一部の実施形態では、本明細書に記載のコンジュゲートされたC1 - INHを含む製剤は、隔月、毎月、月2回、3週間毎、隔週、毎週、週2回、週3回、毎日、1日2回、または6時間毎に投与される。単一個体に対する投与間隔は、一定の間隔である必要はなく、個体の必要性に応じて経時的に変動する可能性がある。

【0230】

治療上有効な量は、複数の単位用量を含み得る投薬レジメンで一般的に投与される。任意の特定の治療用タンパク質について、治療上有効な量（および/または有効な投与レジメン内の適切な単位投与量）は、例えば、投与経路に応じて、他の医薬品と組み合わせる変化し得る。また、任意の特定の患者に固有の治療有効量（及び/または単位用量）は、治療される障害及び障害の重症度；使用される特定の医薬作用剤の活性；使用される特定の組成物；患者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別、及び食事；投与時間、投与経路、及び/または使用される特定のC1 - INHの排出または代謝速度；治療期間；ならびに医療分野において周知の類似要因を含む様々な要因に依存し得る。

【0231】

本明細書で使用される場合、用語「隔月」は2か月に1回（すなわち、2か月毎に1回）の投与を意味し、用語「毎月」は1か月に1回の投与を意味し、用語「3週間毎」は3週間に1回（すなわち3週間毎に1回）の投与を意味し、用語「隔週」は2週間に1回（すなわち、2週間毎に1回）の投与を意味し、用語「毎週」は週に1回の投与を意味し、用語「毎日」は1日に1回の投与を意味する。

【0232】

一部の実施形態では、本明細書に記載のコンジュゲートされたC1 - INHを含む製剤は、無期限に規則的間隔で投与される。一部の実施形態では、本明細書に記載のコンジュゲートされたC1 - INHを含む製剤は、決められた期間の間、規則的間隔で投与される。

【0233】

任意の特定の対象について、個々の必要性および酵素補充療法の投与を管理または監督する者の専門的判断に従って、特定の投与計画を経時的に調整すべきであり、本明細書に記載の投与量範囲は、単なる例示であって、クレームされた発明の範囲または実施を限定するものではないことが理解されるべきである。

【0234】

併用療法

一部の実施形態では、コンジュゲートされたC1 - INHは、補体媒介性疾患の治療に現在用いられている1つ以上の既知の治療剤（例えば、コルチコステロイド）と併用して投与される。一部の実施形態では、既知の治療剤は、その標準的もしくは承認済投与レジメン及び/またはスケジュールに従って投与される。一部の実施形態では、既知の治療剤

10

20

30

40

50

は、その標準的もしくは承認済投与レジメン及び/またはスケジュールと比較して変更されたレジメンに従って投与される。一部の実施形態では、こうした変更されたレジメンは、1つ以上の単位用量が異なる(例えば減少または増加)という点で、及び/または投与頻度が異なるという点で(例えば、単位投与間の1つ以上の間隔を長くして低頻度にするか、または間隔を短くして高頻度に行っているという点で)、標準的または承認済投与レジメンとは異なっている。

【0235】

補体媒介性障害

コンジュゲートされたC1-INH及びそれを含有する医薬組成物を使用して、HAE及び種々の他の補体媒介性障害を治療することができる。

10

【0236】

一部の実施形態では、本発明で提供されるコンジュゲートされたタンパク質は、補体媒介性障害(例えば、NMOSD、AMR、及びHAE事象)に関連する急性発作に好適である。これらの発作は長い場合もあり、短い場合もある。一部の実施形態では、疾患または障害は慢性的である。一部の実施形態では、本発明の組成物及び方法は予防的に用いられる。本明細書に開示される組成物及び方法を用いて治療され得る補体媒介性疾患の例として、以下に限定されないが、遺伝性血管性浮腫、抗体関連型拒絶反応、視神経脊髄炎関連疾患、外傷性脳損傷、脊椎損傷、虚血性脳損傷、火傷、中毒性表皮壊死症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病、脳卒中、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)、重症筋無力症、多発性運動ニューロパチーが挙げられる。

20

【実施例】

【0237】

本発明の他の特徴、目的、及び利点は、以下の実施例において明らかになる。しかしながら、本実施例は、本発明の実施形態を示すが、単に例示のためであり、制限するものではないことを理解すべきである。本発明の範囲内の様々な変更及び修正は、本実施例から当業者に明らかになるであろう。

【0238】

実施例1. C1-INHのPEG化

本実施例は、C1-INHタンパク質のPEG化に適した方法の例を示している。3つの異なるPEG化戦略を検討した。PEG化スキームの例を図3~図5に示す。これらは、PEGのシアル酸残基へのコンジュゲーション(シアル酸媒介性(SAM)化学作用)、PEGのガラクトース酸残基へのコンジュゲーション(ガラクトース媒介性(GAM)化学作用)、PEGのアミン媒介性コンジュゲーションとした。

30

【0239】

アミノキシPEGは、さらに安定したオキシム結合を形成するために用いた。PEG化を、Park et al., Carbohydrate-Mediated Polyethylene Glycol Conjugation of TSH Improves Its Pharmacological Properties. Endocrinology, March 2013, 154(3): 1373-1383に記載された方法に基づいて開発された方法で行った。

40

【0240】

グリコシル化タンパク質にシアル酸残基が露出していると、通例、シアル酸残基がほとんどないかまたは全くないタンパク質に比べて半減期が増加するが、炭水化物鎖に末端ガラクトース残基があると、受容体媒介性クリアランスが生じ、タンパク質の血清半減期を減少させることが知られている。したがって、C1-INHの受容体媒介性クリアランスを阻止するために、まず初めにGAMのPEGコンジュゲーションに注力した。3つのアプローチの全てが有望であると思われたが、驚くべきことに、アミンとSAMのPEG化は、効力については最小限の許容できる損失でありつつ、最大限のC1-INHのPEG化をもたらすことがわかった。GAMのPEG化は、比較すると、あまり効果的ではなく、不均一性が高かった。

50

【0241】

最初の *in vivo* の PK 試験を行い、PEG 化 C1 - INH を評価した。具体的には、ラット PK 試験において、SAM の 5 KDa 及び 40 KDa の PEG 化 C1 - INH を、アミノ PEG 化 C1 - INH と比較した。図 6 のパネル A ~ パネル C を参照されたい。PEG 化 C1 - INH を、C1 - INH を用いた抗原アッセイで定量して、検量線を作成した。また、サンプルをウェスタンブロットで分析して、分解の可能性を調べた。1 mg / kg の IV 投与と 3 mg / kg の投与は、ヒトにおける C I N R Y Z E (登録商標) の範囲内 (2 ~ 3 mg / kg) とした。これらの試験により、PEG 化タンパク質は、半減期が 3 ~ 4 倍増加することがわかったが、これはクリアランスの低減に起因すると考えられる。

10

【0242】

C1 - INH - PEG を用いて、さらなる薬物動態試験を、雄の SD ラットに 1 mg / kg を静脈内投与することにより行った。これらのデータを以下の表 1 に示している。

【表 2】

| | | C1-INH | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-------------|---------|-------|-------|------|-------|------|-------------------------|------|-------|------|------|-------|
| | | PEG-NHS | | | | | | PEG-アミノキシ、シアル酸媒介性 (SAM) | | | | | |
| PKパラメータ | 単位 | 1K | 2K | 5K* | 5K** | 20K | 40K | 2K | 5K* | 5K** | 10K | 20K | 40K |
| CL | mL / 日 / kg | 102 | 166 | 65.9 | 158 | 88.2 | 119 | 226 | 135 | 84.5 | 116 | 129 | 76.2 |
| V _s | mL / kg | 148 | 162 | 115 | 162 | 167 | 166 | 292 | 250 | 131 | 160 | 150 | 118 |
| 終末相 t _{1/2} | 日 | 1.18 | 1.05 | 1.51 | 1.26 | 1.67 | 1.59 | 1.11 | 1.33 | 1.21 | 1.17 | 1.09 | 1.04 |
| AUC _{last} | 日・ng / mL | 9690 | 5987 | 14857 | 6297 | 10908 | 8251 | 4375 | 7250 | 11795 | 8705 | 7760 | 12988 |
| AUC _{INF} | 日・ng / mL | 9842 | 6067 | 15334 | 6382 | 11414 | 8453 | 4430 | 7434 | 12013 | 8821 | 7816 | 13139 |
| MRT _{INF} | 日 | 1.46 | 0.975 | 1.74 | 1.02 | 1.90 | 1.40 | 1.29 | 1.85 | 1.56 | 1.38 | 1.15 | 1.54 |

20

30

*PEG は直鎖である。**PEG は分岐鎖である

表 1 . 雄のスプレグ・ドーリー (SD) ラットに静脈内投与された C1 - INH - PEG の薬物動態パラメータ。

【0243】

さらに、NHP 試験において、皮下の生物学的利用度が約 30 ~ 40 % であることが観察され、これは意外にも、コンジュゲートされていない組換え C1 - INH タンパク質に比べて改善されていた。

40

【0244】

したがって、PEG 化 C1 - INH は、半減期を増加させ、かつ治療用途に適するに足る生物学的利用度を有すると考えられる。

【0245】

実施例 2 . PEG 化プロトコルの例
プロセス A

精製した C1 - INH を 100 mM 酢酸ナトリウムに pH 5 . 6 で透析した。過ヨウ素酸酸化を 4 で 30 分間行った。反応をグリセロールを用いて 4 で 15 分間クエンチした。酸化された C1 - INH を酢酸緩衝液に透析した。続いて、その物質を 4 で一晩 P

50

EG化した後に、グリシンによるクエンチを行った。遊離PEGを陰イオン交換により除去した。プロセスAの例示的な概略図を図7に示す。

【0246】

プロセスAにより調製されたC1-INH-PEG40kDaを、以下の方法を用いてさらに精製した。

【0247】

C1-INHにコンジュゲートされた40kDaのPEGアミンのうちの約1mgを、サンプル希釈緩衝液(pH7.00で5mMのNaPO₄)を用いて20倍に希釈した。得られた溶液は、0.716mS/cmの導電率を示した。サンプルを10mLのGigaCap Q(650)カラムXK16に負荷した。全プロセスを通して流速を150cm/時間とした。カラムをサンプル希釈緩衝液を用いてよく洗浄し、タンパク質を500mMのNaClまでの10カラム容量勾配により溶出した。2mLの画分を採取し、サンプルをSDS-PAGEで分析した。クロマトグラフィーの結果を図11に示している。次に、ピーク画分をプールし、製剤緩衝液(50mMリン酸塩(pH=7.1)、150mMグリシン、50mMソルビトール)に透析し、1.0mg/mL以上になるまで濃縮し、280nm吸光度で定量した(Nano-drop)。

10

【0248】

同様の精製をC1-INH-PEG20kDa調製物で行った結果を図12に示し、C1-INH-PEG5kDa調製物で行った結果を図13に示す。

【0249】

全てのサンプルの定量を、Nano-drop装置で、タンパク質のアミノ酸配列から得られる吸光係数と分子量とを用いて行った。その結果を以下の表2に示している。

20

【表3】

| | 濃度 (mg / ml) | 容量 (mL) | 総タンパク質 (mg) | 開始時の総タンパク質 (mg) | 回収 (%) |
|------------------|--------------|---------|-------------|-----------------|--------|
| C1-INH-40kDa PEG | 0.56 | 0.4 | 0.224 | 0.75 | 30 |
| C1-INH-20kDa PEG | 1 | 0.2 | 0.2 | 0.75 | 27 |
| C1-INH-5kDa PEG | 2.2 | 0.15 | 0.33 | 0.75 | 44 |

30

表2: C1-INHのPEG化プロセスサンプルの定量化。

【0250】

プロセスB

精製したC1-INHを、TFF緩衝液交換を介して100mMの酢酸ナトリウムにpH5.6で交換した。過ヨウ素酸酸化を室温で30分間行った。過ヨウ素酸を40xのモル過剰で供給した。最大4mg/mLまで、C1-INHが反応に含まれた。反応をグリセロールを用いて室温で15分間クエンチした。続いて、その物質を室温で一晩PEG化した。PEGを100xのモル過剰で供給した。最大2mg/mLまで、C1-INHが反応に含まれた。遊離PEGをTFF緩衝液交換により除去した。プロセスBの例示的な概略図を図8に示す。

40

【0251】

PEG化C1-INHに好適なPEG化プロトコルの他の例を図9A~図9Eにまとめている。

【0252】

SAMプロセス-PEG5K

このプロセスでは、オクチル充填剤(トリス/硫酸アンモニウム溶液中の約0.9mg/mL C1-INH)の約200mLを、Pelllicon XL、Biomax 30

50

kDa (PES) TFFカセットを用いて10×ダイア容量交換で、100mMの酢酸ナトリウムにpH5.6で緩衝液交換した。40μMのC1-INH (3.7mg/ml)を1.6mMの過ヨウ素酸ナトリウム(40×)と共に室温で30分間、穏やかに攪拌しながら処理した(50mL反応液、100mM酢酸ナトリウム中、pH5.6)。反応を1.5%グリセロールを用いて室温で15分間クエンチした。

【0253】

21.6μMのC1-INH (2mg/ml)を2.16mMの5kDa-PEG (100×)と共に室温で一晩、穏やかに攪拌しながら処理した(92.5mL反応液、100mM酢酸ナトリウム中、pH5.6)。続いて反応を2.16mMのグリシン(100×)を用いて室温で1時間クエンチした。

10

【0254】

遊離PEGのTFFダイアフィルトレーション除去を、Pelllicon XL、Biomax 100kDa MWCO (PES) TFFカセットを用いて、50mMリン酸ナトリウム、150mMグリシン、及び50mMソルビトールへの10×ダイア容量交換でpH7.1にて行った。次に、生成物を、0.22μm、PES、ミリポアステリフリップフィルターを用いてフィルター滅菌した。PEG化サンプルのIC50を図10のパネルA～パネルB、図20のパネルA～パネルBに示す。

【0255】

各プロセス工程後の収率を以下の表3に示している。

【表4】

20

| 工程 | 容量 (mL) | 濃度 (mg/ml) | 総量 (mg) | 回収 (%) |
|-------------|------------|------------|------------|-----------|
| オクチル充填 | 200 | 0.93 | 186 | - |
| 酢酸塩へのTFF | 44 | 4.2 | 184.8 | 99.0 |
| 酸化 | 50 | 3.6 | 180 | 97.2 |
| PEG化 | 92.5 | 2 | 185 | 100 |
| 保存緩衝溶液へのTFF | 20.8 | 8.25 | 171.6 | 93.1 |
| 82.5mg、無菌ろ過 | 9.7 | 8 | 77.6 | 94.0 |
| | | | | 84 |

30

表3：オクチル担持PEG化工程収率。

【0256】

SAMプロセス-PEG直鎖2K、5K、分岐鎖5K、10K、20K、40K

SAMプロセスを同様に用いて、次の種のPEG：直鎖2K、直鎖5K、分岐鎖5K、分岐鎖10K、分岐鎖20K、及び分岐鎖40Kを用いてC1-INH-PEGを調製した。

【0257】

PEG2K、5K、及び10KでPEG化されたC1-INHを、アミコン遠心フィルター(カットオフ30K)で精製した。遊離PEGを除去するために、PEG-アミノキシ20Kまたは40KでPEG化されたC1-INHをAKTAシステムで精製した。C1-INHの特性を図18のパネルA～パネルEに示す。SAMプロセスにより生成したC1-INH-PEGを、純度及び効力についてアッセイし、PKをラットモデルで評価した。これらのデータを図19のパネルA～パネルCに示す。PEG化サンプルのさらなる特性及びIC50値を図24のパネルAとパネルBに示している。

40

【0258】

C1-INH-PEG生成のためのSAMのPEG化条件を以下の表4に示す。

【表 5】

| PEG分子 量 | 酸化工程 | | コンジュゲーション工程 | |
|------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|-------|
| | r C1-INH 濃度 (mg/ m l) | Na IO ₄ 相 当 | タンパク質 濃度 (mg /m L) | PEG相当 |
| 直鎖 2K | 5 | 20 | 5 | 100 |
| 直鎖 5K | 5 | 20 | 2 | 100 |
| 分岐鎖 5K | 5 | 20 | 2 | 100 |
| 分岐鎖 10K | 5 | 10 | 3.5 | 100 |
| 分岐鎖 20K | 5 | 5 | 2 | 100 |
| 分岐鎖 40K | 5 | 5 | 2 | 100 |

10

表 4. C1-INH-PEG生成のためのSAMのPEG化条件。

【0259】

アミンカップリングプロセスによるPEG化

C1-INH-PEGを同様にアミンカップリングプロセスで調製した。アミノカップリングプロセスによるPEG化の例の略図を図21に示す。

【0260】

PEG 1K、直鎖 5K、及び分岐鎖 5KでPEG化されたC1-INHをアミコン遠心フィルターで精製した(カットオフ30K)。バリウム-ヨウ素染色を用いてPEG 5K部分に対する遊離PEGを検出し、RP-HPLCを使用して遊離PEG 1K及び2Kを検出した。NHS-PEG 20K及び40KでPEG化されたC1-INHを、AKTA pureクロマトグラフィシステムにより精製した。PEG化C1-INHの特性を図22のパネルA~パネルDに示す。

20

【0261】

アミンカップリングプロセスにより生成されたC1-INH-PEGを、純度、効力についてアッセイし、PKをラットモデルで評価した。これらのデータを図23のパネルA~パネルCに示す。

【0262】

アミンカップリングプロセスによるC1-INH-PEG生成のためのPEG化条件を以下の表5に示す。

30

【表 6】

| PEG分子量 | タンパク質濃度 (mg/mL) | PEG相当 | pH | 温度 (°C) | 時間 (h) |
|---------|--------------------|---------|-----|---------|-----------|
| 直鎖 1K | 5 | 10 | 7.5 | 25 | 1 |
| 直鎖 2K | 5 | 5 | 7.5 | 25 | 1 |
| 直鎖 5K | 5 | 10 | 7.5 | 25 | 1 |
| 分岐鎖 5K | 5 | 150 | 8.5 | 25 | 1 |
| 分岐鎖 20K | 5 | 100+40* | 8.5 | 25 | 2+1* |
| 分岐鎖 40K | 2 | 100 | 8.5 | 25 | 2 |

40

表 5. アミンカップリングプロセスによるC1-INH-PEG生成のためのPEG化条件*。

100×PEG 20Kを用いたPEG化は転換率が低く、さらに40×PEG 20Kを用いて再処理した。

【0263】

実施例 3 : IV投与されたPEG化C1-INHの非ヒト霊長類PK試験

非ヒト霊長類(NHP)(カニクイザル)を2つのグループに分け、組換えヒトC1-

50

INH (rhC1-INH) を 30 mg/kg で、または PEG 化 rhC1-INH を 5 mg/kg で静脈内投与した。試験結果の例を図 14 及び表 6 にまとめている。

【0264】

NHP では、PEG 化された rhC1-INH は、rhC1-INH に比べて 6 倍低いクリアランスと、3 倍長い終末相半減期とを示した。また、同様の傾向がラット試験で観察されており、クリアランスが 4 倍低減し、半減期が 4 倍増加した。

【表 7】

| NHP、IV | 投与 (mg/kg) | n | CL (mL/時間/ kg) | Vz (mL/kg) | T _{1/2} (時間) |
|--------------|---------------|----------------|----------------------|---------------|--------------------------|
| hrC1-INH | 30 | 3 | 1.9 | 143 | 54 |
| PEG-hrC1-INH | 5 | 2 ^a | 0.3 | 75 | 161 |

10

表 6: PEG 化 rhC1-INH 対 rhC1-INH の NHP の PK 試験結果

本試験における 3 匹のサルの中の 1 匹には 408 時間後に消失速度の増加が見られ、この 1 匹を PK 計算に含めなかった。

【0265】

20

C1-INH を IV 投与された NHP の PK に PEG の負荷が及ぼす影響

さらなる PK 試験を NHP で行った。NHP に、C1-INH-PEG を 5x、10x、20x、及び 40x の負荷で IV 投与した。例示的な結果を図 15 に示す。

【0266】

実施例 4: NHP の PEG 化 C1-INH の IV PK 対 SC PK

NHP を 2 つのグループに分け、PEG 化 C1-INH を 5 mg/kg で静脈内投与するか、または PEG 化 C1-INH を 10 mg/kg で皮下 (SC) 投与した。この試験結果を図 16 及び表 7 にまとめている。PEG 化 C1-INH の機能活性 (SA = 4.8 U/mg) は、この試験の時間的経過にわたって維持されていた。

【0267】

30

重要なことには、また意外にも、NHP では、PEG 化 C1-INH は 85% の生物学的利用度を示し、半減期は IV 投与の半減期と同様であった。これまでに収集した前臨床データによって、週に 1 回またはそれよりもさらに少ない頻度での投与の可能性が裏付けられる。

【表 8】

| | 投与 (mg/kg) | n | C _{max} (μg/mL) | T _{max} (時間) | AUC _{inf} (μg/mL-時間) | F (%) |
|----|---------------|---|-----------------------------|--------------------------|----------------------------------|----------|
| IV | 5 | 2 | - | - | 15144 | - |
| SC | 10 | 3 | 94 | 72 | 25599 | 85 |

40

表 7: NHP における PEG 化 rhC1-INH の IV 投与対 SC 投与
SC 投与後の NHP における hrC1-INH に対して F = 58%

【0268】

実施例 5: 最大化された PK プロファイルに対する極わずかな PEG を評価するための酸化 / 滴定

用いた DT-1215 力価アッセイは、ELISA ベースの方法であり、これは、血清

50

サンプルから PEG-rC1-INH タンパク質を抗 PEG 抗体を用いて捕捉するものである。次に、そのタンパク質を標識化された抗 C1-INH タンパク質を用いて検出した。PEG-rC1-INH を用いて、検量線を作成した。図 17 は、DT-1215 力価分析の結果と、サンプルの比活性とを示している。表 8 及び表 9 にさらなるデータを示している。

【表 9】

| グループ | ロット | サンプル | IC ₅₀ (nM) | 相対的効力 (%) (対親) | 比活性 (U/mg) |
|------|-----------|------|--------------------------|----------------------|---------------|
| A | KHR3 | 2.5× | 1.52 | 92.11 | 6.54 |
| B | KHR3 | 5× | 1.61 | 86.96 | 6.17 |
| C | KHR3 | 10× | 1.61 | 86.96 | 6.17 |
| D | KHR3 | 20× | 1.77 | 79.10 | 5.62 |
| E | KHR2 | 40× | 2.05 | 68.29 | 4.85 |
| | C36R14-18 | 親 | 1.4 | 100 | 7.1 |

10

表 8 : 過ヨウ素酸処理の種々のレベルで観察された比活性の変化。表 9 (以下) に見られるように、過ヨウ素酸レベルを変化させることで、PEG と C1-INH の比が異なる結果となった。

20

【表 10】

| サンプル | t _{1/2} (時間) | 最長 t _{1/2} に対する 割合 (%) | rC1 活性 (%) | PEG/ rC1 mol/ mol |
|--------|--------------------------|--|---------------|----------------------------|
| C1-INH | 13 | 33 | 100 | 該当なし |
| 2.5× | 25.5 | 64.5 | 92 | 2 |
| 5× | 29.5 | 74.7 | 87 | 3 |
| 10× | 32.0 | 81.0 | 87 | 8 |
| 20× | 39.5 | 100 | 79 | 14 |
| 40× | 38.9 | 98.5 | 68 | 20 |

30

40

表 9 : コンジュゲートされていない C1-INH と比較した、種々のレベルの PEG で得られた半減期

【0269】

実施例 6 : PEG 化 C1-INH の物理的特性

PEG 化調製物の純度を SEC 及び SEC-MALS を用いて分析した。0.1 mg/ml の PEG-C1-INH タンパク質の CD スペクトルを 25 で測定した。CD データを AVIV ソフトウェア及び CDNN ソフトウェアを用いて処理した。CD スペクトル

50

及び二次構造分析によると、タンパク質がPEG化された場合に、いかなる有意な変化も観察されていない。C1-INHのC末端結晶構造(2OAY)によると、27%がヘリックスであり、30%がベータシートである。

【表11】

| | C1-INH | A 5Kアミン PEG-C1- INH | B 40Kアミン PEG-C1- INH | C 5KSAM PEG-C1- INH | D 40KSA M PEG- C1-INH | E 5KSAM PEG-C1- INH |
|-------------|---------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| ヘリックス | 31.30% | 29.60% | 33.10% | 29.60% | 29.60% | 32.20% |
| 逆平行 | 10.00% | 11.20% | 8.20% | 11.50% | 11.50% | 9.10% |
| 平行 | 9.00% | 9.60% | 8.80% | 9.50% | 9.50% | 8.90% |
| ベータター ン | 17.30% | 17.50% | 16.90% | 17.60% | 17.60% | 17.10% |
| ランダム コイル | 34.00% | 35.90% | 33.50% | 35.50% | 35.50% | 33.80% |
| 総計 | 101.60% | 103.70% | 100.50% | 103.60% | 103.60% | 101.00% |

10

表10: データによると、PEG化がC1-INHの二次構造を変化させることはない。

【0270】

20

PEG化C1-INHの融解温度(T_m)をnanoDSFにより測定した。PEG化はC1-INHの熱安定性を劇的に変化させることはないことがわかった。40KDaアミノPEG化されたC-INHのT_mの測定では、他の評価されたコンジュゲートよりも2 高くなっていた。そのデータを表11に示している。

【表12】

| サンプルID | サンプル説明 | サンプルロット番号 | 比率(アンフォールディング)に対する反曲点#1 |
|---------|-------------------|---------------------|-------------------------|
| A1 | 5KアミンPEG C1-INH | CS19875 | 57.7°C |
| B1 | 40KアミンPEG C1-INH | CS19876 | 59.5°C |
| C1 | 5KSAM PEG C1-INH | CS19877 | 57.0°C |
| D1 | 40KSAM PEG C1-INH | CS19878 | 57.4°C |
| E1 | 5KSAM PEG C1-INH | 5K-SAM-C1-INH-KH-R1 | 56.5°C |
| C1-INH1 | C1-INH | SHIRE DT615 | 57.3°C |

30

40

表11: PEG化C1-INHのT_m分析

【0271】

核磁気共鳴(NMR)を用いて、PEG化レベルを特性を明らかにした。アミンのPEG化率は低く、1つのC1-INH当たり約3つのPEG部分であった。シアル酸を重度にPEG化して、5KPEG反応物に対して飽和状態にすることが可能である。シアル酸の40KPEG化は、1分子当たり約9つのPEGに達することになる。異なる過ヨウ素酸濃度でPEG化レベルを定量した。そのデータを表12に示している。

【表 13】

| サンプル名 | PEG/C1-INH比 | PEG-C1-INH分子量* | 注釈 |
|-------|-------------|----------------|-------------|
| A | 3.2 | 101 | 5KアミンPEG |
| B | 3.2 | 213 | 40KアミンPEG |
| C | 28.3 | 226.5 | 5K SAM PEG |
| D | 9.3 | 457 | 40K SAM PEG |
| R1 | 25.3 | 211.5 | 5K SAM PEG |
| R2 | 21.2 | 191 | 5K SAM PEG |
| R3A | 2.5 | 97.5 | 2.5×過ヨウ素酸 |
| R3B | 5 | 110 | 5×過ヨウ素酸 |
| R3C | 11.5 | 142.5 | 10×過ヨウ素酸 |
| R3D | 19.5 | 182.5 | 20×過ヨウ素酸 |
| R4 | 21.2 | 191 | TFFプロセス |

10

20

表 12 : PEG化C1-INH調製物のNMRキャラクタリゼーション

【0272】

実施例 7 : C1-INH-PSAの特性

C1-INHを、シアル酸媒介性(SAM)プロセスを用いて、ポリシアル酸(PSA)でコンジュゲートした。SAMプロセスで生成されるC1-INH-PSAの特性について、純度及び効力に対してアッセイした。これらのデータを図24のパネルA~パネルBに表示している。このデータが示すのは、遊離PSAは効力のアッセイそれ自体を妨害することはないが、ここで評価されているPSA:C1-INHの条件下では、C1-INH効力が約4~7倍減少する。

30

【0273】

PK試験を、C1-INH-PSA、C1-INH-PEG、及びCINRYZE(登録商標)-PEGを用いてラットで行った。そのデータを図25のパネルA~パネルCに示す。

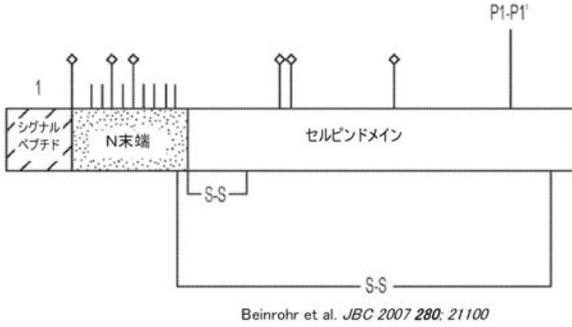
【0274】

等価物及び範囲

当業者は、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するか、または単なる日常的な実験方法を使用して確認することができるであろう。本発明の範囲は、上記の説明に限定されることを意図せず、むしろ以下の特許請求の範囲に記述されるとおりである。

40

【 図 1 】



Beinrohr et al. JBC 2007 280: 21100

図 1

【 図 2 】

NFNATSSSSQDPESLQDRGEGKVAITVISKMLFVEPILEVSSLPPTNST
 TNSATKITAMTDEPTTQPTTEPTTQPTIQTPTTQLPTDSPTQPTTG
 SFCPGPVTLCSDLESHSTEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMA
 FSPFSAISLLTQVLLGAGENTKTNLESILSPKDFTCVHQALGPTTKG
 VTSVSIQIFHSPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWV
 AKMTNNKISRLLDLPDTRLVLLNAILSAKWKTFDPKTRMEPFHF
 KNSVIKVPMMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVQQLQSHNLSLVILVPONLK
 HRLEDMEQALSPSVFKAIKEMKLEMSKFPQLLTLPRIKVITSQDMLSIM
 EKLEFFDFSYDENLGLTEDPDLQVSAHQHTVLELETETGVEAAAASA
 ISVARTLLVFEVQPPFLFVLNDQQHKFPVFMGRVYDPA

7 個のN結合型グリコシル化部位
 8 個のO結合型グリコシル化部位
 29 個のリジン
 反応部位

図 2

【 図 4 】

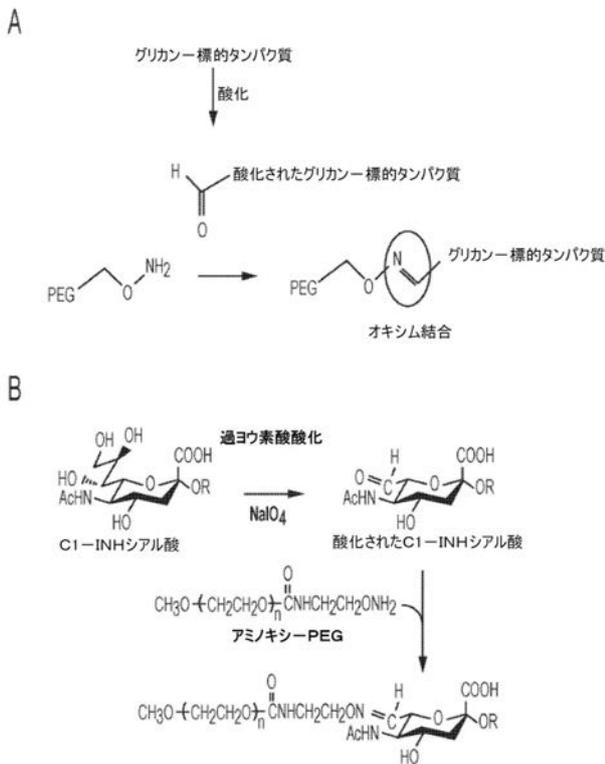


図 4

【 図 3 】

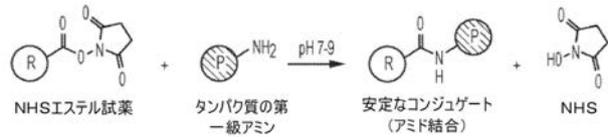


図 3

【 図 5 】

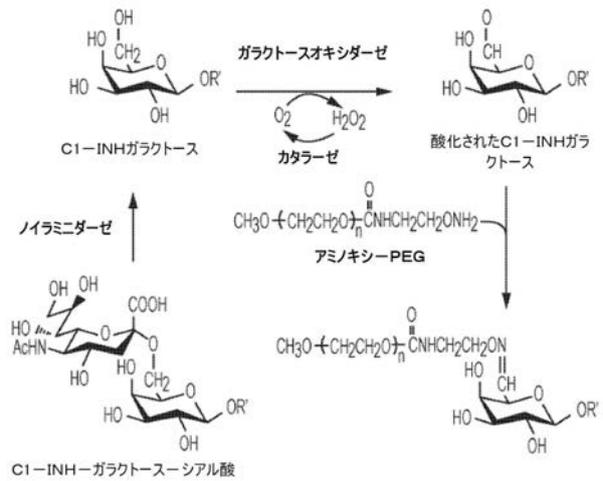


図 5

【 図 6 】

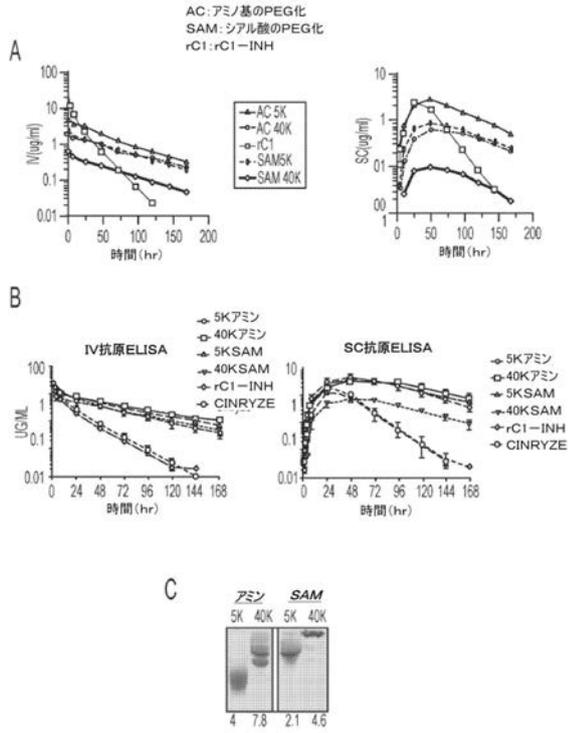


図 6

【 図 7 】

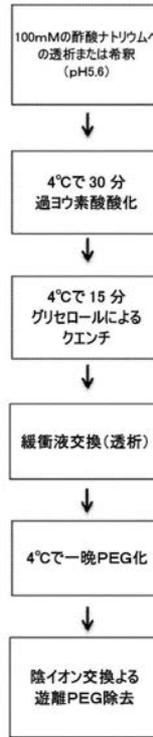


図 7

【 図 8 】

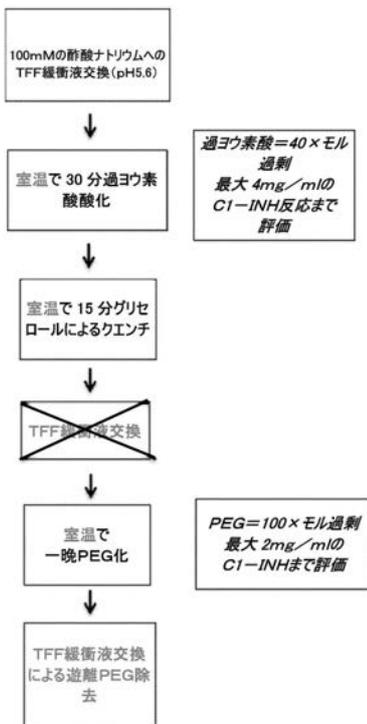


図 8

【 図 9 】

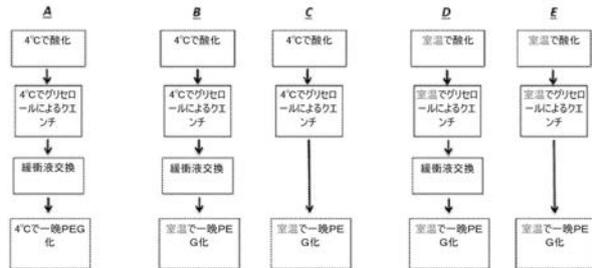
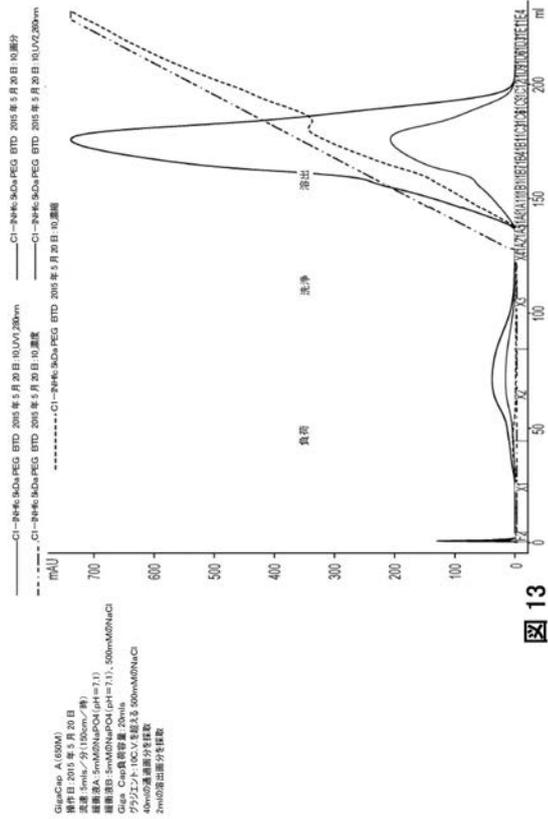


図 9

【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

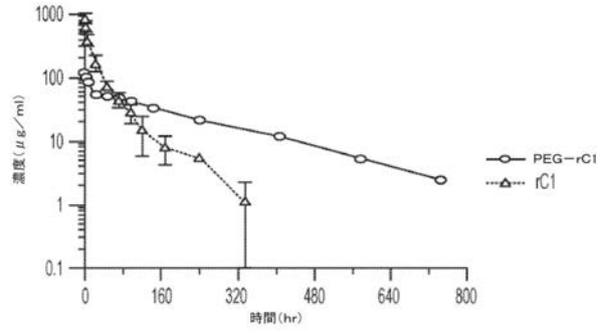
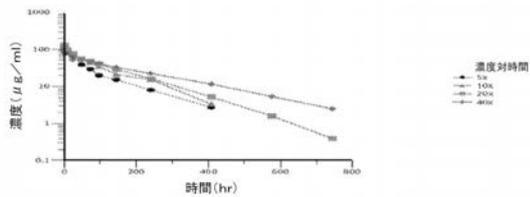


図 14

【 図 1 5 】



| ロット | PEG/C1-1 NH (SEC-MALS) | PEG- 負荷 | t1/2 時間 (hr) | CL mL/kg | Vz mL/時間/kg |
|-----|------------------------|---------|--------------|----------|-------------|
| R7 | 3.2 | 5 x | 108.53 | 0.632 | 98.9 |
| R8 | 5.3 | 10 x | 90.38 | 0.442 | 57.7 |
| R6 | 12 | 20 x | 98.02 | 0.395 | 55.9 |
| R2 | 20 | 40 x | 150.91 | 0.325 | 70.9 |

図 15

【 図 1 6 】

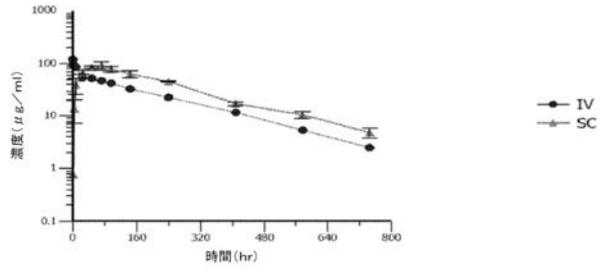


図 16

【 図 17 】

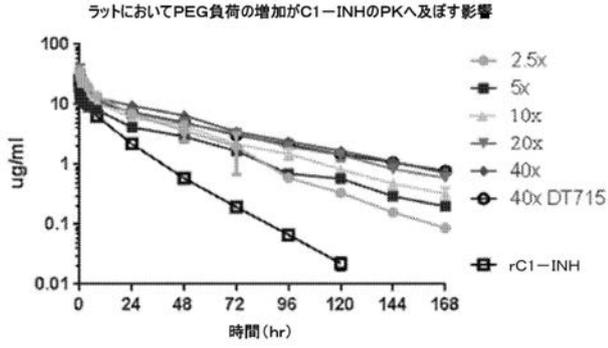


図 17

【 図 18 - 1 】

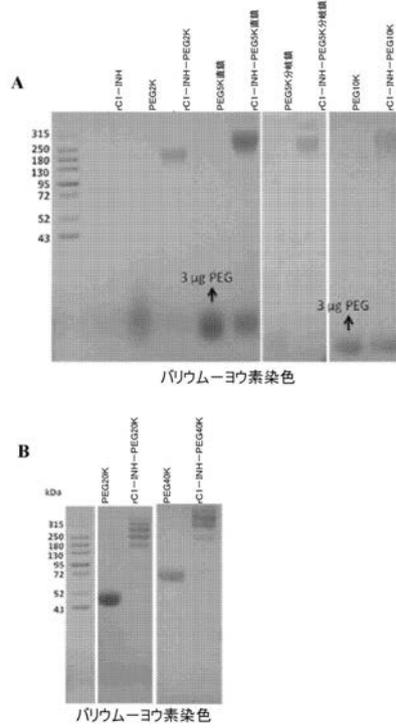


図 18

【 図 18 - 2 】

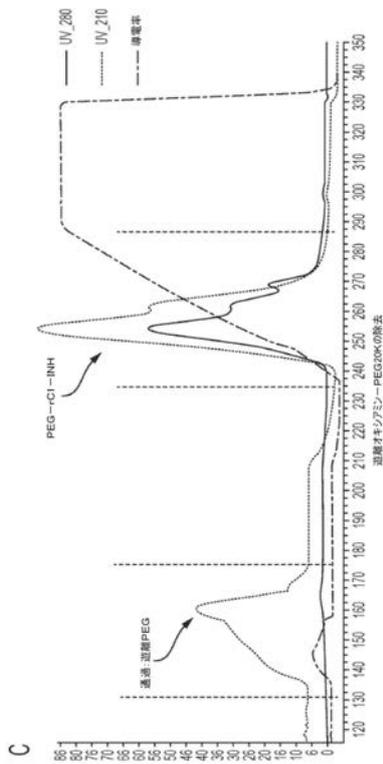


図 18 (次ページに続く)

【 図 18 - 3 】

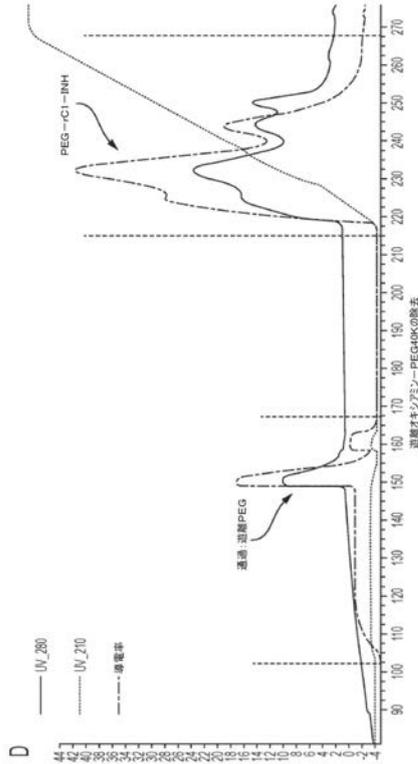
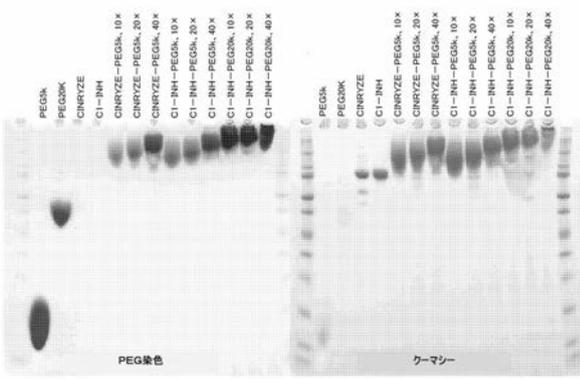


図 18 (次ページに続く)

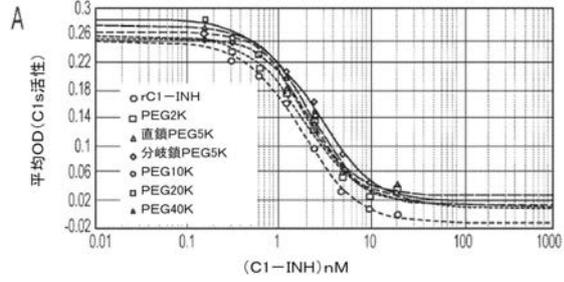
【 図 18 - 4 】



10×、20×、40×
酸化に対する過ヨウ素
酸の過剰分を示す

図 18(次ページに続く)

【 図 19 - 1 】



B

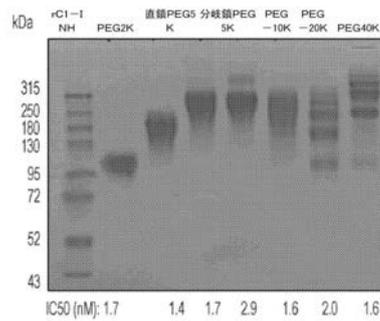


図 19

【 図 19 - 2 】

C

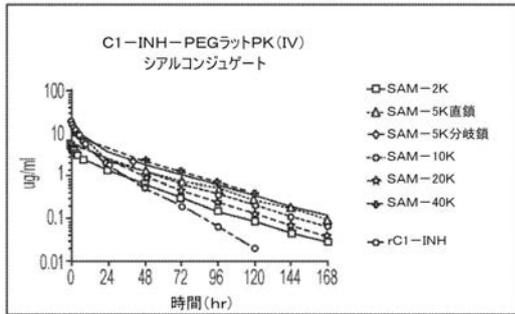
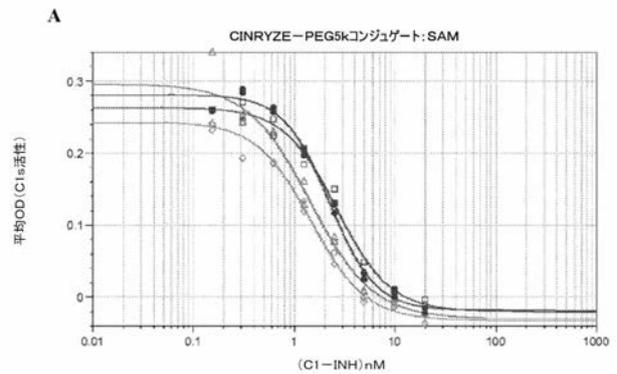


図 19
(次ページに続く)

【 図 20 - 1 】



4-P FIT: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$

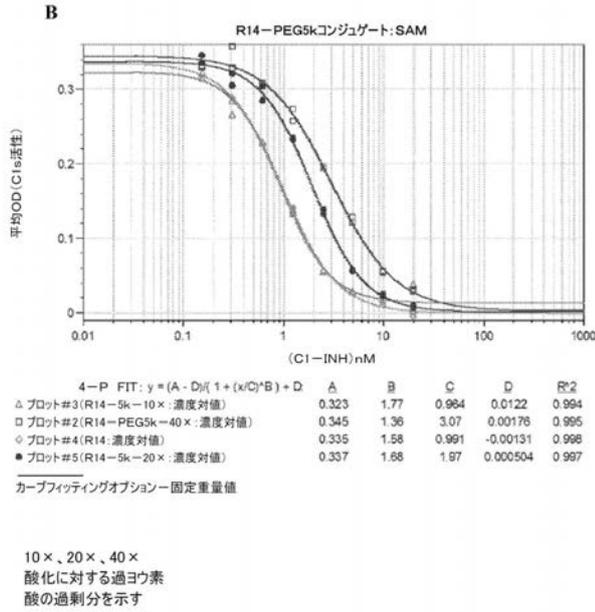
| | A | B | C | D | R ² |
|----------------------------------|-------|------|------|---------|----------------|
| △ プロット#3(CINRYZE-5k-10x:濃度対値) | 0.296 | 1.4 | 1.45 | -0.0308 | 0.97 |
| □ プロット#2(CINRYZE-PEG5k-40x:濃度対値) | 0.263 | 1.64 | 2.7 | -0.0208 | 0.991 |
| ◇ プロット#4(CINRYZE:濃度対値) | 0.243 | 1.6 | 1.49 | -0.033 | 0.988 |
| ● プロット#5(CINRYZE-5k-20x:濃度対値) | 0.281 | 1.9 | 2.26 | -0.0192 | 0.993 |

カーブフィッティングオプションー固定重量値

10×、20×、40×
酸化に対する過ヨウ素
酸の過剰分を示す

図 20

【 図 2 0 - 2 】



【 図 2 0 - 3 】

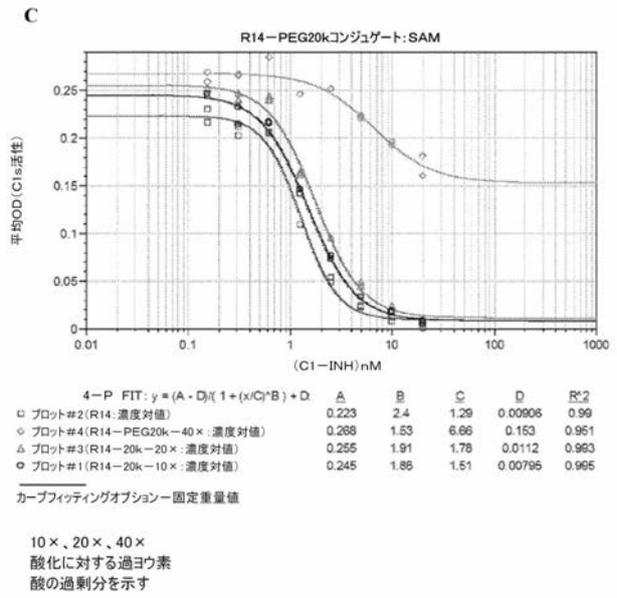


図 20(次ページに続く)

図 20(次ページに続く)

【 図 2 1 】



図 21

【 図 2 2 - 1 】

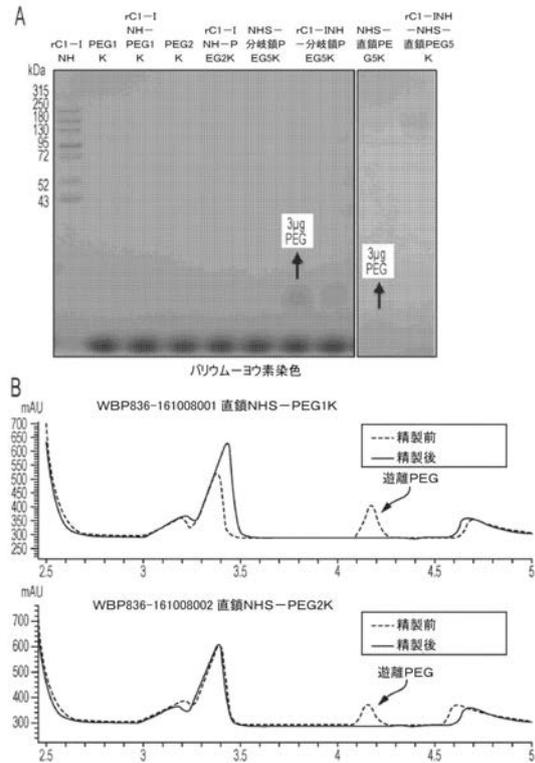
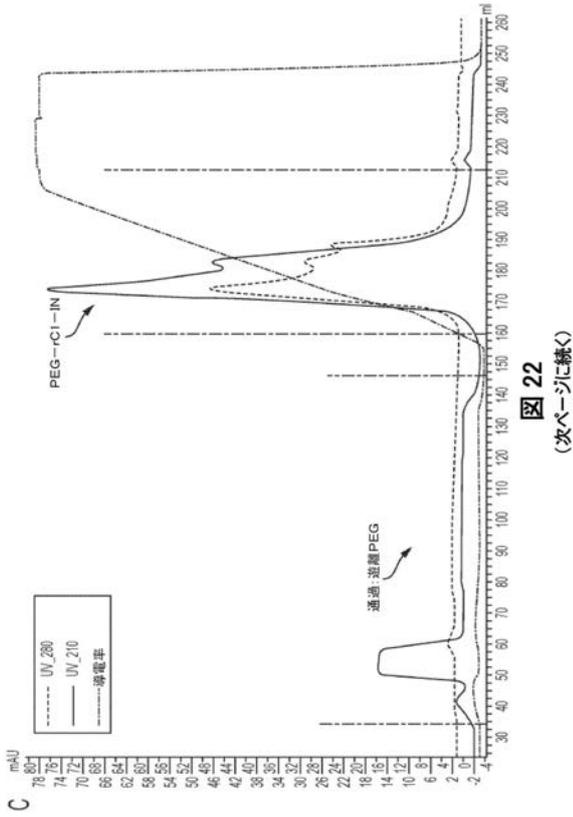
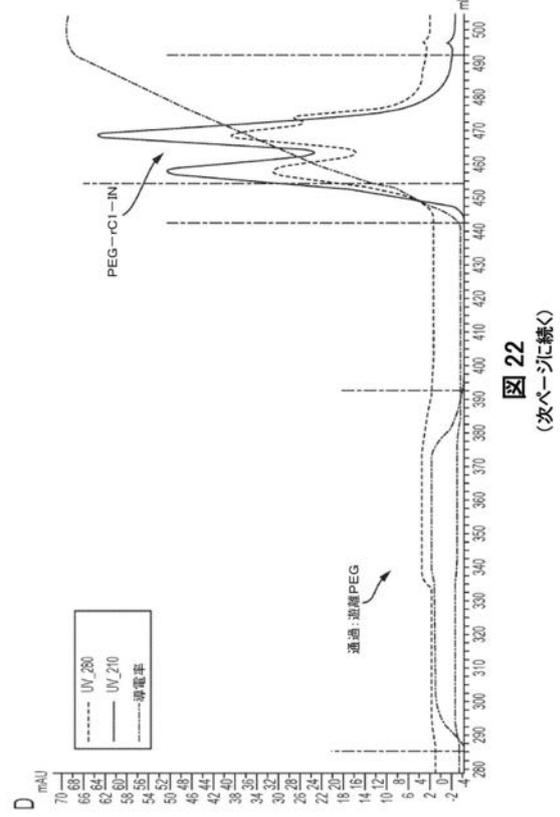


図 22

【 図 2 2 - 2 】



【 図 2 2 - 3 】



【 図 2 3 - 1 】

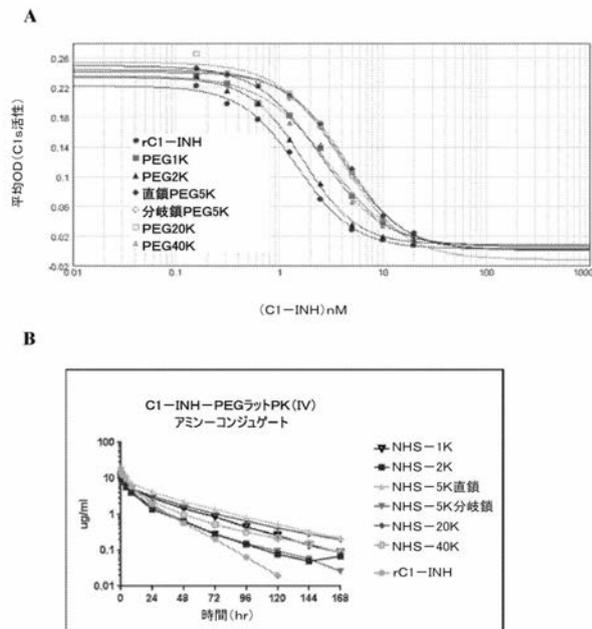


図 23

【 図 2 3 - 2 】

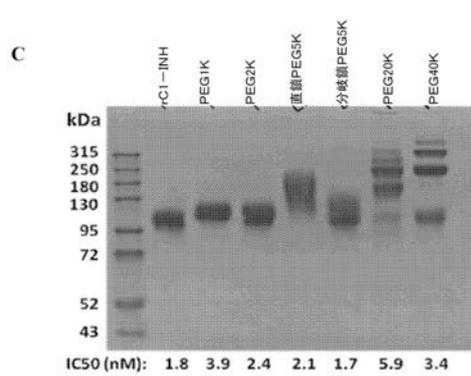
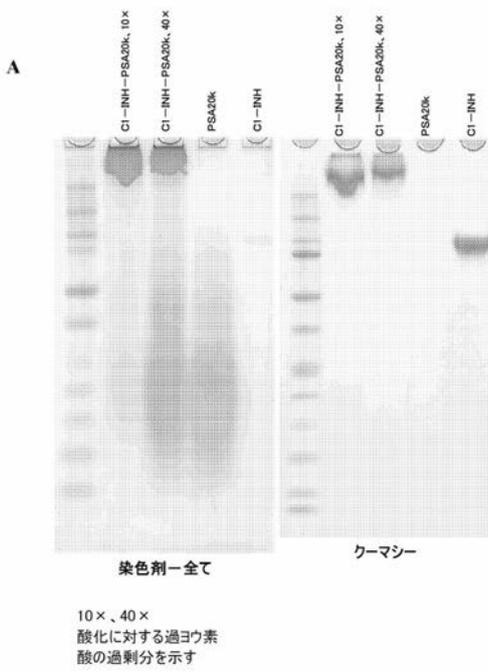


図 23(次ページに続く)

【 図 2 4 - 1 】



【 図 2 4 - 2 】

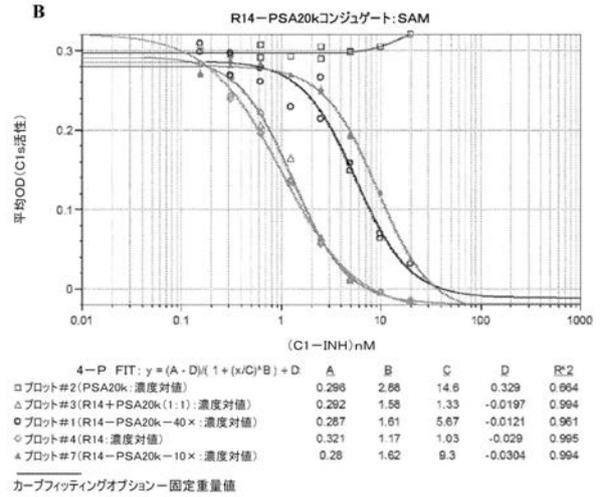
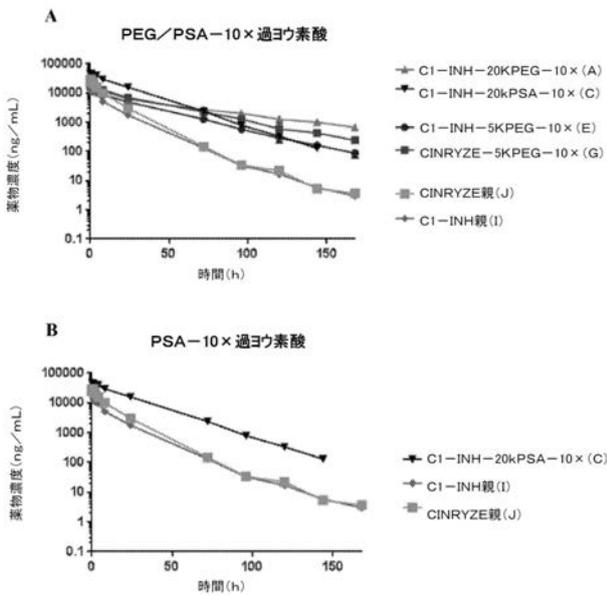


図 24(次ページに続く)

図 24

【 図 2 5 - 1 】



【 図 2 5 - 2 】

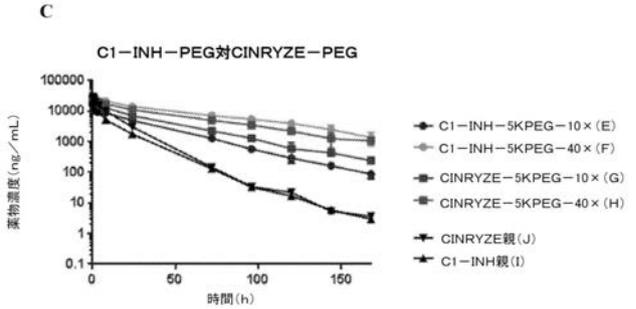


図 25(次ページに続く)

図 25

【配列表】

2019513724000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/US2017/026001 |
|---|

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K47/60 A61K47/61 ADD. | | |
|---|--|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 2013/138694 A1 (ENZON PHARMACEUTICALS INC [US]) 19 September 2013 (2013-09-19) page 1, lines 10-13; claims 1,2,6,7,11; examples 2,2B | 1-99 |
| A | ----- WO 2012/166622 A1 (BAXTER INT [US]; BAXTER HEALTHCARE SA [CH]; SIEKMANN JUERGEN [AT]; WEB) 6 December 2012 (2012-12-06) cited in the application paragraphs [0008], [0009], [0160] - [0164]; claims 1,2,13,15,16 ----- | 1-99 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 11 July 2017 | | Date of mailing of the international search report 25/07/2017 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Siebum, Bastiaan |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/026001

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2013138694 A1 | 19-09-2013 | CA 2867593 A1 | 19-09-2013 |
| | | CA 2867609 A1 | 19-09-2013 |
| | | CA 2867611 A1 | 19-09-2013 |
| | | EP 2825204 A1 | 21-01-2015 |
| | | EP 2825205 A1 | 21-01-2015 |
| | | EP 2838550 A1 | 25-02-2015 |
| | | JP 2015512368 A | 27-04-2015 |
| | | JP 2015512369 A | 27-04-2015 |
| | | JP 2015512370 A | 27-04-2015 |
| | | US 2014309175 A1 | 16-10-2014 |
| | | US 2014315826 A1 | 23-10-2014 |
| | | US 2015224205 A1 | 13-08-2015 |
| | | WO 2013138694 A1 | 19-09-2013 |
| | | WO 2013138730 A1 | 19-09-2013 |
| WO 2013138731 A1 | 19-09-2013 | | |
| WO 2012166622 A1 | 06-12-2012 | AU 2012262428 B2 | 06-07-2017 |
| | | CA 2836478 A1 | 06-12-2012 |
| | | EP 2714093 A1 | 09-04-2014 |
| | | JP 2014520094 A | 21-08-2014 |
| | | TW 201247709 A | 01-12-2012 |
| | | US 2012329127 A1 | 27-12-2012 |
| | | WO 2012166622 A1 | 06-12-2012 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|-------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 K 38/57 (2006.01) | A 6 1 K 38/57 | |
| A 6 1 K 9/08 (2006.01) | A 6 1 K 9/08 | |
| A 6 1 K 9/19 (2006.01) | A 6 1 K 9/19 | |
| A 6 1 K 47/60 (2017.01) | A 6 1 K 47/60 | |
| A 6 1 P 37/02 (2006.01) | A 6 1 P 37/02 | |
| A 6 1 P 19/00 (2006.01) | A 6 1 P 19/00 | |
| A 6 1 P 9/00 (2006.01) | A 6 1 P 9/00 | |
| A 6 1 P 19/08 (2006.01) | A 6 1 P 19/08 | |
| A 6 1 P 17/02 (2006.01) | A 6 1 P 17/02 | |
| A 6 1 P 25/00 (2006.01) | A 6 1 P 25/00 | |
| A 6 1 P 17/00 (2006.01) | A 6 1 P 17/00 | |
| A 6 1 P 25/16 (2006.01) | A 6 1 P 25/16 | |
| A 6 1 P 9/10 (2006.01) | A 6 1 P 9/10 | |
| A 6 1 P 21/04 (2006.01) | A 6 1 P 21/04 | |
| A 6 1 P 25/02 (2006.01) | A 6 1 P 25/02 | |
| A 6 1 K 47/61 (2017.01) | A 6 1 K 47/61 | |
| C 1 2 N 15/12 (2006.01) | C 1 2 N 15/12 | |
| C 1 2 N 15/10 (2006.01) | C 1 2 N 15/10 | 2 0 0 Z |
| C 0 7 K 1/34 (2006.01) | C 0 7 K 1/34 | |
| C 0 7 K 1/18 (2006.01) | C 0 7 K 1/18 | |

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ホームズ, ケビン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0 0

(72)発明者 ノートン, アンジェラ ダブリュー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0 0

(72)発明者 パン, クラーク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0 0

Fターム(参考) 4C076 AA11 AA94 BB11 CC01 CC07 CC11 CC18 CC19 EE23M EE30M
EE59M FF32 FF36 FF63 GG06
4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA22 BA23 BA42 CA18 CA53 CA56
DC32 MA05 MA16 MA44 MA66 NA03 NA12 NA14 ZA021 ZA022
ZA201 ZA202 ZA361 ZA362 ZA891 ZA892 ZA941 ZA942 ZA961 ZA962
ZB071 ZB072 ZC201 ZC202
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA53 BA56 BA57 CA40 CA42 DA56

DA70 DA75 EA24 FA50 FA53 FA71 FA74 GA23