

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6474386号
(P6474386)

(45) 発行日 平成31年2月27日(2019.2.27)

(24) 登録日 平成31年2月8日(2019.2.8)

(51) Int. Cl.	F I	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	Z N A
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/755 (2006.01)	C O 7 K 14/755	
C 1 2 P 21/04 (2006.01)	C 1 2 P 21/04	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
請求項の数 36 (全 56 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-509427 (P2016-509427)	(73) 特許権者	500021413 シーエスエル、リミテッド
(86) (22) 出願日	平成26年4月22日(2014.4.22)		オーストラリア連邦ビクトリア州、パーク ビル、ポプラー、ロード、45
(65) 公表番号	特表2016-518378 (P2016-518378A)	(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(43) 公表日	平成28年6月23日(2016.6.23)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/058093	(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
(87) 国際公開番号	W02014/173873	(72) 発明者	フーベルト・メッツナー ドイツ連邦共和国35041マールブルク ・イムボーデン6
(87) 国際公開日	平成26年10月30日(2014.10.30)	(72) 発明者	シュテファン・シュルテ ドイツ連邦共和国35043マールブルク ・パウエルバッハーシュトラッセ46
審査請求日	平成29年4月10日(2017.4.10)		
(31) 優先権主張番号	13164728.1		
(32) 優先日	平成25年4月22日(2013.4.22)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁(EP)		
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

フォン・ビルブラント因子又はその変異体(VWF)及び野生型第V I I I因子の生物学的活性の少なくとも10%を保持する第V I I I因子の変異体を含む共有結合で連結された複合体であって、該複合体は半減期延長部分を含み、第V I I I因子が、システイン残基での天然に存在するアミノ酸の置換又はシステイン残基の挿入により修飾されており、該システイン残基がVWF中のシステイン残基とジスルフィド架橋を形成し、ただし、これは一方のFcモノマーがVWFに連結され、かつ他方のFcモノマーが第V I I I因子に連結されているヘテロダイマーFc融合物ではない、上記共有結合で連結された複合体。

【請求項2】

共有結合連結が、半減期延長部分によりもたらされるものではない、請求項1に記載の共有結合で連結された複合体。

【請求項3】

第V I I I因子中の置換される天然に存在するアミノ酸が、第V I I I因子a3ドメイン中のアミノ酸から選択される、請求項1又は請求項2に記載の複合体。

【請求項4】

第V I I I因子中の置換される天然に存在するアミノ酸が、F V I I I a3ドメインのアミノ酸1653~1660内若しくはアミノ酸1667~1674内若しくはアミノ酸1675~1688内に位置するか、又はシステインがF V I I I a3ドメインのア

ミノ酸 1653 ~ 1660 若しくはアミノ酸 1667 ~ 1674 若しくはアミノ酸 1675 ~ 1688 の配列中に導入される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 5】

第 V I I I 因子中の置換される天然に存在するアミノ酸が C 末端ドメイン中にある、請求項 1 又は請求項 2 に記載の複合体。

【請求項 6】

V W F は、システイン残基での天然に存在するアミノ酸の置換又はシステイン残基の挿入により修飾されており、該システイン残基が第 V I I I 因子中に導入されたシステイン残基とジスルフィド架橋を形成する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 7】

V W F 中の天然に存在するアミノ酸が D ' 若しくは D 3 ドメイン中のアミノ酸であり、又はシステイン残基の挿入が D ' 若しくは D 3 ドメイン中にある、請求項 6 に記載の複合体。

【請求項 8】

システイン残基が、T I L ' ドメイン、E ' ドメイン、D 3 ドメイン、C 8 - 3 ドメイン、T I L - 3 ドメイン若しくは E - 3 ドメイン中に挿入されているか、又はシステイン残基で置換された V W F 中の天然に存在するアミノ酸が、T I L ' ドメイン、E ' ドメイン、D 3 ドメイン、C 8 - 3 ドメイン、T I L - 3 ドメイン若しくは E - 3 ドメイン中の残基である、請求項 6 又は請求項 7 に記載の複合体。

【請求項 9】

V W F が、F V I I I 結合ドメインを含むか、又は F V I I I 結合ドメインからなる、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 10】

第 V I I I 因子が V W F の 1 つ又はそれ以上のドメインを含むように修飾されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 11】

第 V I I I 因子が V W F の C 末端ドメイン C K を含むように修飾されている、請求項 10 に記載の複合体。

【請求項 12】

第 V I I I 因子が、V W F ドメイン C 6、若しくは C 5 及び C 6、C 3 ~ C 6、又はドメイン C 1 ~ C 6 のうちの 1 つ若しくはそれ以上、又はその変異体も含むように修飾されている、請求項 11 に記載の複合体。

【請求項 13】

第 V I I I 因子が、配列番号 2 の残基 2724 ~ 2812 又はその変異体を含むが、ただし、システイン残基 2773 (又はその等価物) は保存されている、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 14】

C 末端 V W F ドメインが、切断可能なリンカーによって第 V I I I 因子に結合されている、請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 15】

切断可能なリンカーが、第 V I I I 因子のトロンピン切断部位のうちの 1 つを含む、請求項 14 に記載の複合体。

【請求項 16】

リンカー配列が、それぞれ a 3 ドメイン及び D ' D 3 ドメインを介して第 V I I I 因子と V W F との分子間相互作用を可能にするために十分な長さのペプチドを生じるさらなるアミノ酸残基を含む、請求項 14 又は請求項 15 に記載の複合体。

【請求項 17】

第 V I I I 因子が、その C 末端若しくは N 末端で、若しくは第 V I I I 因子の B ドメイン内で修飾されているか、又は第 V I I I 因子の B ドメインを部分的若しくは完全に置き換えて修飾されている、請求項 10 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の複合体。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

第VIIII因子が、VWFのD'D3ドメイン又はそのフラグメントを含むように修飾されている、請求項10又は請求項17に記載の複合体。

【請求項 19】

第VIIII因子が、そのBドメインを部分的又は完全にVWF D'D3ドメイン又はそのフラグメント若しくは変異体で置き換えることにより修飾されている、請求項18に記載の複合体。

【請求項 20】

第VIIII因子が、そのBドメイン内に、又はそのBドメインの代わりに、又はそのBドメインの一部の代わりに、配列番号2の残基746～1241若しくはその変異体若しくはフラグメントを含む、請求項19に記載の複合体。

10

【請求項 21】

第VIIII因子が、第VIIII因子軽鎖のアミノ末端に相当するVWF D'D3ドメインを有する2鎖分子として発現される、請求項17～19のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項 22】

さらなるリンカー配列が、VWFのD'D3領域と第VIIII因子軽鎖ドメインとの間に導入される、請求項17～20のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項 23】

第VIIII因子が遺伝子操作された第VIIII因子である、請求項1～22のいずれか1項に記載の複合体。

20

【請求項 24】

操作された第VIIII因子が、完全若しくは部分的なBドメイン欠失を有するか、変異された第VIIII因子であるか、又は半減期延長部分を有する融合ポリペプチドである、請求項23に記載の複合体。

【請求項 25】

VWFがVWFの半減期延長形態である、請求項1～24のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項 26】

VWFの半減期延長形態が、半減期延長部分を有するVWFの遺伝子操作された融合タンパク質である、請求項25に記載の複合体。

30

【請求項 27】

半減期延長部分が、アルブミン又はその変異体若しくはフラグメント、免疫グロブリン定常領域並びにその部分及び変異体、例えばFcフラグメント又はその変異体、大きい流体力学的体積を有する溶媒和されたランダム鎖（例えばXTEN又はPAS）、アフアミン又はその変異体、アルファ-フェトプロテイン又はその変異体、ビタミンD結合タンパク質又はその変異体、トランスフェリン又はその変異体、ヒト絨毛性ゴナドトロピン-サブユニットのカルボキシル末端ペプチド（CTP）、生理的条件下でアルブミン又は免疫グロブリン定常領域に結合することができるポリペプチド又は脂質から選択される、請求項24～26のいずれか1項に記載の複合体。

40

【請求項 28】

VWFの血漿半減期が、化学修飾、例えば、ポリエチレングリコール（PEG化）、グリコシル化PEG、ヒドロキシルエチルデンプン（HES化）、ポリシアル酸、ヘパロサンポリマー、エラスチン様ポリペプチド又はヒアルロン酸の結合により延長される、請求項1又は請求項25のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項 29】

VWFがモノマーとして発現されるか、又はVWFがダイマーとして発現される、請求項1～28のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項 30】

VWFがマルチマーを形成する、請求項1～28のいずれか1項に記載の複合体。

50

【請求項 3 1】

共有結合連結が、1つ又はそれ以上の化学的に合成された架橋剤の使用により得られる、請求項 1 又は請求項 2 8 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 3 2】

第 V I I I 因子及び V W F が、1つより多くの共有ジスルフィド結合又はペプチド若しくはタンパク質性リンカーにより接続される、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 3 3】

真核生物細胞株において第 V I I I 因子及び V W F を同時発現させることを含む、請求項 1 ~ 3 0 又は請求項 3 2 のいずれか 1 項に記載の第 V I I I 因子及び V W F の共有結合複合体を製造する方法。

10

【請求項 3 4】

出血障害の処置又は予防における使用のための、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の共有結合複合体。

【請求項 3 5】

出血障害が血友病 A 又はフォン・ビルブラント病である、請求項 3 4 に記載の複合体。

【請求項 3 6】

請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の複合体を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、フォン・ビルブラント (von Willebrand) 因子又はその変異体 (VWF) 及び第 V I I I 因子又はその変異体 (第 V I I I 因子) の共有結合複合体に関し、ここで該複合体は、インビボでの延長された半減期を有するように修飾されている。本発明はさらに、複合体を製造する方法、さらには出血事象を処置又は予防するための複合体の治療的又は予防的使用に関する。

【背景技術】

【0002】

血液凝固因子の欠乏により引き起こされる様々な出血障害がある。最も一般的な障害は血友病 A 及び B であり、これらはそれぞれ血液凝固第 V I I I 因子及び第 I X 因子の欠乏により生じる。別の公知の出血障害はフォン・ビルブラント病である。

30

【0003】

血漿において、第 V I I I 因子 (F V I I I) は、大部分がフォン・ビルブラント因子との非共有結合複合体として存在する。プロペプチド切断後の 2 3 3 2 までのアミノ酸のポリペプチドである成熟 F V I I I は、図 1 に示されるいくつかのドメインから構成される。凝固における F V I I I の機能は、第 X 因子から第 X a 因子への第 I X a 因子依存性変換を加速することである。F V I I I とフォン・ビルブラント因子との複合体形成に起因して、F V I I I 及びフォン・ビルブラント因子は同じ分子の 2 つの機能であると長い間推測された。70年代になってようやく、F V I I I 及びフォン・ビルブラント因子が生理的条件下で複合体を形成する別々の分子であることが明らかになった。80年代には、約 0 . 2 n m o l / L という F V I I I とフォン・ビルブラント因子との解離定数が決定され (非特許文献 1) 、そして両方の分子の D N A 配列が決定された。

40

【0004】

古典的血友病又は血友病 A は遺伝性の出血性障害である。これは染色体 X 連鎖性血液凝固第 V I I I 因子欠損から生じ、そして 1 0 , 0 0 0 人あたり 1 人と 2 人との間の発生率でほとんど男性のみに影響を及ぼす。X 染色体欠損は、それら自体血友病ではない女性キャリアにより伝達される。血友病 A の臨床症状は増加した出血傾向である。第 V I I I 因子濃縮物での処置が導入される以前は、重篤な血友病を有する人物の平均寿命は 2 0 年未満であった。血漿由来の第 V I I I 因子濃縮物の使用は、平均寿命を広く増加させて血友病患者の状況をかなり改善し、かれらの大部分に事実上通常の生活を送る可能性を与えて

50

きた。しかし、血漿由来濃縮物及びそれらの使用に伴う特定の問題があり、それらのうち最も深刻なものはB型肝炎、非A型非B型肝炎及びHIVを引き起こすウイルスのようなウイルスの伝染であった。しかし、近年、様々なウイルス不活化方法及び新しい高度に精製されたV因子濃縮物が開発され、それにより血漿由来V因子に関して非常に高い安全基準も確立されてきた。

【0005】

予防的処置を受けている重篤な血友病A患者において、FVIIIは、約12時間というFVIIIの短い血漿半減期のために週に約3回静脈内(i.v.)投与されなければならない。各i.v.投与は煩雑であり、痛みを伴い、そして特に大部分は過程で患者自身により、又は血友病Aと診断された児童の両親により行われるので、感染のリスクを伴う。

10

【0006】

従って、より少ない頻度で投与されなければならないFVIIIを含有する医薬組成物の製造を可能にする、増加された機能的半減期を有するFVIIIを生成することは非常に望ましいだろう。

【0007】

細胞受容体との相互作用を減少させることにより(特許文献1、特許文献2)、ポリマーをFVIIIに共有結合で結合することにより(特許文献3、特許文献4及び特許文献5)、FVIIIの封入により(特許文献6)、新しい結合部位の導入により(特許文献7)、ペプチド連結(特許文献8及び特許文献9)若しくはジスルフィド連結(特許文献10)のいずれかによりA2ドメインをA3ドメインに共有結合で結合することにより、又はA1ドメインとA2ドメインとの間のトロンビン切断を防止する変異を導入し、そしてそれ故トロンビン活性化後にA1ドメインをA2ドメインに共有結合で結合したままにすること(特許文献11)のいずれかにより、FVIIIの機能的半減期を延長させるための幾つかの試みがなされた。

20

【0008】

FVIII又はフォン・ビルブラント因子の機能的半減期を増強するための別のアプローチは、増加した半減期を有することにより、ペグ化フォン・ビルブラント因子が血漿中に存在するFVIIIの半減期も間接的に増強するであろうということを念頭に置いた、FVIIIのPEG化(特許文献12、特許文献13、特許文献14)又はフォン・ビルブラント因子のPEG化(特許文献15)によるものである。さらに、アルブミン又は免疫グロブリンの定常領域Fcのような半減期増強ポリペプチドとのFVIIIの融合タンパク質が記載されている(特許文献16、特許文献17及び特許文献18)。

30

【0009】

フォン・ビルブラント病(VWD)の様々な形態において、欠失しているか、機能不全であるか又は減少した量でしか利用可能でないフォン・ビルブラント因子は、哺乳動物の血漿中に存在するマルチマーの接着性糖タンパク質であり、多数の生理学的機能を有する。一時止血の間、フォン・ビルブラント因子は、血小板表面上の特定の受容体とコラーゲンのような細胞外マトリックスの成分との間のメディエーターとして作用する。さらに、フォン・ビルブラント因子は、プロコアグラント(prococagulant)FVIIIのための担体及び安定化タンパク質として役立つ。フォン・ビルブラント因子は、内皮細胞及び巨核球において2813アミノ酸の前駆体分子として合成される。野生型VWFのアミノ酸配列及びcDNA配列は、非特許文献2に開示される。前駆体ポリペプチドのプレ-プロ-フォン・ビルブラント因子は、22残基のシグナルペプチド、741残基のプロペプチド及び成熟血漿フォン・ビルブラント因子において見出される2050残基のポリペプチドからなる(非特許文献3)、プロ-フォン・ビルブラント因子及び成熟フォン・ビルブラント因子モノマー単位については図2も参照のこと。小胞体におけるシグナルペプチドの切断後に、C末端ジスルフィド架橋が、フォン・ビルブラント因子の2つのモノマー間に形成される。分泌経路を通るさらなる輸送の間に、12のN連結及び10のO連結炭水化物側鎖が付加される。より重要なことには、フォン・ビルブラント因子ダイ

40

50

マーは、N末端ジスルフィド架橋を介して多量体化され、そして741アミノ酸長のプロペプチドは、後期 (late) ゴルジ体において酵素PACE/フューリンにより開裂される。プロペプチドに加えてフォン・ビルブラント因子の高分子量マルチマー (VWF-HMWM) も、内皮細胞のバイベル・パラデ小体 (Weibel-Pallade bodies) 又は血小板の顆粒において貯蔵される。

【0010】

血漿中に分泌されると、プロテアーゼADAMTS13は、フォン・ビルブラント因子のA2ドメイン内で巨大フォン・ビルブラント因子マルチマーを切断する。血漿フォン・ビルブラント因子は、約500kDaの単一のダイマーから、10,000kDaを超える分子量の20まで又は20より多くのダイマーからなるマルチマーまでの全範囲からなる。VWF-HMWMは最も強い止血活性を有し、これはリストセチン補因子活性アッセイ (VWF:RCo) により測定され得る。VWF:RCo/フォン・ビルブラント因子抗原の比が高くなるほど、高分子量マルチマーの相対的な量が高くなる。

10

【0011】

フォン・ビルブラント因子の欠損がフォン・ビルブラント病 (VWD) の原因であり、これは、程度の差はあるが顕著な出血表現型により特徴づけられる。3型VWDは、フォン・ビルブラント因子が本質的に完全に失われている最も重症の形態であり、1型VWDは、フォン・ビルブラント因子の減少したレベルと関連しており、そしてその表現型は非常に穏やかであり得る。2型VWDは、フォン・ビルブラント因子の質的欠損に関連し、3型VWDと同程度に重症であり得る。2型VWDは多くのサブフォーム (sub-forms) を有し、それらのいくつかは、高分子量マルチマーの欠失又は減少を伴う。2A型VWDは、中間及び大型マルチマーの両方の欠失を特徴とし、従って血小板糖タンパク質1受容体に結合する能力が減少した質的に欠損したVWFを特徴とする。2B型VWDは、最も高分子量のマルチマーの欠損を特徴とする。質的に欠損したVWFの血小板膜上の糖タンパク質1受容体に結合する能力は異常に増強され、血小板への自発的な結合並びにその後の結合した血小板及び大きなフォン・ビルブラントマルチマーのクリアランスをもたらす。2M型VWDもまた、正常マルチマー分布以外はフォン・ビルブラント因子抗原レベルと同様に、血小板膜上の糖タンパク質1受容体に結合するその減少した能力を特徴とするフォン・ビルブラント因子の質的欠損である。2N型VWD (Normandy) は、フォン・ビルブラント因子における質的欠損であり、この場合、凝固因子FVIIへのフォン・ビルブラント因子の結合の欠損がある。フォン・ビルブラント因子及びフォン・ビルブラント因子マルチマーの量は正常であるが、患者はFVIIの減少したレベルを示し、血友病Aと類似した表現型をもたらす。

20

30

【0012】

VWDは、ヒトにおける最も多い遺伝性出血障害であり、VWFの型によって1-デアミノ-8-D-アルギニン-バソプレシン (DDAVP) を用いて細胞内貯蔵プールからフォン・ビルブラント因子を放出させる治療により、又は血漿起源若しくは組み換え起源のフォン・ビルブラント因子を含有する濃縮物を用いた置換治療により処置され得る。フォン・ビルブラント因子は、例えば特許文献19に記載されるように、ヒト血漿から製造され得る。特許文献20は、組み換えフォン・ビルブラント因子を単離する方法を記載する。

40

【0013】

血漿において、FVIIは高い親和性でフォン・ビルブラント因子に結合し、これにより早熟異化から保護され、従って一時止血におけるその役割に加えて、FVIIの血漿レベルの調節における重大な役割を果たす。結果として、フォン・ビルブラント因子は、二次止血の制御における中枢因子でもある。血漿中でフォン・ビルブラント因子に結合した非活性化FVIIの半減期は約12時間である。フォン・ビルブラント因子が全く存在しないかほとんど存在しない3型VWDにおいて、FVIIの半減期は約2時間しかなく、このような患者ではFVIIの減少した濃度に起因して軽度から中程度の血友病Aの症状が生じる。

50

【 0 0 1 4 】

F V I I I に対するフォン・ビルブラント因子の安定化効果は、C H O 細胞における F V I I I の組み換え発現を補助するためにも使用されている（非特許文献 4）。F V I I I を安定化するためにフォン・ビルブラント因子を使用する他の最近の試みは、いくつかの近年の特許出願に開示されている（特許文献 2 1、特許文献 2 2、特許文献 2 3、特許文献 2 4）。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 5 】

【 特許文献 1 】 W O 0 3 / 0 9 3 3 1 3 A 2

10

【 特許文献 2 】 W O 0 2 / 0 6 0 9 5 1 A 2

【 特許文献 3 】 W O 9 4 / 1 5 6 2 5

【 特許文献 4 】 W O 9 7 / 1 1 9 5 7

【 特許文献 5 】 U S 4 9 7 0 3 0 0

【 特許文献 6 】 W O 9 9 / 5 5 3 0 6

【 特許文献 7 】 W O 9 7 / 0 3 1 9 3

【 特許文献 8 】 W O 9 7 / 4 0 1 4 5

【 特許文献 9 】 W O 0 3 / 0 8 7 3 5 5

【 特許文献 1 0 】 W O 0 2 / 1 0 3 0 2 4 A 2

【 特許文献 1 1 】 W O 2 0 0 6 / 1 0 8 5 9 0

20

【 特許文献 1 2 】 W O 2 0 0 7 / 1 2 6 8 0 8

【 特許文献 1 3 】 W O 2 0 0 6 / 0 5 3 2 9 9

【 特許文献 1 4 】 W O 2 0 0 4 / 0 7 5 9 2 3

【 特許文献 1 5 】 W O 2 0 0 6 / 0 7 1 8 0 1

【 特許文献 1 6 】 W O 2 0 0 4 / 1 0 1 7 4 0

【 特許文献 1 7 】 W O 2 0 0 8 / 0 7 7 6 1 6

【 特許文献 1 8 】 W O 2 0 0 9 / 1 5 6 1 3 7

【 特許文献 1 9 】 E P 0 5 0 3 9 9 1

【 特許文献 2 0 】 E P 0 7 8 4 6 3 2

【 特許文献 2 1 】 W O 2 0 1 1 0 6 0 2 4 2

30

【 特許文献 2 2 】 W O 2 0 1 3 0 8 3 8 5 8

【 特許文献 2 3 】 W O 2 0 1 3 1 0 6 7 8 7

【 特許文献 2 4 】 W O 2 0 1 4 0 1 1 8 1 9

【 非特許文献 】

【 0 0 1 6 】

【 非特許文献 1 】 L e y t e e t a l . , B i o c h e m J 1 9 8 9 , 2 5 7 : 6 7 9 - 6 8 3

【 非特許文献 2 】 C o l l i n s e t a l . 1 9 8 7 , P r o c N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 4 : 4 3 9 3 - 4 3 9 7

【 非特許文献 3 】 F i s c h e r e t a l . , F E B S L e t t . 3 5 1 : 3 4 5 - 3 4 8 , 1 9 9 4

40

【 非特許文献 4 】 K a u f m a n e t a l . 1 9 8 9 , M o l C e l l B i o l

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 7 】

F V I I I の半減期を増加させるためのさらにより良好なアプローチの必要性がまだなお存在する。半減期を延長したフォン・ビルブラント因子分子への F V I I I 分子の共有結合が、F V I I I 部分に半減期延長をもたらし、その結果、その半減期が融合していない半減期延長フォン・ビルブラント因子分子と同様になるということが、本出願の発明者らに見出された。この方法を用いて、ラット P K モデルにおいて遊離 F V I I I の約 3 倍

50

の半減期延長が見られた。本発明は、フォン・ビルブラント因子又はその変異体（VWF）と第V I I I因子との共有結合複合体、特に複合体でのVWF成分の半減期を増強するために使用する方法を提供し、これは出血障害の治療及び予防において有利である長い半減期を有する安定な複合体の供給を可能にする。

【課題を解決するための手段】

【0018】

発明の要旨

第一の局面において、本発明は、フォン・ビルブラント因子又はその変異体（VWF）及び第V I I I因子（F V I I I）又はその変異体（第V I I I因子）を含む共有結合複合体に関し、ここで該複合体は、インビボで延長された半減期を有するように修飾されている。好ましくは、それは、半減期延長部分を含むように修飾されている。VWF及び第V I I I因子は共有結合複合体を形成し；この複合体のいずれかの部分、好ましくはVWF部分に半減期延長部分が結合されている。好ましくは、VWF及び第V I I I因子は、直接共有結合により、例えばVWFの一部であるシステインの第V I I I因子の一部であるシステインとのジスルフィド架橋を介して、又はVWFを第V I I I因子と、場合によりペプチドリンカーを介して融合させることにより連結されるが、ただし、共有結合複合体は、Fc鎖の一方がVWFに融合され、そして他方のFc鎖がF V I I I又はその変異体に融合されているFc融合タンパク質ではない。好ましくは、共有結合連結は、半減期延長部分によりもたらされるものではない。

【0019】

第一の実施態様において、第V I I I因子は、VWFとジスルフィド架橋を形成するように修飾される（ただし、ジスルフィド架橋は、それぞれVWF及び第V I I I因子に融合されているFc分子の2鎖の間にはない）。好ましくは、第V I I I因子は、天然に存在するアミノ酸のシステイン残基での置換により、又はVWF中のシステイン残基とジスルフィド形成するシステイン残基の挿入により修飾されている。好ましくは、第V I I I因子において置換される天然に存在するアミノ酸は、a3ドメイン中のアミノ酸から選択され、又はシステイン残基は、a3ドメイン中に挿入される（配列番号6の残基1649～1689）。より好ましくは、天然に存在するアミノ酸は酸性残基であり、好ましくは保存された酸性残基、又は出血性表現型に関与する残基、又はF V I I I a3ドメインにおいて硫酸化され得るTyr残基である。より好ましくは、第V I I I因子において置換される天然に存在するアミノ酸は、第V I I I因子a3ドメインのアミノ酸1653～1660内若しくはアミノ酸1667～1674内若しくはアミノ酸1675～1688内に位置し、又はシステインは、第V I I I因子a3ドメインのアミノ酸1653～1660若しくはアミノ酸1667～1674若しくはアミノ酸1675～1688の配列中に導入される。なおより好ましくは、システインで置換される第V I I I因子a3ドメイン中の天然に存在するアミノ酸は、配列番号6中のT1653、L1655、D1658、E1660、S1669、V1670、N1672、K1673、K1674、E1675、D1676及び/若しくはN1685、又は第V I I I因子の遺伝子操作された形態における等価な位置から選択される。最も好ましくは、システインで置換されるa3ドメイン中の天然に存在するアミノ酸は、配列番号6中のT1654、Q1656、F1677、D1678、I1679、Y1680、D1681、E1682、D1683、E1684、Q1686、S1687及び/若しくはP1688又は第V I I I因子の遺伝子操作された形態の等価な位置から選択される。

【0020】

別の実施態様において、システイン残基はC末端ドメインに挿入されるか、又はシステイン残基で置換される天然に存在するアミノ酸は、第V I I I因子のC末端ドメインにあり、好ましくはこの残基は、配列番号6中のI2098、S2119、N2129、R2150、P2153、W2229、Q2246又は第V I I I因子の操作された形態中の等価な位置から選択される。

【0021】

10

20

30

40

50

本発明の第一の局面のさらなる好ましい実施態様において、VWFはまた、天然に存在するアミノ酸のシステイン残基での置換により、又は第VII因子中に導入されたシステイン残基とのジスルフィド架橋を形成するシステイン残基の挿入により修飾される。好ましくは、システイン残基はD'若しくはD3ドメインに挿入されるか(図2を参照のこと)、又はシステイン残基で置換されるVWF中の天然に存在するアミノ酸は、D'若しくはD3ドメイン中の残基又はD'若しくはD3ドメイン中の塩基性若しくは高度に保存された残基若しくはN-VWD型に含まれる残基若しくはVWF分子の表面上の露出されたアミノ酸である。本発明の好ましい実施態様において、システイン残基は、TIL'ドメイン、E'ドメイン、VWD3ドメイン、C8-3ドメイン、TIL-3ドメイン若しくはE-3ドメイン中に挿入されるか、又はシステイン残基で置換されるVWF中の天然に存在するアミノ酸は、TIL'ドメイン、E'ドメイン、VWD3ドメイン、C8-3ドメイン、TIL-3ドメイン若しくはE-3ドメイン中の残基である(全てZhou et al (2012) Blood 120 (2)、449-458により定義されるとおり)。例えば、VWF中の天然に存在するアミノ酸は、K773、G785、E787、A/T789、K790、T791、Q793、N794、M800、R820、R826、F830、H831、K834、E835、P838、K843、R852、R854、K855、W856、H861、H874、K882、L884、R906、K912、H916、K920、K923、R924、K940、R945、K948、H952、R960、K968、R976、H977、K985、K991、K1026、R1035、K1036、K1052、Q1053、K1073又はH1074から選択される。好ましくは、VWF中の天然に存在するアミノ酸は、配列番号2中のY795、R816、H817、P828、D853、D879、K922、D951、E1078、E1161、及び/若しくはR1204又はVWFの操作された形態中の等価な位置から選択される。より好ましくは、VWF中の天然に存在するアミノ酸は、配列番号2のR768、R782、H817、D853、E933、L984、E1015、D1076、E1078、P1079、K1116及び/若しくはN1134又は例えばVWFの操作された形態中の等価な位置から選択される。

【0022】

より好ましくは、VWF及びFVII中の天然に存在するアミノ酸残基の置換の以下の組み合わせのうちの一つ又はそれ以上が導入される：

A/T789C : D1658C、M800C : D1658C、P828C : D1658C、F830C : D1658C、P838C : D1658C、D853C : D1658C、R924C : D1658C、E1078C : D1658C、F830C : D1663C、P838C : D1663C、D853C : D1663C、E1078C : D1663C、E1078C : Y1664C、P838C : D1665C、R816C : D1666C、F830C : D1666C、E835C : D1666C、T791C : E1671C、F830C : E1671C、E835C : E1671C、D879C : E1671C、A/T789C : E1675C、T791C : E1675C、N794C : E1675C、P828C : E1675C、F830C : E1675C、E835C : E1675C、P838C : E1675C、D879CE1675C、R924C : E1675C、E1078C : E1675C、A/T789C : D1676C、T791C : D1676C、N794C : D1676C、F830C : D1676C、E835C : D1676C、A/T789C : D1678C、F830C : D1678C、E835C : D1678C、A/T789C : I1679C、M800C : I1679C、F830C : I1679C、E835C : I1679C、R854C : I1679C、D879C : I1679C、A/T789C : Y1680C、T791C : Y1680C、Y795C : Y1680C、M800C : Y1680C、R816C : Y1680C、F830C : Y1680C、E835C : Y1680C、R854C : Y1680C、D879C : Y1680C、A/T789C : E1682C、Y795C : E1682C、R816C : E1682C、P828C : E1682C、E835C : E1682C、P838C : E1682C、R85

10

20

30

40

50

4 C : E 1 6 8 2 C、D 8 7 9 C : E 1 6 8 2 C、Q 1 0 5 3 C : E 1 6 8 2 C。

【 0 0 2 3 】

なおよび好ましくは、VWF及びFVIIII中の天然に存在するアミノ酸残基の置換の以下の組み合わせのうちの一つ又はそれ以上が導入される：

F 1 6 7 7 C : R 7 6 8 C、I 1 6 7 9 C : R 7 6 8 C、Y 1 6 8 0 C : R 7 6 8 C、N 1 6 8 5 C : R 7 6 8 C、T 1 6 5 4 C : R 7 8 2 C、E 1 6 7 5 C : R 7 8 2 C、N 1 6 8 5 C : R 7 8 2 C、Q 1 6 8 6 C : Y 7 9 5 C、S 1 6 8 7 C : Y 7 9 5 C、P 1 6 8 8 C : Y 7 9 5 C、P 1 6 8 8 C : Y 7 9 5 C、E 1 6 7 5 C : H 8 1 6 C、D 1 6 7 6 C : R 8 1 6 C、Y 1 6 8 0 C : R 8 1 6 C、E 1 6 8 2 C : R 8 1 6 C、P 1 6 8 8 C : R 8 1 6 C、Y 1 6 8 0 C : H 8 1 7 C、N 1 6 8 5 C : H 8 1 7 C、Q 1 6 8 6 C : H 8 1 7 C、S 1 6 8 7 C : H 8 1 7 C、I 1 6 7 9 C : P 8 2 8 C、Y 1 6 8 0 C : D 8 5 3 C、N 1 6 8 5 C : D 8 5 3 C、T 1 6 5 4 C : D 8 7 9 C、P 1 6 8 8 C : E 9 3 3 C、P 1 6 8 8 : T 9 5 1 C、T 1 6 5 3 C : L 9 8 4 C、T 1 6 5 4 C : L 9 8 4 C、L 1 6 5 5 C : L 9 8 4 C、S 1 6 6 9 C : L 9 8 4 C、K 1 6 7 3 C : L 9 8 4 C、D 1 6 8 3 C : L 9 8 4 C、T 1 6 5 3 C : E 1 0 1 5 C、L 1 6 5 5 C : E 1 0 1 5 C、S 1 6 6 9 C : E 1 0 1 5 C、V 1 6 7 0 C : E 1 0 1 5 C、N 1 6 7 2 C : E 1 0 1 5 C、K 1 6 7 3 C : E 1 0 1 5 C、D 1 6 7 8 C : E 1 0 1 5 C、I 1 6 7 9 C : E 1 0 1 5 C、E 1 6 8 4 C : E 1 0 1 5 C、S 1 6 8 7 C : E 1 0 1 5 C、F 1 6 7 7 C : V 1 0 2 7 C、I 1 6 7 9 C : V 1 0 2 7 C、P 1 6 8 8 C : V 1 0 2 7 C、S 1 6 5 7 C : D 1 0 7 6 C、K 1 6 7 3 C : D 1 0 7 6 C、D 1 6 7 6 C : D 1 0 7 6 C、F 1 6 7 7 C : D 1 0 7 6 C、I 1 6 7 9 C : D 1 0 7 6 C、E 1 6 8 2 C : D 1 0 7 6 C、D 1 6 8 3 C : D 1 0 7 6 C、Q 1 6 8 6 C : D 1 0 7 6 C、D 1 6 7 6 C : E 1 0 7 8 C、I 1 6 7 9 C : E 1 0 7 8 C、Y 1 6 8 0 C : E 1 0 7 8 C、T 1 6 5 3 C : P 1 0 7 9 C、L 1 6 5 5 C : P 1 0 7 9 C、S 1 6 5 7 C : P 1 0 7 9 C、D 1 6 5 8 C : P 1 0 7 9 C、E 1 6 8 2 C : P 1 0 7 9 C、V 1 6 7 0 C : K 1 1 1 6 C、K 1 6 7 3 C : K 1 1 1 6 C、D 1 6 7 6 C : K 1 1 1 6 C、D 1 6 7 8 C : K 1 1 1 6 C、D 1 6 8 1 C : K 1 1 1 6 C、Q 1 6 8 6 C : K 1 1 1 6 C、P 1 6 8 8 C : K 1 1 1 6 C、T 1 6 5 3 C : N 1 1 3 4 C、L 1 6 5 5 C : N 1 1 3 4 C、E 1 6 6 0 C : N 1 1 3 4 C、D 1 6 7 8 C : N 1 1 3 4 C、D 1 6 8 3 C : N 1 1 3 4 C、E 1 6 8 4 C : N 1 1 3 4 C、Q 1 6 8 6 C : N 1 1 3 4 C、T 1 6 5 3 C : E 1 1 6 1 C、L 1 6 5 5 C : E 1 1 6 1 C、K 1 6 7 4 C : E 1 1 6 1 C、D 1 6 7 6 C : E 1 1 6 1 C、E 1 6 8 4 C : E 1 1 6 1 C、S 1 6 8 7 C : E 1 1 6 1 C、P 1 6 8 8 C : R 1 2 0 4 C。

【 0 0 2 4 】

最も好ましくは、FVIIII及びVWF中の天然に存在するアミノ酸残基の置換の以下の組み合わせのうちの一つ又はそれ以上が導入される：

T 1 6 5 4 : P 1 0 7 9、T 1 6 5 4 : N 1 1 3 4、Q 1 6 5 6 : D 1 0 7 6、F 1 6 7 7 : K 1 1 1 6、D 1 6 7 8 : R 7 8 2、I 1 6 7 9 : K 1 1 1 6、Y 1 6 8 0 : H 8 1 7、Y 1 6 8 0 : D 8 5 3、Y 1 6 8 0 : E 1 0 7 8、D 1 6 8 1 : R 7 6 8、E 1 6 8 2 : R 7 6 8、D 1 6 8 3 : R 7 6 8、E 1 6 8 4 : R 7 6 8、Q 1 6 8 6 : R 7 6 8、Q 1 6 8 6 : E 1 0 1 5、S 1 6 8 7 : R 7 6 8、S 1 6 8 7 : N 1 1 3 4、P 1 6 8 8 : R 7 6 8、P 1 6 8 8 : H 8 1 7、P 1 6 8 8 : E 9 3 3、P 1 6 8 8 : L 9 8 4、P 1 6 8 8 : E 1 0 1 5、P 1 6 8 8 : D 1 0 7 6及びP 1 6 8 8 : N 1 1 3 4。

【 0 0 2 5 】

好ましくは、VWF及び第VIIII因子中の一つ又はそれ以上の挿入されたシステイン残基の組み合わせの天然に存在するアミノ酸は、実施例6において示され実験的に評価されるVWFに対して共有結合で結合された第VIIII因子の0.5より高い相対比率、及び実施例9において示され実験的に評価される第VIIII因子の活性により選択される。最も好ましくは、VWF及び第VIIII因子中の一つ又はそれ以上の挿入されたシステイン残基の組み合わせの天然に存在するアミノ酸は、1.0より高い上記比率により選択される。

10

20

30

40

50

【0026】

好ましくは、本発明の複合体中の第V I I I因子は、遺伝子操作された第V I I I因子である。操作された第V I I I因子は、部分的又は完全なBドメイン欠失を有し得、これは1つ若しくはそれ以上のアミノ酸の置換、挿入、欠失若しくはそれらの組み合わせを含む変異した第V I I I因子であってもよく、又は半減期延長部分を有する融合ポリペプチド若しくは化学的に修飾された、例えばポリエチレングリコール(PEG化)、グリコシル化PEG、ヒドロキシルエチルデンプン(HES化)、ポリシアル酸、エラスチン様ポリペプチド、ヘパロサン(heparosan)ポリマー若しくはヒアルロン酸のような半減期延長部分の結合により修飾された第V I I I因子であってもよい。

【0027】

好ましい実施態様において、本発明の複合体中のVWFは、VWFの半減期を延長された形態であり、好ましくはVWFの遺伝子操作された形態である。より好ましくは、遺伝子操作されたVWFは、半減期延長部分とのVWFの融合タンパク質である。好ましくは、半減期延長部分は半減期延長ポリペプチド(HLEP)であり、より好ましくは、HLEPは、アルブミン又はそのフラグメント、免疫グロブリン定常領域及びその部分、例えばFcフラグメント、大きい流体力学的体積を有する溶媒和されたランダム鎖(例えばXTEN(Schellenberger et al. 2009)、ホモアミノ酸反復(HAP)又はプロリン-アラニン-セリン反復(PAS))、アフアミン、アルファ-フェトプロテイン、ビタミンD結合タンパク質、トランスフェリン又はその変異体、ヒト絨毛性ゴナドトロピン-サブユニットのカルボキシル末端ペプチド(CTP)、生理的条件下でアルブミン又は免疫グロブリン定常領域に結合することができるポリペプチド又は脂質から選択される。別の好ましい実施態様において、複合体のVWFはダイマーとして発現される。さらなる好ましい実施態様において、複合体のVWFはマルチマーを形成する。

【0028】

本発明の別の実施態様において、本発明の複合体の半減期は、化学修飾、例えば、ポリエチレングリコール(PEG化(PEGylation))、グリコシル化PEG、ヒドロキシルエチルデンプン(HES化(HESylation))、ポリシアル酸、エラスチン様ポリペプチド、ヘパロサン(heparosan)ポリマー、又はヒアルロン酸の結合により延長される。

【0029】

本発明の第二の実施態様は、VWF及び第V I I I因子を含む共有結合複合体であり、ここで該複合体は、インピボで延長された半減期を有するように修飾され、そしてここで第V I I I因子は、1つ又はそれ以上のVWFドメインを含むように修飾されている。好ましくは、複合体の延長された半減期は、複合体においてVWFの半減期延長形態を使用することにより得られる。

【0030】

好ましくは、第V I I I因子は、VWFのCの末端ドメインの1つ又はそれ以上と融合され(図4を参照のこと)、好ましくは、VWFの1つ又はそれ以上のC末端ドメインは第V I I I因子のCの末端に融合されている。このようなVWFのC末端ドメインは、VWFのC末端システインノット(CK)ドメインを含み、そしてさらに、C又はCKドメインに加えて、VWFの1つ又はそれ以上のさらなるドメイン、例えばA又はDドメインを含んでいてもよい。より好ましくは、F V I I Iは、好ましくはそのC末端に、配列番号2の残基2723-2813、2724-2813、2722-2813、2578-2813、2580-2813、2497-2813、2429-2813、2400-2813、2334-2813、2255-2813、1873-2813、1683-2813、1277-2813、1264-2813若しくは764-2813又はその変異体を含むが、ただしシステイン残基2773(又はその等価物)は保存されている。

【0031】

好ましくは、上に開示されるさらなるVWFドメインを場合により含む、VWFのC末

10

20

30

40

50

端CKドメインは、切断可能なリンカーによりFVIIIIに結合される。より好ましくは、切断可能なリンカーは、血液凝固に関連するプロテアーゼにより切断可能な切断部位を含み、なおより好ましくは、切断可能なリンカーは、トロンピン切断部位、好ましくはFVIIIIのトロンピン切断部位のうちの1つを含む。好ましくは、リンカー配列はまた、さらなるアミノ酸残基も含み、好ましくは、さらなるアミノ酸残基は、VWFのC末端ドメインとリンカーの切断可能部分との間に挿入される。好ましくは、さらなるアミノ酸残基は、それぞれFVIIIIのa3領域及びVWFのD'D3領域を介してFVIIIIとVWFとの相互作用を可能にするために十分な長さのペプチドを提供する。さらなるアミノ酸残基は、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120または150アミノ酸より多くてもよい。好ましくは、さらなるアミノ酸残基は可動性の「非構造的」ペプチドを形成し、そしてより好ましくは、グリシン-セリン反復、プロリン-アラニン-セリン反復、ホモアミノ酸反復、又はFVIIII Bドメインの配列を含むか、またはこれらからなる。

10

【0032】

別の実施態様において、第VIIII因子は、VWFのC末端ドメインの1つ又はそれ以上とN末端で融合される。このようなC末端ドメインは、VWFのC末端システインノット(CK)ドメインから誘導され得、そしてVWFの1つ又はそれ以上のさらなるドメインをさらに含み得る。より好ましくは、第VIIII因子は、好ましくはそのN末端に、配列番号2の残基2723-2813、2724-2813、2722-2813、2580-2813、2578-2813、2497-2813、2429-2813、2400-2813、2334-2813、2255-2813、1873-2813、1683-2813、1277-2813、1264-2813若しくは764-2813又はその変異体を含むが、ただしシステイン残基2773(又はその等価物)は保存される。これらの実施態様について、発現産物は、N末端からC末端に、シグナルペプチド、VWFのCKドメインを、場合によりVWFのさらなるドメインとともに、好ましくは切断可能な(場合により可動性の)リンカー、及び第VIIII因子を含む。

20

【0033】

本発明の別の実施態様はVWF及び第VIIII因子を含む共有結合複合体であり、ここでVWFはVWFの半減期延長形態であり、そしてここで第VIIII因子は、VWFのD'D3若しくはD1D2D'D3領域、又は野生型フォン・ビルブランド因子のFVIIII結合活性の少なくとも10%を維持するそのフラグメントを含むように修飾されている。好ましくは、第VIIII因子は、その部分的又は完全なBドメインがVWF D'D3領域又はそのフラグメントで置き換えられるように修飾される(図5を参照のこと)。より好ましくは、第VIIII因子は、好ましくはその(又はその一部)のBドメインの代わりに、それぞれ配列番号2の残基764~1241、764~1242、764~1247、764~1270若しくは764と1241~1270との間のいずれかの配列、又はその変異体若しくはフラグメントを含む。

30

【0034】

好ましい実施態様において、VWFのD'D3ドメインは、細胞培養培地中への分子の分泌の際に2鎖分子が生成され、そしてD'D3ドメインが第VIIII因子軽鎖のN末端に位置するように、第VIIII因子に結合される。これは、例えば、第VIIII因子a2ドメイン又はBドメインの残りとVWF D'D3ドメインとの間にPACE/フリンのための切断部位を含む切断可能なリンカーを導入することにより達成され得る(図5d及びe)。好ましくは、リンカーは、VWFのD'D3ドメインと第VIIII因子a3ドメインとの間にさらなる残基を含み、さらなる残基は、それぞれa3及びD'D3ドメインを介して第VIIII因子とVWFとの分子内相互作用を可能にするために十分な長さのペプチドを含む(図5e)。好ましくは、さらなる残基は、200未満のアミノ酸、より好ましくは100未満のアミノ酸、なおより好ましくは90、80、70、60、50未満のアミノ酸、40未満のアミノ酸、30未満のアミノ酸、20未満のアミノ酸、最も好ましくは10未満のアミノ酸を含む。好ましくは、さらなる残基は、可動性の「非構造的」

40

50

ペプチドを含み、より好ましくは、これらはグリシン - セリン反復、プロリン - アラニン - セリン反復又はホモアミノ酸反復を含むか、又はこれらからなる。記載されるような成熟形態を得るために発現させようとするタンパク質は、さらなる配列、例えばN末端におけるシグナル配列を含むように構築され得る。

【0035】

あるいは、第V I I I因子のN末端は、V W F D' D3ドメイン又はそのフラグメントのC末端に接続され、これは好ましくはV W Fのさらなるドメイン（例えば、D1及びD2ドメイン）によりN末端で延長される；これは、半減期延長V W Fとの共有結合の発現及び細胞内形成を補助する。より好ましくは、第V I I I因子は、配列番号2の残基1 ~ 1241若しくは残基764 ~ 1241（プロペプチドの切断後）又はその変異体若しくはフラグメントをN末端に含む。

10

【0036】

好ましくは、V W FのそれぞれD' D3又はD1 D2 D' D3ドメインは、切断可能なリンカーにより第V I I I因子のN末端に結合される。より好ましくは、切断可能なリンカーは、血液凝固に関連するプロテアーゼにより切断可能な切断部位を含み、なおより好ましくは、切断可能なリンカーは、トロンピン切断部位、好ましくはF V I I Iのトロンピン切断部位のうちの1つを含む。好ましくは、リンカーは、V W FのD' D3又はD1 D2 D' D3ドメインと第V I I I因子分子との間にさらなる残基を含み、さらなる残基は、それぞれa3及びD' D3領域を介して第V I I I因子とV W Fとの相互作用を可能にするために十分な長さのペプチドを含む（図5e）。好ましくは、20、30、50、100、又は150より多いさらなるアミノ酸が加えられる。好ましくは、さらなるアミノ酸は、可動性の非構造的ペプチドを含み、より好ましくは、それらはグリシン - セリン反復、プロリン - アラニン - セリン反復、ホモアミノ酸反復、又はF V I I I Bドメインの配列を含むか又はこれらからなる。

20

【0037】

さらに、上記のようなリンカーを介してF V I I IのN末端に融合されたV W FのD' D3又はD1 D2 D' D3ドメインは、さらなるV W F関連官能基が構築物中に加入されるならば、V W Fに由来するさらなるV W FドメインによりD3と記載されるリンカーとの間で延長され得る。

【0038】

本発明の第二の局面は、上記の第V I I I因子及びV W Fの共有結合複合体を製造する方法であり、該方法は、第V I I I因子及びV W F分子を真核生物細胞株において同時発現させること（*co-expressing*）を含む。好ましくは、真核生物細胞株は、効率的なプロセッシングを確実にするためにP A C E / フリンを発現するように修飾される。あるいは、タンパク質（第V I I I因子及びV W F）は、別々に製造され、次いで例えばジスルフィド架橋形成を可能にするための穏やかな酸化環境で、インビトロで混合され得るが、第V I I I因子及びV W Fの機能性はインタクトなままにする。

30

【0039】

本発明のこの局面の別の実施態様において、（修飾された）第V I I I因子及び（修飾された）V W Fは、化学的架橋により共有結合で接続される（図7を参照のこと）。

40

【0040】

本発明の第三の局面は、薬剤における使用のため、好ましくは出血障害の処置又は予防における使用のための、上記共有結合複合体である。好ましくは、出血障害は血友病A又はV W Dである。

【0041】

本発明の第四の局面は、上記共有結合複合体を含む医薬組成物である。

【0042】

本発明のさらなる局面は、有効量の上記複合体を、それを必要とする被験体に投与することにより出血障害を処置又は予防する方法である。

【0043】

50

発明の詳細な説明

上述のように、血友病、特に血友病Aを有する患者の慢性処置のために、長い半減期を有するF V I I Iを有することは非常に有益だろう。本発明者らは、今や驚くべきことに、F V I I Iにより長い半減期をもたらすフォン・ビルブラント因子(VWF)及びF V I I Iの共有結合複合体が製造され得るということを見出した。特に複合体がその半減期をインビボで延長するように修飾される場合、例えばVWF又はF V I I Iの半減期延長形態が使用される場合、F V I I Iの半減期は有意に増強され、これを、血友病Aのような出血障害を有する患者の改善された予防及び処置のための魅力的なアプローチにする。好ましくは、インビボ回収もまたこのアプローチにより増加され得る。

【0044】

従って、第一の局面において、本発明は、フォン・ビルブラント因子又はその変異体(VWF)及び第V I I I因子又はその変異体(第V I I I因子)を含む共有結合複合体に関し、ここで複合体は、インビボで延長された半減期を有するように修飾されている。例えば、VWFは、VWFの半減期延長形態であり得；あるいは(又はさらに)、第V I I I因子はV I I Iの半減期延長形態であり得、又は半減期延長部分が、リンカーを介して共有結合複合体に結合され得る。好ましくは、複合体中のVWFは半減期延長部分を含む。好ましくは、共有結合複合体は、一方のFcモノマーがVWFに連結され、かつ他方のFcモノマーが第V I I I因子に連結されたヘテロダイマーFc融合物ではない。より好ましくは、共有結合連結は半減期延長部分によりもたらされるものではない。

【0045】

本明細書で使用される用語「フォン・ビルブラント(von Willebrand)因子」又は「VWF」は、フォン・ビルブラント因子の少なくとも一部の活性が保持されている限り、1つ若しくはそれ以上のアミノ酸の置換、挿入、少数若しくは多数の欠失(例えば、1つ又はそれ以上のドメインの欠失)を含むVWF、又は別のペプチド若しくはタンパク質部分、例えば半減期を増加するポリペプチド、もしくは非タンパク質部分とのその融合タンパク質のような変異体を含む、野生型VWFの生物学的活性を有するいずれかのポリペプチドを指す。VWF活性はコラーゲン結合活性、及び/又は血小板結合活性、及び/又はF V I I I結合活性であり得る。F V I I I結合活性は、VWF上の結合部位を介して共有結合で結合されたF V I I Iを用いずにVWFについて決定されるだろう。VWF活性を測定するためにアッセイは十分に確立されており、例えばコラーゲン結合アッセイ、リストセチン(Ristocetin)補因子活性アッセイ、又はF V I I I結合アッセイである。生物学的活性は、欠失及び/又は他の修飾を含むVWFが野生型VWFについて測定されたいずれかの活性の少なくとも10%、好ましくは15%、20%、25%、又は30%、より好ましくは少なくとも40%又は50%、なおより好ましくは少なくとも60%、70%又は75%を保持する場合に、本発明の意味では保持されている。用語「第V I I I因子結合ドメイン」は、野生型フォン・ビルブラント因子の第V I I I因子結合活性の少なくとも10%、好ましくは15%、20%、25%、又は30%、より好ましくは少なくとも40%又は50%、なおより好ましくは少なくとも60%、70%又は75%を保持するVWFのフラグメント又は部分を指す。第V I I I因子結合ドメインは、成熟VWFのN末端、例えばD' D3ドメイン又はそのフラグメントに位置する。

【0046】

野生型フォン・ビルブラント因子をコードする遺伝子は9 kb mRNAに転写され、これが310,000 Daの推定分子量を有する2813アミノ酸のプレプロポリペプチドに翻訳される。プレプロポリペプチドは、22アミノ酸長のシグナルペプチド、741アミノ酸のプロポリペプチド及び成熟サブユニットを含む。N末端からの741アミノ酸長のプロポリペプチドの切断は、2050アミノ酸からなる成熟VWFを生じる。VWFプレプロポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号2に示し、そしていくつかの変異体が公開されている(例えば、NCBI参照配列NP_000543.2)。VWF分子が配列番号2の全ての残基を含む必要はないが、別の指示がなければ、本出願におけるVWF残

10

20

30

40

50

基のアミノ酸番号付けは配列番号2を参照する。成熟野生型VWFのアミノ酸配列は、配列番号2の残基764～2813に対応する。本明細書で使用される用語「VWF」は、上述のいずれか1つのVWF機能のうちの少なくとも部分的なVWF活性を示すVWFのいずれかの形態又はその変異体を指す。

【0047】

野生型VWFのプロポリペプチドは、以下の順序で配置された多数のドメインを含む (Schneppenheimer and Budde (2011) J Thrombosis Haemostasis 9 (Suppl. 1) 209-215に従うプロ-VWFドメインD1～D4のドメイン構造、Zhou et al (2012) Blood 120, 449-458に従うCドメインのドメイン構造及び命名法) :

D1 - D2 - D' - D3 - A1 - A2 - A3 - D4 - C1 - C2 - C3 - C4 - C5 - C6 - CK

D1及びD2ドメインは、切除されて成熟VWFを生じるプロペプチドに相当する。D'ドメインは配列番号2のアミノ酸764～865を包含し；D'D3ドメインは、配列番号の2それぞれアミノ酸764～1241、764～1242、764～1247、若しくは764～1270、又は764と1241～1270との間のいずれかの配列を包含する。カルボキシ末端の90残基は、タンパク質の「シスチンノット」スーパーファミリーに相同な「CK」ドメインを含む。これらのファミリーメンバーは、ジスルフィド結合を通して二量体化する傾向を有する。Zhouらにより定義されるC末端ドメインC1～C6は、配列番号2における残基2255～2333(C1)、2334～約2402(C2)、2429～2496(C3)、2497～2577(C4)、2578～2646(C5)、及び2647～2722(C6)に対応する。

【0048】

野生型フォン・ビルブラント因子は、配列番号2に示される成熟フォン・ビルブラント因子のアミノ酸配列、残基764～2813を含む。VWFの生物学的活性が保持される限り、VWFの付加、挿入、N末端、CK末端又は内部欠失も包含される。欠失及び/又は他の修飾を含むVWFが、野生型VWFについて測定されたいずれかの活性の少なくとも10%、好ましくは15%、20%、25%、又は30%、より好ましくは少なくとも40%又は50%、なおより好ましくは少なくとも60%、70%又は75%を保持する場合、本発明の意味で生物学的活性は保持される。野生型VWFの生物学的活性は、例えば、リストセチン補因子活性を測定するための方法 (Federici AB et al. 2004. Haematologica 89: 77-85)、血小板糖タンパク質複合体Ib-V-IXのGP IbへのVWFの結合 (Sucker et al. 2006. Clin Appl Thromb Hemost. 12: 305-310)、又はコラーゲン結合アッセイ (Kallias & Talpsep. 2001. Annals of Hematology 80: 466-471)、又は例えば表面プラズモン共鳴によるコラーゲン結合の測定を使用して、当業者により決定され得る。使用されるVWFの生物学的活性を決定する他の方法は、FVIIII結合能の決定を含む (Veyradier et al., Haemophilia 2011)。

【0049】

用語「血液凝固第VIIII因子」、「第VIIII因子」及び「FVIIII」は本明細書において交換可能に使用される。「血液凝固第VIIII因子」又は「第VIIII因子」は、野生型血液凝固FVIIIIに加えて、野生型血液凝固FVIIIIのプロコアグラント活性が少なくとも部分的に保持されている野生型血液凝固FVIIIIの誘導体又は変異体も含む。誘導体は、野生型FVIIIIのアミノ酸配列と比較して、Bドメイン若しくはBドメインの一部の欠失のような欠失、挿入及び/又は付加を有し得る。用語第VIIII因子は、重鎖及び軽鎖を含むFVIIIIのタンパク質分解でプロセシングした形態、例えば、活性化前の2鎖形態、さらには未切断の単鎖第VIIII因子を含む。

【0050】

用語「第VIIII因子」は、野生型FVIIIIの生物学的活性の少なくとも10%、好

10

20

30

40

50

ましくは少なくとも15%、20%又は25%、より好ましくは少なくとも30%、40%又は50%、最も好ましくは少なくとも60%、70%又は75%を保持するいずれかのFVIIIIの変異体(variants)又は変異体(mutants)を含む。

【0051】

FVIIIIを、約280kDaの分子量を有する単一ポリペプチド鎖として合成する。アミノ末端シグナルペプチドは、小胞体中へのFVIIIIの転位の際に除去され、次いで、成熟(すなわち、シグナルペプチドの切断後)ネイティブFVIIII分子が、Bドメインとa3ドメインとの間又はBドメイン内でその分泌の過程でタンパク質分解的に切断される。これは、約90~200kDaのN末端重鎖フラグメントと金属イオン依存性結合した約80kDaのC末端軽鎖からなるヘテロダイマーの放出を生じる(Kaufman、Transfusion Med. Revs. 6:235(1992)による概説も参照のこと)。

10

【0052】

ヘテロダイマーの生理的活性化は、トロンピンによるタンパク質鎖のタンパク質分解切断により起こる。トロンピンは、重鎖を切断して90kDaタンパク質にし、次いで54kDa及び44kDaのフラグメントにする。トロンピンはまた、80kDa軽鎖を切断して72kDaのタンパク質にする。活性FVIIIIを構成するのは、カルシウムイオンにより結び付けられた、後者のタンパク質及び重鎖フラグメント(上の54kDa及び44kDa)である。44kDa A2重鎖フラグメントが分子から解離する場合、又は72kDa及び54kDaのタンパク質がトロンピン、活性化タンパク質C若しくはFXaによりさらに切断される場合に、不活化が起こる。血漿において、FVIIIIは、約50倍モル過剰のフォン・ビルブラント因子タンパク質(「VWF」)との結合により安定化され、これが上記のようなFVIIIIのタンパク質分解を阻害するようである。

20

【0053】

FVIIIIのアミノ酸配列は、3つの構造的ドメインに体系付けられる:それぞれ330アミノ酸の三重のAドメイン、980アミノ酸の単一のBドメイン、及びそれぞれ150アミノ酸の二重のCドメイン。Bドメインは、他のタンパク質に対して相同性を有しておらず、そしてこのタンパク質の25の潜在的なアスパラギン(N)連結グリコシル化部位のうち18を提供する。Bドメインは凝固において機能を有していないようであり、Bドメインを除去されたFVIIII分子がなお凝固促進(procoagulatory)活性を有したまま除去され得る。

30

【0054】

非限定的な例として、本明細書において使用される第VIIII因子は、減少若しくは妨げられたAPC切断をもたらすFVIIII変異体(Amano 1998. Thromb. Haemost. 79:557-563)、さらに安定化されたA2ドメインを有するFVIIII変異体(WO 97/40145)、増加した発現を生じるFVIIII変異体(Swaroop et al. 1997. JBC 272:24121-24124)、減少した免疫原性を有するFVIIII変異体(Lollar 1999. Thromb. Haemost. 82:505-508)、独立して発現された重鎖及び軽鎖から再構成されたFVIIII(Oh et al. 1999. Exp. Mol. Med. 31:95-100)、HSPGのようなFVIIIIの異化を生じる受容体への減少した結合を有するFVIIII変異体(heparan sulfate proteoglycans)及び/又はLRP(低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質)(Ananyeva et al. 2001. TCM, 11:251-257)、ジスルフィド結合を安定化されたFVIIII変異体(Gale et al., 2006. J. Thromb. Hemost. 4:1315-1322)、改善された分泌特性を有するFVIIII変異体(Miao et al., 2004. Blood 103:3412-3419)、増加した補因子特異的活性を有するFVIIII変異体(Wakabayashi et al., 2005. Biochemistry 44:10298-304)、改善された生合成及び分泌、減少したERシャペロン相互作用、改善されたER-ゴルジ輸送、不活化

40

50

に対する増加した活性化又は抵抗性及び改善された半減期を有するF V I I I変異体 (Pipe 2004 . Sem . Thromb . Hemost . 30 : 227 - 237により要約される)、並びにフリンにより切断不可能な1本鎖F V I I I変異体を含む。これらのF V I I I変異体 (mutants)及び変異体 (variants)は全てそれら全体で参照により本明細書に加入される。

【0055】

好ましくは、第V I I I因子は、配列番号6に示されるF V I I Iの全長配列を含み、より好ましくは、第V I I I因子は、Bドメインの部分的又は完全な欠失を有するF V I I Iの変異体である。F V I I Iの生物学的活性が少なくとも部分的に保持されている限り、F V I I Iの付加、挿入、置換、N末端、C末端又は内部の欠失も包含される。生物学的活性は、修飾を含むF V I I Iが野生型F V I I Iの生物学的活性の少なくとも10%、好ましくは少なくとも15%、20%又は25%、より好ましくは少なくとも30%、40%又は50%、最も好ましくは少なくとも60%、70%又は75%も保持する場合に、本発明の意味で保持されている。第V I I I因子の生物学的活性は以下に記載される熟練工 (artisan)により決定され得る。

10

【0056】

第V I I I因子の生物学的活性を決定するための適切な試験は、例えば、段階凝固アッセイ (Rizza et al . 1982 . Coagulation assay of F V I I I : C and F I X a in Bloomed . The Hemophiliac . NY Churchhill Livingston 1992) 又は発色性 (2段階) 基質F V I I I活性アッセイ (S . Rosen , 1984 . Scand J Haematol 33 : 139 - 145 , suppl .) である。これらの参考文献の内容は、参照により本明細書に加入される。

20

【0057】

ヒト血液凝固F V I I Iの成熟野生型形態のアミノ酸配列を配列番号6に示す。特定の配列のアミノ酸位置の言及は、F V I I I野生型タンパク質におけるそのアミノ酸の位置を意味し、かつ言及される配列における他の位置での変異、例えば欠失、挿入及び/又は置換の存在を排除するものではない。例えば、配列番号6を参照して残基2004の変異は、修飾されたホモログにおいて配列番号6の位置1~2332における1つ又はそれ以上のアミノ酸が欠けているということを除く。

30

【0058】

上記定義内の「第V I I I因子」及び/又は「V W F」はまた、個体ごとに存在及び発生し得る天然の対立遺伝子変異及び他の哺乳動物種由来のF V I I I、例えばブタF V I I Iも含む。上記定義内の「第V I I I因子」及び/又は「V W F」はさらに、F V I I I及び又はV W Fの変異体を含む。このような変異体は、野生型配列と1つ又はそれ以上のアミノ酸残基において異なる。このような差異の例としては、保存的アミノ酸置換、すなわち、類似した特徴を有するアミノ酸、例えば(1)小さいアミノ酸、(2)酸性アミノ酸、(3)極性アミノ酸、(4)塩基性アミノ酸、(5)疎水性アミノ酸、及び(6)芳香族アミノ酸のグループ内での置換が挙げられ得る。このような保存的置換の例を以下の表1に示す。

40

【0059】

【表 1】

表 1 :

(1)	アラニン	グリシン		
(2)	アスパラギン酸	グルタミン酸		
(3)	アスパラギン	グルタミン	セリン	スレオニン
(4)	アルギニン	ヒスチジン	リジン	
(5)	イソロイシン	ロイシン	メチオニン	バリン
(6)	フェニルアラニン	チロシン	トリプトファン	

10

【 0 0 6 0 】

F V I I I 又は V W F における用語「保存された残基」は、進化的に保存された残基に関連し、すなわち、ここでそれぞれの位置において、同一の残基又は保存的置換が少なくとも 2 つ、好ましくは少なくとも 3 つの哺乳動物配列において見出される。

20

【 0 0 6 1 】

F V I I I、V W F 又はそのドメインの用語「変異体 (variant)」は、それぞれ配列番号 6 又は 2 において示される配列又は配列の関連する部分に対して、少なくとも 50% の配列同一性、好ましくは少なくとも 55%、60%、65%、70%、75% 又は 80% の配列同一性、より好ましくは少なくとも 82%、84%、85%、86%、又は 88% の配列同一性、なおより好ましくは少なくとも 90%、92%、94%、95% の配列同一性を有するタンパク質又はドメインを指すが、ただし変異体は、それぞれタンパク質又はそのドメインの生物学的活性の、少なくとも 10%、好ましくは 15%、20%、25%、又は 30%、より好ましくは少なくとも 40% 又は 50%、なおより好ましくは少なくとも 60%、70% 又は 75% を保持する。特定の位置は、その他の位置よりも変異に適しているかもしれないということが認識される。例えば、V W F の C K ドメインの変異体は、位置 2773 (又はその等価物) においてシステインを保持している必要があり、これはダイマーの形成に必須であるようである。C K ドメイン中の他のシステイン残基 (Zhou et al (2012) Blood 120, 449 - 458)、及び V W F の他のドメインそしてまた F V I I I もまた必須であり得る。

30

【 0 0 6 2 】

配列同一性%を決定するために、適切な配列整列プログラム、例えば G C G スイートの G A P プログラムを使用して、デフォルトパラメーターを使用して配列を整列させる (D evereux et al (1984) Nucl Acids Res 12, 387)。配列を整列させるために使用され得る他のプログラムとしては、F A S T A (L ipman & Pearson (1985) Science 227, 1436 - 1441)、B L A S T (A ltschul et al (1990) J Mol Biol 215, 403 - 410)、及び C l u s t a l W (T h o m p s o n et al (1994) Nucl Acids Res 22, 4673 - 4680) が挙げられる。

40

【 0 0 6 3 】

本発明の一実施態様において、共有結合連結は、遺伝子操作により F V I I I に導入される F V I I I 中のシステイン残基と、野生型 V W F 配列中に見出されるシステイン、又

50

は遺伝子操作によりVWF配列中の適切な位置にも導入され得るシステイン残基との間のジスルフィド架橋により達成される。

【0064】

本発明の1つの好ましい実施態様は、半減期を延長されたVWFと第VII因子とを含む共有結合複合体に関し、ここで第VII因子は、少なくとも1つの天然に存在するアミノ酸のシステイン残基での置換、又はVWF中のシステイン残基とジスルフィド架橋を形成するFVII中の適切な位置における少なくとも1つのシステイン残基の挿入により修飾される(図3)。

【0065】

従って、本発明によれば、複合体の第VII因子成分のアミノ酸配列は、配列番号6に示される野生型FVIIのアミノ酸配列と異なる。修飾された第VII因子は、少なくとも1つの変異、例えば天然に存在するアミノ酸のシステインでの置換、又は例えばC3ドメイン若しくはC末端ドメイン中の適切な位置でのシステイン残基の挿入を有する。従って、本発明の複合体の第VII因子において1つ又はそれ以上、例えば2、3、4、5、又はそれ以上のさらなるシステイン残基が存在し得；より好ましくは、1つ又は2つだけのさらなるシステイン残基が導入され、最も好ましくは、1つのさらなるシステイン残基が導入される。

【0066】

より好ましくは、第VII因子において置換される天然に存在するアミノ酸は、a3ドメイン中のアミノ酸である。より好ましくは、第VII因子中の置換される天然に存在するアミノ酸は、FVII a3ドメインのアミノ酸1653~1660内又はアミノ酸1667~1674内又はアミノ酸1675~1688内に位置する。より好ましくは、a3ドメイン中の天然に存在するアミノ酸は、酸性残基、好ましくは保存された酸性アミノ酸残基、又は出血性表現型に関与する残基、又はFVII a3ドメイン中の硫酸化され得るTyr残基である。なおより好ましくは、システインで置換されるa3ドメイン中の天然に存在するアミノ酸は、配列番号6中のE1649、D1658、E1660、D1663、Y1664、D1665、D1666、E1671、E1675、D1676、D1678、I1679、Y1680、E1682、D1683、E1684から、なおより好ましくはT1653、L1655、D1658、E1660、S1669、V1670、N1672、K1673、K1674、E1675、D1676及び/若しくはN1685又は例えば第VII因子の遺伝子操作された形態における等価な位置から選択される。最も好ましくは、システインで置換されるa3ドメイン中の天然に存在するアミノ酸は、配列番号6中のT1654、Q1656、F1677、D1678、I1679、Y1680、D1681、E1682、D1683、E1684、Q1686、S1687及び/若しくはP1688又は例えばFVIIの遺伝子操作された形態中の等価な位置から選択される。

【0067】

好ましくは、VWF中の天然に存在するアミノ酸は、実施例6に示される実験的に評価された共有結合で結合された第VII因子対VWFの0.5より高い相対比及び実施例9に示された実験的に評価された第VII因子の活性により選択される。最も好ましくは、VWF中の天然に存在するアミノ酸は、1.0より高い上記相対比で選択される。

【0068】

本発明の第一の局面の別の好ましい実施態様において、システインで置換される天然に存在するアミノ酸は、FVIIのC末端ドメインにあり、好ましくはアミノ酸2051と2270との間のFVII領域中のアミノ酸であり、より好ましくは残基は配列番号6中のI2098、S2119、N2129、R2150、P2153、W2229、Q2246又は例えばFVIIの操作された形態中の等価な位置から選択される。

【0069】

本発明の第一の局面のさらなる好ましい実施態様において、VWFは、システイン残基での天然に存在するアミノ酸の置換、又はシステイン残基の挿入によっても修飾され、こ

10

20

30

40

50

れが第VII因子中に導入されたシステイン残基とジスルフィド架橋を形成する。VWF中の天然に存在するアミノ酸は、D'若しくはD3領域内の残基、好ましくはD'若しくはD3領域中の塩基性残基、又はD'若しくはD3領域中の高度に保存された残基、又はN-VWD型に關与する残基又はVWF分子の表面上に露出されたアミノ酸である。本発明の好ましい実施態様において、システイン残基は、TIL'ドメイン、E'ドメイン、VWD3ドメイン、C8-3ドメイン、TIL-3ドメイン若しくはE-3ドメイン中に挿入され、又はシステイン残基で置換されるVWF中の天然に存在するアミノ酸は、TIL'ドメイン、E'ドメイン、VWD3ドメイン、C8-3ドメイン、TIL-3ドメイン若しくはE-3ドメイン(Zhou et al (2012) Blood 120(2) 449-458により定義されるドメイン)中の残基である。例えば、VWF中の天然に存在するアミノ酸は、R768、R782、R816、R820、R826、R852、R854、R906、R924、R945、R960、R976、R1035、H817、H831、H861、H874、H916、H952、H977、H1047、K773、K790、K834、K843、K855、K882、K912、K920、K922、K923、K940、K948、K968、K985、K991、K1026、K1036、K1052、K1073、G785、M800、D879、Q1053、E1078、E787、A789、T789、T791、Q793、N794、Y795、P828、F830、E835、P838、D853、W856、L884から選択される。好ましくは、VWF中の天然に存在するアミノ酸は、配列番号2中のT795、R816、D879、D951、E1161、及び/若しくはR1204又は例えばVWFの操作された形態中の等価な位置から選択される。より好ましくは、VWF中の天然に存在するアミノ酸は、配列番号2中のR768、R782、H817、D853、E933、L984、E1015、D1076、E1078、P1079、K1116及び/若しくはN1134又は例えばVWFの操作された形態中の等価な位置から選択される。

【0070】

好ましくは、VWF中の天然に存在するアミノ酸は、実施例6に示される実験的に評価された共有結合で結合されたFVII対VWFの0.5より高い相対比、及び実施例9に示される実験的に評価された第VII因子の活性により選択される。最も好ましくは、VWF中の天然に存在するアミノ酸は、1.0より高い上記比率により選択される。

【0071】

好ましくは、FVII及びVWF中の天然に存在するアミノ酸残基の置換の以下の組み合わせの1つ又はそれ以上が導入される：

A/T789C : D1658C、M800C : D1658C、P828C : D1658C、F830C : D1658C、P838C : D1658C、D853C : D1658C、R924C : D1658C、E1078C : D1658C、F830C : D1663C、P838C : D1663C、D853C : D1663C、E1078C : D1663C、E1078C : Y1664C、P838C : D1665C、R816C : D1666C、F830C : D1666C、E835C : D1666C、T791C : E1671C、F830C : E1671C、E835C : E1671C、D879C : E1671C、A/T789C : E1675C、T791C : E1675C、N794C : E1675C、P828C : E1675C、F830C : E1675C、E835C : E1675C、P838C : E1675C、D879CE1675C、R924C : E1675C、E1078C : E1675C、A/T789C : D1676C、T791C : D1676C、N794C : D1676C、F830C : D1676C、E835C : D1676C、A/T789C : D1678C、F830C : D1678C、E835C : D1678C、A/T789C : I1679C、M800C : I1679C、F830C : I1679C、E835C : I1679C、R854C : I1679C、D879C : I1679C、A/T789C : Y1680C、T791C : Y1680C、Y795C : Y1680C、M800C : Y1680C、R816C : Y1680C、F830C : Y1680C、E835C : Y1680C、R854C : Y1680C、D879C : Y1680C、A/T

10

20

30

40

50

789C : E1682C、Y795C : E1682C、R816C : E1682C、P828C : E1682C、E835C : E1682C、P838C : E1682C、R854C : E1682C、D879C : E1682C、Q1053C : E1682C。

【0072】

FVII I及びVWF中の天然に存在するアミノ酸残基の置換の以下の組み合わせのうちの一つ又はそれ以上が導入される：

F1677C : R768C、I1679C : R768C、Y1680C : R768C、N1685C : R768C、T1654C : R782C、E1675C : R782C、N1685C : R782C、Q1686C : Y795C、S1687C : Y795C、P1688C : Y795C、E1675C : H816C、D1676C : R816C、Y1680C : R816C、E1682C : R816C、P1688C : R816C、Y1680C : H817C、N1685C : H817C、Q1686C : H817C、S1687C : H817C、I1679C : P828C、Y1680C : D853C、N1685C : D853C、T1654C : D879C、P1688C : E933C、P1688 : T951C、T1653C : L984C、T1654C : L984C、L1655C : L984C、S1669C : L984C、K1673C : L984C、D1683C : L984C、T1653C : E1015C、L1655C : E1015C、S1669C : E1015C、V1670C : E1015C、N1672C : E1015C、K1673C : E1015C、D1678C : E1015C、I1679C : E1015C、E1684C : E1015C、S1687C : E1015C、F1677C : V1027C、I1679C : V1027C、P1688C : V1027C、S1657C : D1076C、K1673C : D1076C、D1676C : D1076C、F1677C : D1076C、I1679C : D1076C、E1682C : D1076C、D1683C : D1076C、Q1686C : D1076C、D1676C : E1078C、I1679C : E1078C、Y1680C : E1078C、T1653C : P1079C、L1655C : P1079C、S1657C : P1079C、D1658C : P1079C、E1682C : P1079C、V1670C : K1116C、K1673C : K1116C、D1676C : K1116C、D1678C : K1116C、D1681C : K1116C、Q1686C : K1116C、P1688C : K1116C、T1653C : N1134C、L1655C : N1134C、E1660C : N1134C、D1678C : N1134C、D1683C : N1134C、E1684C : N1134C、Q1686C : N1134C、T1653C : E1161C、L1655C : E1161C、K1674C : E1161C、D1676C : E1161C、E1684C : E1161C、S1687C : E1161C、P1688C : R1204C。

【0073】

最も好ましくは、FVII I及びVWF中の天然に存在するアミノ酸残基の置換の以下の組み合わせの一つ又はそれ以上が導入される：

T1654 : P1079、T1654 : N1134、Q1656 : D1076、F1677 : K1116、D1678 : R782、I1679 : K1116、Y1680 : H817、Y1680 : D853、Y1680 : E1078、D1681 : R768、E1682 : R768、D1683 : R768、E1684 : R768、Q1686 : R768、Q1686 : E1015、S1687 : R768、S1687 : N1134、P1688 : R768、P1688 : H817、P1688 : E933、P1688 : L984、P1688 : E1015、P1688 : D1076及びP1688 : N1134。

【0074】

好ましくは、VWF及び第VII I因子中の一つ又はそれ以上の挿入されたシステイン残基の組み合わせの天然に存在するアミノ酸は、実施例6に示される実験的に評価された共有結合で結合された第VII I因子対VWFの0.5より高い相対比及び実施例9に示される実験的に評価された第VII I因子の活性により選択される。最も好ましくは、VWF及び第VII I因子中の一つ又はそれ以上の挿入されたシステイン残基の組み合わせ

の天然に存在するアミノ酸は1.0より高い上記比により選択される。

【0075】

好ましくは、本発明の複合体中の第VII因子は、遺伝子操作された第VII因子である。操作された第VII因子は、部分的又は完全なBドメイン欠失を含み得、これは1つ又はそれ以上のアミノ酸の置換、挿入、欠失又はそれらの組み合わせを含む変異した第VII因子であっても、第VII因子の1本鎖バージョンであっても、半減期延長部分、例えば半減期延長ポリペプチド(HLEP)との融合ポリペプチドであってもよい。また、例えば、ポリエチレングリコール(PEG化)、グリコシル化PEG、ヒドロキシルエチルデンプン(HES化)、ポリシアル酸、エラスチン様ポリペプチド、ヘパロサン(heparosan)ポリマー又はヒアルロン酸のような半減期延長部分の結合により、化学的に修飾された第VII因子であってもよい。これはまた、別の種、例えば別の哺乳動物種由来の第VII因子、例えばブタ第VII因子であってもよい。

10

【0076】

好ましくは、本発明の複合体中のVWFは、VWFの半減期延長形態である。

【0077】

本明細書で使用される用語「半減期」は、それぞれのタンパク質の機能的半減期、すなわちインビボで、すなわち血中で活性の半分が失われるのにかかる時間を示す。

【0078】

好ましい実施態様において、本発明の複合体中のVWFの半減期延長形態は、VWFの遺伝子操作された形態である。より好ましくは、遺伝子操作されたVWFは、半減期延長ポリペプチド(HLEP)のような半減期延長部分とのVWFの融合タンパク質である。

20

【0079】

本明細書で使用される「半減期増強ポリペプチド」又は「半減期延長ポリペプチド」(HLEP)は、その半減期を延長するために、目的のタンパク質、特にVWFに融合される部分である。好ましいHLEPは、アルブミン、アルブミンファミリーのメンバー、免疫グロブリンGの定常領域及びそのフラグメント、生理的条件下でアルブミン、アルブミンファミリーのメンバー、さらには免疫グロブリン定常領域の一部に結合することができるポリペプチド若しくは脂質からなる群より選択される。凝固因子の治療活性又は生物学的活性を安定化又は延長することができるのは、本明細書に記載される全長半減期延長タンパク質(例えば、アルブミン、アルブミンファミリーのメンバー、若しくは免疫グロブリンGの定常領域)又はその1つ若しくはそれ以上のドメイン若しくはフラグメントであり得る。このようなフラグメントは、HLEPフラグメントが野生型VWF又は第VII因子と比較して少なくとも25%の機能的半減期延長を生じる限り、10若しくはそれ以上のアミノ酸長から構成され得、又はHLEP配列からの少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約25、少なくとも約30、少なくとも約50、少なくとも約100若しくはそれ以上の連続したアミノ酸を含み得、又はそれぞれのHLEPの特定のドメインの一部若しくは全てを含み得る。

30

【0080】

HLEPはHLEPの変異体であり得る。用語「変異体(variants)」は、挿入、欠失及び保存的又は非保存的のいずれかの置換を含み、ここでこのような変化は、HLEPの半減期延長特性が少なくとも部分的に維持されることを可能にする。

40

【0081】

特に、本発明の提案されるVWF HLEP融合構築物は、HLEP及びHLEPのフラグメントの天然に存在する多型変異体を含み得る。HLEPは、いずれかの脊椎動物、特にいずれかの哺乳動物、例えばヒト、サル、ウシ、ヒツジ、又はブタ由来であり得る。非哺乳動物HLEPとしては、限定されないが、ニワトリ及びサケが挙げられる。

【0082】

好ましくは、半減期延長部分は、アルブミン又はその変異体若しくはフラグメント、免疫グロブリン定常領域又はその変異体及び部分、例えばFcフラグメント、大きい流体力学的体積を有する溶媒和されたランダム鎖(例えばXTEN、ホモアミノ酸反復(HAP

50

)又はプロリン - アラニン - セリン反復 (P A S))、アファミン又はその変異体、アルファ - フェトプロテイン又はその変異体、ビタミンD結合タンパク質又はその変異体、トランスフェリン又はその変異体、ヒト絨毛性ゴナドトロピン - サブユニットのカルボキシル末端ペプチド (C T P)、生理的条件下でアルブミン又は免疫グロブリン定常領域に結合することができるポリペプチド又は脂質から選択される。最も好ましくは、H L E P はヒト血清アルブミンである。

【 0 0 8 3 】

用語「ヒト血清アルブミン」(H S A)及び「ヒトアルブミン」(H A)は、本出願において交換可能に使用される。用語「アルブミン」及び「血清アルブミン」はより広義であり、ヒト血清アルブミン(並びにそのフラグメント及び変異体)に加えて他の種由来のアルブミン(並びにそのフラグメント及び変異体)も包含する。

10

【 0 0 8 4 】

本明細書で使用される「アルブミン」は、アルブミンポリペプチド若しくはアミノ酸配列、又はアルブミンの1つ又はそれ以上の機能的活性(例えば、生物学的活性)、例えば $C a^{2+}$ 、 $N a^{+}$ 、 K^{+} 、 $Z n^{2+}$ イオン、脂肪酸、ホルモン、ビリルビンの結合又は $F c R n$ への結合を有するアルブミンフラグメント若しくは変異体を集合的に指す。特に、「アルブミン」は、ヒトアルブミン若しくはそのフラグメント、特に本明細書で配列番号7に示されるヒトアルブミンの成熟形態、又は他の脊椎動物由来のアルブミン若しくはそのフラグメント、又はこれらの分子のアナログ若しくは変異体若しくはそのフラグメントを指す。

20

【 0 0 8 5 】

特に、本発明の提案されるVWF融合構築物は、ヒトアルブミンの天然に存在する多型変異体及びヒトアルブミンのフラグメントを含み得る。一般的に言えば、アルブミンフラグメント又は変異体は、少なくとも30、最も好ましくは70より多いアミノ酸長である。アルブミン変異体は、アルブミンの少なくとも1つのドメイン全体若しくは該ドメインのフラグメント、例えばドメイン1(配列番号7のアミノ酸1~194)、2(配列番号7のアミノ酸195~387)、3(配列番号7のアミノ酸388~585)、1+2(配列番号7の1~387)、2+3(配列番号7の195~585)又は1+3(配列番号3のアミノ酸1~194+配列番号7のアミノ酸388~585)から優先的に成るものであっても、あるいはこれらを含んでいてもよい。各ドメインは、残基 $L y s 106 \sim G l u 119$ 、 $G l u 292 \sim V a l 315$ 及び $G l u 492 \sim A l a 511$ を含む可動性サブドメイン間リンカー領域と共に、それ自体2つの相同なサブドメイン、すなわち1~105、120~194、195~291、316~387、388~491及び512~585から構成される。

30

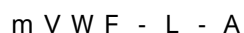
【 0 0 8 6 】

本発明の複合体内のVWF融合構築物のアルブミン部分は、H A の少なくとも1つのサブドメイン若しくはドメイン又はそれらの保存的修飾を含み得る。

【 0 0 8 7 】

好ましい実施態様において、アルブミンのN末端は修飾されたVWFのアミノ酸配列のC末端に融合される。すなわち、本発明の複合体は構造:

40



[ここでm V W F は本明細書上記の修飾されたVWFであり、Lは任意のペプチドリンカー配列であり、そしてAは本明細書の上で定義されるアルブミンである]

を含み得る。

【 0 0 8 8 】

本発明の修飾されたVWF又は修飾されたVWFとのF V I I Iの複合体は、1つより多くのH L E P配列、例えば2または3つのH L E P配列を含み得る。これらの複数のH L E P配列は、縦一列に、例えば連続した反復として、VWFのC末端部分に融合され得る。

【 0 0 8 9 】

50

H L E Pはまた、ペプチドリンカーによりV W Fにカップリングされ得る。リンカーは非免疫原性であるべきであり、そして切断不可能なリンカーでも切断可能なリンカーでもよい。切断不可能なリンカーは、例えば、W O 2 0 0 7 / 0 9 0 5 8 4において例示されるように交互のグリシン及びセリン残基から構成され得る。

【 0 0 9 0 】

V W F部分とH L E P部分との間の可能なペプチドリンカーはまた、ペプチド配列から成るものであり得、これはヒトタンパク質における天然ドメイン間リンカーとして役立つ。好ましくは、それらの天然環境におけるこのようなペプチド配列はタンパク質表面の近くに位置し、そしてこの配列に対する自己寛容 (n a t u r a l t o l e r a n c e) が想定され得るように免疫系にアクセス可能である。例がW O 2 0 0 7 / 0 9 0 5 8 4に示される。好ましくは、リンカー領域はV W Fの配列を含み、これは発現された融合タンパク質の新抗原特性の減少した危険性を生じるはずである。

10

【 0 0 9 1 】

切断可能なリンカーは、プロテアーゼによる切断を可能にするために十分可動性であるべきである。リンカーペプチドは、好ましくは凝固系のプロテアーゼ、例えばF I I a、F I X a、F X a、F X I a、F X I I a及び/又はF V I I aにより切断可能である。

【 0 0 9 2 】

H L E Pはまた、非共有結合で半減期延長部分、例えばヒト血漿中に天然に存在するタンパク質 (例えば、アルブミン、免疫グロブリン) に結合することができるペプチドであり得る。この場合、V W Fは、好ましくはD ' D 3ドメインに対してC末端又はN末端に、半減期延長部分を結合するペプチドを保有するやり方で修飾されるだろう。

20

【 0 0 9 3 】

本発明の別の実施態様において、V W Fの半減期は、化学的修飾、例えばポリエチレングリコール (P E G 化)、グリコシル化P E G、ヒドロキシルエチルデンプン (H E S 化)、ポリシアル酸、エラスチン様ポリペプチド、ヘパロサンポリマー又はヒアルロン酸のような半減期延長部分の結合により延長される。

【 0 0 9 4 】

本発明の別の実施態様は、第V I I I因子と半減期を延長されたV W Fとの共有結合複合体であり、ここで第V I I I因子は、第V I I I因子に付加されたさらなるペプチド又はポリペプチド配列を介してV W Fに接続される。好ましくは、付加された配列は1つ又はそれ以上のV W Fドメインを含む。

30

【 0 0 9 5 】

上述のように、小胞体での生合成の間、V W Fプロペプチドモノマーは、C末端シスチンノットドメイン (C K) の間に形成されたC末端ジスルフィド架橋を介してダイマーへと組み立てられる。本発明者らは、驚くべきことに、このC Kドメインが、第V I I I因子に融合された場合に、第V I I I因子中に導入されたC Kドメインと、V W F中に天然に存在するものとの間にジスルフィド共有結合連結をもたらすということを今や見出した。従ってこのことは、本発明の第V I I I因子とV W Fとの間の共有結合複合体を達成する別の新しい方法を提示する。共有結合連結が形成される効率は、第V I I I因子に融合されたV W Fの部分にさらなるCドメインが含まれる場合に増強され得る。これらは、例えば、場合によりさらなるV W Fドメインにより延長された、Z h o uら (2 0 1 2、B l o o d 1 2 0、4 4 9 - 4 5 8) により定義された、C 5 ~ C 6ドメイン、C 3 ~ C 6ドメイン又はC 1 ~ C 6ドメインであり得る。

40

【 0 0 9 6 】

従って、本発明の別の実施態様は、V W F及び第V I I I因子を含む共有結合複合体であり、ここでV W FはV W Fの半減期延長形態であり、ここで第V I I Iは、V W FのC末端ドメインC Kを含み、場合によりさらなるV W Fドメインを含有するように修飾されている。好ましくは、第V I I I因子は、そのC K末端でそのように修飾されている。より好ましくは、第V I I I因子は、システイン残基2 7 7 3 (又はその等価物が) が保存されるならば、好ましくはそのC末端に、配列番号2の残基2 7 2 3 ~ 2 8 1 3、2 7 2

50

2 ~ 2813、2724 ~ 2813、2580 ~ 2813、2578 ~ 2813、2497 ~ 2813、2429 ~ 2813、2400 ~ 2813、2334 ~ 2813、2255 ~ 2813、1873 ~ 2813、1683 ~ 2813、1277 ~ 2813、1264 ~ 2813若しくは764 ~ 2813又はその変異体を含む。好ましくは、修飾された第V I I I因子は、C Kドメインに加えて、Zhouら(2012、Blood 120、449-458)により定義されるVWFのC6、C5 ~ C6、C4 ~ C6、C3 ~ C6、C2 ~ C6、若しくはC1 ~ C6ドメイン又はその変異体を含む。場合により、C K及びCドメインはVWFのさらなるドメインにより延長され得る。

【0097】

本発明の別の実施態様において、第V I I I因子はVWFのC末端ドメインの1つ又はそれ以上とN末端で融合される(図6を参照のこと)。このようなC末端ドメインは、VWFのC末端シスチンノット(C K)ドメインから誘導され得、そしてVWFのVWF配列全体までCドメイン、Dドメイン、又はAドメインのうちの1つ又はそれ以上をさらに含み得る(VWFの構造については図2を参照のこと)。より好ましくは、第V I I I因子は、好ましくはそのN末端に、配列番号2の残基2723 ~ 2813、2722 ~ 2813、2724 ~ 2813、2580 ~ 2813、2578 ~ 2813、2497 ~ 2813、2429 ~ 2813、2400 ~ 2813、2334 ~ 2813、2255 ~ 2813、1873 ~ 2813、1683 ~ 2813、1277 ~ 2813若しくは1264 ~ 2813若しくは764 ~ 2813又はその変異体を含むが、ただしシステイン残基2773(又はその等価物)は保存される。この実施態様において、シグナルペプチドをVWFドメインのN末端に付加し、そしてVWFドメインを成熟第V I I I因子(シグナルペプチド無し)のN末端に直接又はポリペプチドリinkerを介して融合する。

【0098】

好ましくは、VWFの、場合によりさらなるドメインにより延長されたC末端C Kドメインは、切断可能なリンカーにより第V I I I因子に結合される。リンカー配列は、1つ又はそれ以上のアミノ酸、例えば1 ~ 200、1 ~ 150、1 ~ 100、1 ~ 50、1 ~ 30、1 ~ 20、1 ~ 15、1 ~ 10、1 ~ 5又は1 ~ 3つ(例えば1、2又は3)のアミノ酸から成るものであり得、そしてこれらは互いに等しくても異なってもよい。通常は、リンカー配列は野生型凝固因子中の対応する位置に存在しない。好ましくは、リンカーは切断可能なリンカーであり、すなわち、これはプロテアーゼの切断部位を含み、好ましくは、血液凝固に関連するプロテアーゼにより切断可能な切断部位を含み、より好ましくは、切断可能なリンカーはトロンピン切断部位を含み、なおより好ましくはF V I I Iのトロンピン切断部位のうちの1つを含む。

【0099】

切断可能リンカーの例は

EDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRN (配列番号6(F V I I I)のaa1675 ~ 1720)又は
NTGDY YEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSF SQNSRHRSTRQKQFNATTIPEN (配列番号6のaa714 ~ 764)又は
VVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYA
PLV (配列番号6のaa357 ~ 399)又は
VVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYA
(配列番号6のaa357 ~ 396)又は
VVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWD (配列番号6のaa357 ~ 394)

であり、切断性が保持されるならば、その欠失、挿入及び/又は置換を含む。

【0100】

場合により、リンカーはさらなるアミノ酸残基を含み、これらは好ましくはVWF由来のドメインとリンカーの切断可能な部分との間に導入される。好ましくは、さらなる残基は、第V I I I因子とVWFとの、特にそれぞれa3及びD' D3領域を介した相互作用

を可能にするために十分な長さのペプチドを提供する。さらなるアミノ酸残基は、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120又は150アミノ酸よりも多くてもよい。好ましくは、さらなるアミノ酸残基は、可動性「非構造的」ペプチドを形成し、そしてより好ましくは、グリシン-セリン反復、プロリン-アラニン-セリン反復、ホモアミノ酸反復、又はF V I I I Bドメインの配列を含むか、又はこれらから成る。

【0101】

本発明の別の実施態様は、VWF及び第V I I I因子を含む共有結合複合体であり、ここでVWFはVWFの半減期延長形態であり、かつ第V I I I因子はVWFのD' D3領域、及び場合によりVWFのさらなるドメインを含むように修飾されている(図5)。好ましくは、第V I I I因子は、その部分的又は完全なBドメインがVWF D' D3領域又はそのフラグメントで置き換えられるように修飾される(図5d及びe)。より好ましくは、第V I I I因子は、好ましくはそのBドメイン(又はその一部)の代わりに、それぞれ配列番号2の残基764~1241、764~1242、764~1247若しくは764~1270又は764と1241~1270との間のいずれかの配列、又はその変異体若しくはフラグメントを含む。

【0102】

好ましくは、VWFのD' D3ドメインは、細胞培養培地中への分子の分泌の際に2鎖分子が生成されるように、かつD' D3ドメインが第V I I I因子軽鎖のN末端に位置するように、第V I I I因子に結合される。これは、例えばP A C E /フリンの切断部位を含む切断可能なリンカーを、第V I I I因子a2ドメインとVWF D' D3ドメインとの間に導入することにより達成され得る(図5d及びe)。場合により、リンカーは、VWFのD' D3ドメインと第V I I I因子a3ドメインとの間のさらなる残基を含む(図5e)。さらなる残基は、それぞれa3及びD' D3領域を介する第V I I I因子とVWFとの分子内相互作用を可能にするために十分な長さのペプチドを含む。好ましくは、さらなる残基は、300、250、200、150、120、100、90、80、70、60、50、40、30、25、20、15、又は10アミノ酸未満である。さらなるアミノ酸残基は、可動性の「非構造的」ペプチドを含み得、好ましくはそれらはグリシン-セリン反復、プロリン-アラニン-セリン反復又はホモアミノ酸反復、又はF V I I I Bドメイン由来の配列を含むか又はこれらから成りさえる。

【0103】

上記の実施態様は成熟形態であり；当業者は、例えば、さらなる配列、例えばN末端のシグナル配列を含めることにより、成熟形態を得るために発現されるべきタンパク質を構築することができる。

【0104】

あるいは、第V I I I因子のN末端は、場合によりVWFのさらなるドメイン(例えば、D1及びD2ドメイン)を含有する、VWF D' D3ドメイン又はそのフラグメントのCドメイン末端に接続され、これは好ましくはシグナルペプチドによりN末端で伸長されている。これは、半減期を延長されたVWFとの共有結合の発現及び細胞内形成において助けとなる。より好ましくは、VWF部分は、配列番号2のN末端残基1~1241若しくは残基764~1241(プロペプチドの切断後)又はその変異体若しくはフラグメントを含む。

【0105】

好ましくは、それぞれVWFのD' D3又はD1 D2 D' D3ドメインは、切断可能なリンカーにより第V I I I因子のN末端に結合される。より好ましくは、切断可能なリンカーは、プロテアーゼ切断部位、より好ましくは凝固系のプロテアーゼのうちの1つについての切断部位、なおより好ましくは、トロンピン切断部位、好ましくはF V I I Iのトロンピン切断部位のうちの1つを含む。場合により、リンカーは、VWFのD' D3又はD1 D2 D' D3ドメインと第V I I I因子分子との間にさらなる残基を含み、さらなる残基は、それぞれa3及びD' D3領域を介した第V I I I因子とVWFとの分子内相互

作用を可能にするために十分な長さのペプチドを含む。好ましくは、20、30、40、50、70、100又は150より多いさらなるアミノ酸が加えられる。好ましくは、さらなるアミノ酸は、可動性の非構造的ペプチドを含み、より好ましくは、それらはグリシン-セリン反復、プロリン-アラニン-セリン反復、ホモアミノ酸反復、又はF V I I I Bドメインの配列を含むか又はそれらから成りさえる。

【0106】

さらなる代替として、第V I I I因子のC末端は、V W F D' D3ドメイン又はそのフラグメントのN末端に接続される。これは、同時発現される半減期を延長されたV W Fとの共有結合の発現及び細胞内形成において役立つ。より好ましくは、V W Fは、それぞれ配列番号2のアミノ酸764~1241、764~1242、764~1247若しくは764~1270若しくは764と1241~1270との間のいずれか配列又はその変異体もしくはフラグメントを含む。

10

【0107】

好ましくは、V W FのD' D3ドメイン(又はD1 D2 D' D3ドメイン)は、切断可能なリンカーにより第V I I I因子のN末端に結合され; V W Fドメインに対してN末端側にシグナルペプチドを含めることは、哺乳動物細胞におけるタンパク質の発現の際の分泌をもたらす。より好ましくは、切断可能なリンカーは、トロンピン切断部位、好ましくはそれぞれ配列番号6のアミノ酸位置372、740及び/又は1689におけるトロンピン切断部位を含む配列から構成されるF V I I Iのトロンピン切断部位のうちの1つを含む。

20

【0108】

場合により、リンカーは、V W FのD' D3ドメインと第V I I I因子分子との間にさらなる残基を含み、さらなる残基は、それぞれa3及びD' D3領域を介して第V I I I因子とV W Fとの相互作用を可能にするために十分な長さのペプチドを含む。好ましくは、20、30、40、50、70、100、120又は150より多いさらなるアミノ酸が加えられる。好ましくは、さらなるアミノ酸は、可動性の非構造的ペプチドを含み、より好ましくは、それらはグリシン-セリン反復、プロリン-アラニン-セリン反復、ホモアミノ酸反復、又はF V I I I Bドメインの配列を含むか又はこれから成りさえる。

【0109】

様々なリンカーを含むこのような融合タンパク質の例を配列番号144~177に示す; 示される各配列、すなわちDNA及びその翻訳産物(融合タンパク質)、さらには遺伝コードの冗長性のために同じ翻訳産物をコードするDNA配列(例えば、それらのDNA配列のコドン最適化バージョン)は、本発明の特定の実施態様である。しかし、当業者は、また本発明の範囲内でもあるこのような融合タンパク質の多くのさらなる例を設計することができるだろう。

30

【0110】

好ましくは、本発明の複合体のV W F部分は、天然で形成するようにマルチマーを形成する。特定の理由のためには、複合体のV W F部分がダイマーより多くを形成しないことが望ましいかもしれない。これは、V W Fのプロペプチド配列を除去し、そしてV W Fシグナルペプチドを直接D'のN末端に融合し、それによりプロペプチドを除去されたV W F分子の発現を可能にすることにより達成され得る。プロペプチドが存在しないことに起因して、D' D3ドメインを介した多量体化がブロックされる。他の特定の理由のためには、複合体のV W F部分がモノマーより多くを形成しないことが望ましいかもしれない。これは、V W Fのプロペプチド配列を除去し、そしてV W Fシグナルペプチドを直接D'に融合し、プロペプチドを除去されたV W F分子の発現を可能にすることにより、そしてさらにCys2773の別の適切なアミノ酸、例えばアラニンへの変異を導入することにより、達成され得る。

40

【0111】

本発明の別の実施態様は、1つ又はそれ以上の共有結合が第V I I I因子とV W F結合部位との間に直接存在する(好ましくはジスルフィド結合)第V I I I因子/V W F複合

50

体、及び別の共有結合が分子の第V I I I因子とV W F部分との間に存在する第V I I I因子/V W F複合体、及び1つ又はそれ以上のH L E Pが第V I I I因子に、V W Fに、又は両方に接続されている第V I I I因子/V W F複合体を形成する上記の実施態様のいずれかの組み合わせである(図12)。このような第V I I I因子/V W F複合体は、第V I I I因子とV W F部分との間にジスルフィド結合のみを含む複合体よりも高い収率で生成可能であり得るので、有利であり得る。

【0112】

本発明の第二の局面は、上記の第V I I I因子とV W Fとの共有結合複合体を製造する方法であり、該方法は、真核生物細胞株において第V I I I因子及びV W Fを同時発現させることを含む。従って、本発明はまた、本発明の複合体を形成するタンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。

10

【0113】

用語「ポリヌクレオチド」は、一般に、未修飾RNA若しくはDNAでも修飾されたRNA若しくはDNAでもよいいずれかのポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドを指す。ポリヌクレオチドは、1本鎖DNAでも2本鎖DNAでも、1本鎖RNAでも2本鎖RNAでもよい。本明細書で使用される用語「ポリヌクレオチド」は、1つ又はそれ以上の修飾塩基及び/又は異常な塩基、例えばイノシンを含むDNA又はRNAも含む。当然のことながら、当業者に公知の多くの有用な目的に役立つ様々な修飾がDNA及びRNAに対して成され得る。本明細書で使用される用語「ポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドのこのような化学的、酵素的または代謝的な修飾された形態、さらにはウイルス並びに単細胞及び複雑な細胞を含めた細胞に特徴的なDNA及びRNAの化学的形態も包含する。

20

【0114】

当業者には当然のことながら、遺伝子コードの縮重に金して、所定のポリペプチドは異なるポリヌクレオチドによりコードされ得る。これらの「変異体(variants)」は本発明により包含される。

【0115】

好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは単離されたポリヌクレオチドである。用語「単離された」ポリヌクレオチドは、限定されないが他の染色体及び染色体外DNA及びRNAのような他の核酸配列を実質的に含まないポリヌクレオチドを指す。単離されたポリヌクレオチドは、宿主細胞から精製され得る。当業者に公知の従来の核酸精製法が単離されたポリヌクレオチドを得るために使用され得る。この用語はまた、組み換えポリヌクレオチド及び化学的に合成されたポリヌクレオチドも含む。

30

【0116】

本発明はさらに、本発明の修飾されたV W F及び/若しくは修飾された第V I I I因子、又は修飾されたV W F及び/若しくは修飾された第V I I I因子を含む本発明のポリペプチドと一緒にコードする一群のポリヌクレオチドに関する。例えば、群中の第一のポリヌクレオチドは、修飾された第V I I I因子の重鎖をコードし得、そして第二のポリヌクレオチドは修飾された第V I I I因子の軽鎖をコードし得、そして第三のポリヌクレオチドは修飾されたV W Fをコードし得る。

40

【0117】

本発明のさらに別の局面は、本発明に従うポリヌクレオチドを含むプラスミド又はベクターである。好ましくは、このプラスミド又はベクターは発現ベクターである。特定の実施態様において、ベクターはヒト遺伝子治療における使用のための転移ベクターである。

【0118】

本発明はまた、上記の一群のポリヌクレオチドを含む一群のプラスミド又はベクターに関する。第一のプラスミド又はベクターは、上記第一のポリヌクレオチドを含み得、そして第二のプラスミド又はベクターは上記第二のポリヌクレオチドを含み得る。あるいは、2つ又はそれ以上のコード配列が、本発明の複合体の一部である1つより多くのタンパク質の発現を方向づけるために、別々のプロモーター配列又は1つのプロモーター及び内部リ

50

ボソーム移行部位 (I R E S) エレメントのいずれかを使用して1つの発現ベクターにクローンされる。

【 0 1 1 9 】

本発明のさらに別の局面は、本発明のポリヌクレオチド、プラスミド若しくはベクター、又は本明細書に記載される一群のポリヌクレオチド、若しくは一群のプラスミド若しくはベクターを含む宿主細胞である。

【 0 1 2 0 】

本発明の宿主細胞は、本発明の共有結合複合体を製造する方法において使用され得る。該方法は：

(a) 所望のタンパク質複合体が発現されるような条件下で本発明の細胞を培養すること；及び

(b) 場合により、宿主細胞から、または培地から所望のタンパク質複合体を回収することを含む。

【 0 1 2 1 】

適切な宿主細胞において高レベルで組み換え変異体タンパク質を産生することは、当業者に公知の方法に従って様々な発現系において増殖され得る組み換え発現ベクターにおいて適切な調節エレメントと一緒に有効な転写単位へと上述の修飾された c D N A を組み立てることを必要とする。有効な転写調節エレメントは、それらの天然宿主として動物細胞を有するウイルスから、又は動物細胞の染色体 D N A から誘導され得る。好ましくは、サルウイルス 4 0、アデノウイルス、B K ポリオーマウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、若しくはラウス肉腫ウイルスの長い末端反復由来のプロモーター - エンハンサーの組み合わせ、又はベータ - アクチン若しくは G R P 7 8 のような動物細胞における強く恒常的に転写される遺伝子を含むプロモーター - エンハンサーの組み合わせが使用され得る。c D N A から転写された m R N A の安定な高いレベルを達成するために、転写単位はその 3 ' 近位部分において転写終結ポリアデニル化配列をコードする D N A 領域を含有すべきである。好ましくは、この配列は、サルウイルス 4 0 初期転写領域、ウサギベータ - グロビン遺伝子、又はヒト組織プラスミノージェン活性化因子遺伝子由来である。

【 0 1 2 2 】

次いで c D N A を、修飾された第 V I I I 因子及びノ又は V W F タンパク質の発現のために適した宿主細胞株のゲノムに組み込み得、次いでこれを本発明の共有結合複合体へと組み立て得る。あるいは、細胞中で安定な染色体外エレメントとして残る安定なエピソームベクターもまた使用され得る。好ましくは、この細胞株は、正確な折り畳み、ジスルフィド結合形成、アスパラギン連結グリコシル化及び他の翻訳後修飾、さらには培地への分泌を確実にするために、脊椎動物起源の動物細胞株であるべきである。他の翻訳後修飾の例は、新生ポリペプチド鎖のチロシン O - 硫酸化及びタンパク質分解性プロセッシングである。使用され得る細胞株の例は、サル C O S 細胞、マウス L 細胞、マウス C 1 2 7 細胞、ハムスター B H K - 2 1 細胞、ヒト H E K - 2 9 3 細胞、及びハムスター C H O 細胞である。

【 0 1 2 3 】

対応する c D N A をコードする組み換え発現ベクターを、いくつかの異なる方法で動物又はヒトの細胞株中に導入し得る。例えば、組み換え発現ベクターは、異なる動物ウイルスに基づくベクターから作製することができる。これらの例は、パキユロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、及び好ましくはウシパピローマウイルスに基づくベクターである。

【 0 1 2 4 】

対応する D N A をコードする転写単位もまた、組み換え D N A をそれらのゲノムに組み込まれている特定の細胞クローンの単離を容易にするために、これらの細胞において優性選択可能マーカーとして機能し得る別の組み換え遺伝子と一緒に動物細胞中に導入され得る。この種の優性選択可能マーカー遺伝子の例は、ジェネティシン (G 4 1 8) に対する

10

20

30

40

50

抵抗性を与える T n 5 アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ、ハイグロマイシンに対する抵抗性を与えるハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ、及びピューロマイシンに対する抵抗性を与えるピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼである。このような選択可能なマーカーをコードする組み換え発現ベクターは、所望のタンパク質の c D N A をコードするベクターと同じベクター上に存在していても、又は宿主細胞のゲノムに同時に導入され組み込まれる別のベクターにコードされていてもよく、頻繁に、強い物理的連結を異なる転写単位間に生じる。

【 0 1 2 5 】

所望のタンパク質の c D N A と一緒に使用され得る他の種類の選択可能なマーカー遺伝子は、ジヒドロ葉酸還元酵素 (d h f r) をコードする様々な転写単位に基づく。この種の遺伝子を、内因性 d h f r 活性を欠いた細胞、優先的に C H O 細胞 (D U K X - B 1 1 、 D G - 4 4) 中に導入した後、これらがヌクレオシドを含まない培地で増殖することが可能となる。このような培地の例は、ヒポキサンチン、チミジン、及びグリシンを含まない H a m の F 1 2 である。これらの d h f r 遺伝子は、同じベクター又は異なるベクターのいずれかに連結されて、c D N A 転写単位と一緒に上記の種類 C H O 細胞中に導入され得、そのようにして組み換えタンパク質を産生する d h f r 陽性細胞株を作製する。

10

【 0 1 2 6 】

細胞傷害性 d h f r 阻害剤メトトレキサートの存在下で上記細胞株が増殖する場合、メトトレキサートに抵抗性の新しい細胞株が出現する。これらの細胞株は、増幅された数の連結された d h f r 及び所望のタンパク質の転写単位に起因して増加した速度で組み換えタンパク質を産生し得る。これらの細胞株を、増加する濃度のメトトレキサート (1 ~ 1 0 0 0 0 n M) で増殖させる場合、非常に高い速度で所望のタンパク質を産生する新しい細胞株を得ることができる。

20

【 0 1 2 7 】

所望のタンパク質を産生する上記細胞株を、懸濁培養液中又は様々な固体支持体上のいずれかで大規模で増殖させることができる。これらの支持体の例は、デキストラン若しくはコラーゲンマトリックスに基づくマイクロキャリア、又は中空繊維若しくは様々なセラミック材料の形態の固体支持体である。細胞懸濁培養液又はマイクロキャリアで増殖する場合、上記細胞株の培養は、バッチ培養として、又は長期間にわたって馴化培地の連続的製造を用いる灌流培養のいずれかとして行われ得る。従って、本発明によれば、上記細胞株は所望の組み換え変異体タンパク質の製造のための工業プロセスの開発のために十分適している。

30

【 0 1 2 8 】

本発明の複合体を 8 0 % の純度まで、より好ましくは 9 5 % の純度まで精製することが好ましく、そして細胞培養由来の混入した高分子、特に他のタンパク質及び核酸に関して 9 9 . 9 % より高い純度で、かつ感染性及び発熱性の因子を含まない薬学的に純粋な状態が特に好ましい。好ましくは、単離された又は精製された本発明の修飾共有結合複合体は、他の無関係なポリペプチドを実質的に含まない。

【 0 1 2 9 】

本発明の共有結合複合体は、上記の種類分泌細胞の培地中に蓄積し、所望のタンパク質と細胞培養媒体中の他の物質の間のサイズ、電荷、疎水性、溶解度、特異的親和性などの差異を利用する方法を含む様々な生化学的及びクロマトグラフィー法により濃縮及び精製され得る。

40

【 0 1 3 0 】

このような精製の例は、例えば、H L E P、好ましくはヒトアルブミンに特異的な、又はそれぞれの凝固因子に特異的な、固体支持体上に固定されたモノクローマ抗体への組み換え変異体タンパク質の吸着である。複合体の支持体への吸着、洗浄及び脱着後に、タンパク質を、上記の特性に基づいて様々なクロマトグラフィー技術によりさらに精製することができる。精製工程の順序は、例えば工程の容量及び選択性、支持体の安定性又は他の局面に従って選択される。例えば、好ましい精製工程は、限定されないが、イオン交換ク

50

ロマトグラフィー工程、免疫親和性クロマトグラフィー工程、親和性クロマトグラフィー工程、疎水性クロマトグラフィー工程、色素クロマトグラフィー工程、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー工程、マルチモーダルクロマトグラフィー工程、及びサイズ排除クロマトグラフィー工程である。

【0131】

ウイルス混入の理論的危険性を最小にするために、ウイルスの効果的な不活化及び/又は除去を可能にするプロセスにおいてさらなる工程が含まれ得る。このような工程は、例えば、液体若しくは固体状態での熱処理、溶媒及び/若しくは界面活性剤での処理、可視若しくはUVスペクトルでの照射、ガンマ線照射又はナノろ過である。

【0132】

本発明の修飾されたポリヌクレオチド(例えばDNA)はまた、ヒト遺伝子治療における使用のために導入ベクターに組み込まれ得る。

【0133】

本発明のこの局面の別の実施態様において、(修飾された)第VII因子及び(修飾された)VWFは、化学的架橋により共有結合で接続される。

【0134】

本発明の様々な生成物は薬剤として有用である。従って、本発明の第三の局面は、薬剤、好ましくは出血障害の処置又は予防における使用のための上記の共有結合複合体である。好ましくは、出血障害は血友病A又はVWDである。

【0135】

本発明の第四の局面は、上記の共有結合複合体を含む医薬組成物である。本発明において記載される共有結合複合体は、治療的使用のために医薬製剤へと製剤化され得る。精製されたタンパク質は、従来の生理学的に適合性の水性緩衝溶液に溶解され、これには場合により、医薬製剤を提供するための医薬添加剤が添加され得る。

【0136】

このような医薬担体及び添加剤、さらには適切な医薬製剤は、当該分野で周知である(例えば、「Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins」、Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000)又は「Handbook of Pharmaceutical Excipients」、3rd edition、Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000)を参照のこと)。標準的な医薬製剤化技術は当業者に周知である(例えば、2005 Physicians' Desk Reference^(R)、Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Gennaro et al., Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000を参照のこと)。特に、本発明の共有結合複合体を含む医薬組成物は、凍結乾燥形態又は安定な液体形態で製剤化され得る。ポリペプチド変異体は、当該分野で公知の様々な手順により凍結乾燥され得る。凍結乾燥製剤は、注射用滅菌水又は滅菌生理食塩水のような1つ又はそれ以上の薬学的に許容しうる希釈剤の添加により使用前に再構成される。

【0137】

組成物の製剤は、いずれかの薬学的に適した投与手段により個体に送達される。様々な送達系が公知であり、そしていずれかの都合の良い経路により組成物を投与するために使用され得る。好ましくは、本発明の組成物は全身投与される。全身使用のために、本発明の複合体は、非経口(例えば、静脈内、皮下、筋内、腹腔内、脳内、肺内、鼻腔内又は経皮)送達又は経腸的(例えば、経口、膣又は直腸)送達のために従来の方法に従って製剤化される。最も優先的な投与経路は、静脈内及び皮下投与である。製剤は、注入により又はボラス注射により持続的に投与され得る。いくつかの製剤は遅い放出系を包含する。

【0138】

本発明の共有結合複合体は、治療有効用量で患者に投与され、これは、耐えられない有害な副作用を生じる用量に達することなく、処置される状態又は適応症の重症度又は拡散を予防するか又は低減する、所望の効果を生じるために十分である用量を意味する。正確な用量は、例えば適応症、製剤、投与様式のような多くの因子に依存し、そして各々の適応症について前臨床及び臨床試験において決定されなければならない。

【0139】

本発明の医薬組成物は、単独で、又は他の治療剤と併用して投与され得る。これらの薬剤は、同じ医薬製剤の一部として組み込まれ得る。

【0140】

本発明のさらなる局面は、有効量の上記の複合体を、それを必要とする被験体に投与することにより出血障害を処置又は予防する方法である。別の実施態様において、該方法は、有効量の、本発明のポリヌクレオチド又は本発明のプラスミド若しくはベクターを個体に投与することを含む。あるいは、該方法は、有効量の本明細書に記載される本発明の宿主細胞を個体に投与することを含み得る。

10

【0141】

本発明は、以下の非限定的な実施例においてさらに記載される。本発明の特定の実施態様の記載は、添付の図面と合わせてなされ得る。

【図面の簡単な説明】

【0142】

【図1】図1： a)、成熟FVIIITタンパク質のドメイン構造； b) Bドメイン欠失成熟FVIIITタンパク質のドメイン構造； c) Bドメイン欠失1本鎖成熟FVIIITタンパク質のドメイン構造。矢印はPACE/フリリン切断部位を示し、三角は活性化のためのトロンピン切断部位を示す。

20

【図2】図2： Zhouら、2012に従う、プロ-VWF(A)及び成熟VWF(B)のドメイン構造。VWF-二量体化及び多量体化は示していない。

【図3】図3： 第VIIIF因子及びVWFがジスルフィド架橋を介して連結された共有結合複合体の例。VWFドメインを灰色で示し、第VIIIF因子を白色で示す。

【図4-1】図4： VWFCKドメインを含むVWFドメインを伴う修飾FVIIIFの例。FVIIIFドメインを白色で示し、VWFドメインを灰色で示す。黒三角はトロンピン切断部位を示し、白三角はリンカーに導入されたプロテアーゼ切断部位を示す。

30

【図4-2】図4-1の続き。

【図5-1】図5： D'D3ドメインを含むVWFドメインを伴う修飾FVIIIFの例。矢印はPACE/フリリン切断部位を示し、黒三角はトロンピン切断部位を示し、白三角はリンカーに導入されたプロテアーゼ切断部位を示す。

【図5-2】図5-1の続き。

【図6-1】図6： さらなるVWFドメインで修飾されたFVIIIF。記号は上で説明されたとおりである。

【図6-2】図6-1の続き。

【図6-3】図6-2の続き。

【図7】図7： 化学的架橋により連結された共有結合複合体の例。

40

【図8】図8： 共有結合で連結されたFVIIIF-SC/VWF-FP分子のウェスタンブロット。M、分子サイズマーカー。A、抗FVIIIF、B、抗VWF抗体ブロット。

【図9】図9： 精製後(レーン1)及びその後のトロンピン切断後(レーン2)の還元SDS-PAGEでの共有結合で連結されたFVIIIF-SC/VWF-FP分子の分離。

【図10】図10： 抗VWF抗体(A)及び抗FVIIIF抗体(B)による共有結合で連結されたFVIIIF-SC/VWF-FPマルチマー分子のマルチマーゲル分析。レーン1、血漿由来VWF； レーン2及び3、共有結合で連結されたFVIIIF-SC/VWF-FPマルチマーを発現する2つのクローンの上清； レーン4、rVWF-FP。

【図11】図11： ラットにおける共有結合で連結されたFVIIIF-SC/VWF-

50

F P マルチマー（丸）の薬物動態解析。A、F V I I I データ、B、V W F データ。

【図 1 2 - 1】図 1 2： 場合によりペプチドリンカーを介した、ジスルフィド架橋及び V W F の第 V I I I 因子への融合の両方を用いた構築物の例。

【図 1 2 - 2】図 1 2 - 1 の続き。

【図 1 2 - 3】図 1 2 - 2 の続き。

【図 1 2 - 4】図 1 2 - 3 の続き。

【発明を実施するための形態】

【0143】

配列表：

配列番号 1： ヒト V W F の c D N A 配列

10

配列番号 2： ヒト V W F のタンパク質配列

配列番号 3： P C R プライマー V W F +

配列番号 4： P C R プライマー V W F -

配列番号 5： ヒト F V I I I の c D N A 配列

配列番号 6： 成熟ヒト F V I I I のタンパク質配列

配列番号 7： 成熟ヒト血清アルブミンのタンパク質配列

配列番号： 8 ~ 1 4 3： 実施例に列挙される変異誘発のための様々なプライマー及びオリゴヌクレオチド。

配列番号： 1 4 4 ~ 1 7 7： 様々なリンカーを通して接続された、様々な V W F - C K 含有配列とのヒト 1 本鎖 F V I I I の融合タンパク質配列（D N A 及びタンパク質）。

20

【実施例】

【0144】

実施例 1： D ' D 3 領域中にシステイン残基を含む V W F 変異体の生成

その多重クローニング部位に全長 V W F c D N A 配列を含有する発現プラスミド（p I R E S p u r o 3； B D B i o s c i e n c e s、F r a n k l i n L a k e s、N J、U S A）を予め生成した（p V W F - 2 4 4 8）。このベクター中に含まれる V W F c D N A 配列は配列番号 1 と示され、その対応するタンパク質配列は配列番号 2 と示される。

【0145】

このような発現ベクターを生成するために、V W F c D N A を、当業者に公知の標準的な条件下で（そして例えば、C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y、A u s u b e l F M e t a l . (e d s .) J o h n W i l e y & S o n s、I n c .；<http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/>に記載されるように）、V W F c D N A（市販される、例えば A T C C、No. 6 7 1 2 2 から p M T 2 - V W F から入手可能）を含有するプラスミドから、プライマーセット V W F + 及び V W F -（配列番号 3 及び 4）を使用してポリメラーゼ連鎖反応（P C R）により増幅し得る。得られた P C R フラグメントは、制限エンドヌクレアーゼ E c o R I により消化され得、そして E c o R I により直線化された発現ベクター p I R E S p u r o 3 に連結され得る。挿入断片の正確な起源についてスクリーニングした得られた発現プラスミドは、V W F 発現に適した C M V プロモーターの下流に V W F の野生型 c D N A を含有する。

30

40

【0146】

V W F 配列に変異を導入するために、部位特異的変異誘発（Q u i c k C h a n g e X L S i t e D i r e c t e d M u t a g e n e s i s K i t、A g i l e n t T e c h n o l o g i e s、L a J o l l a、C A、U S A）を、キット製造者により勧められる以下のプロトコルに従ってプラスミド p V W F - 2 4 4 8 に適用した。変異誘発反応ごとに、1 0 x 反応緩衝液 5 μ l、プラスミド D N A p V W F - 2 4 4 8 1 μ l（5 0 n g）、1 μ l（1 0 p m o l / μ l）それぞれの 2 つの変異誘発オリゴヌクレオチドの各々、1 μ l d N T P ミックス、3 μ l Q u i c k - S o l u t i o n、1 μ l T u r b o ポリメラーゼ（2, 5 U / μ l）及び 3 7 μ l H₂O を混合し

50

、そして2分間95℃で初期変性、a) 50秒間95℃で変性、b) 50秒間60℃でアニーリング、そしてc) 14分間68℃で伸長を18サイクル、続いて単回の7分間68℃の終結伸長期を用いるポリメラーゼ連鎖反応にかけた。続いて、このキットからのDpnI酵素1μlを加え、そして反応混合物をさらに60分間37℃でインキュベートした。その後、変異誘発反応混合物3μlをE. coliコンピテント細胞(例えば、XL10 Gold、Agilent Technologies)に形質転換した。クローンを単離し、プラスミドDNAを抽出し、そしてVWF配列中の変異をDNA配列決定により確認した。

【0147】

以下の表は、VWF cDNA配列の変異誘発に使用したオリゴヌクレオチド及び導入されたそれぞれの変異を記載する。

10

【0148】

【表 2】

VWF 変異	記号表示	変異誘発オリゴヌクレオチド配列 (5' →3')	配列番号
R768C	We4674	GTGTTCCCTGAGCTGCTGCCCTCCTATGGTCAAACCTGG	89
	We4675	CCAGTTTGACCATAGGAGGGCAGCAGCTCAGGGAACAC	90
R782C	We4218	CCCGCTGACAACCTGTGCGCTGAAGGGCTCGAGTG	8
	We4219	CACTCGAGCCCTTCAGCGCACAGGTTGTCAGCGGG	9
G785C	We4226	CAACCTGCGGGCTGAATGCCTCGAGTGACCAAACG	10
	We4227	CGTTTTGGTACTCGAGGCATTAGCCCGCAGGTTG	11
E787C	We4236	GGGCTGAAGGGCTCTGCTGTACCAAACGTGCCAG	12
	We4237	CTGGCACGTTTTGGTACAGCAGAGCCCTTCAGCCC	13
A789C	We4238	GGGCTCGAGTGTTGCAAACGTGCCAGAACTATGAC	14
	We4239	GTCATAGTTCTGGCACGTTTTGCAAACTCGAGCCC	15
T789C	We4238	GGGCTCGAGTGTTGCAAACGTGCCAGAACTATGAC	14
	We4239	GTCATAGTTCTGGCACGTTTTGCAAACTCGAGCCC	15
T791C	We4240	GGGCTCGAGTGACCAAATGCTGCCAGAACTATGACCTG	16
	We4241	CAGGTCATAGTTCTGGCAGCATTTGGTACTCGAGCCC	17
Q793C	We4242	GAGTGTACCAAACGTGCTGCAACTATGACCTGGAGTGC	18
	We4243	GCACTCCAGGTCATAGTTGCAGCACGTTTTGGTACTC	19
N794C	We4244	GTACCAAACGTGCCAGTGCTATGACCTGGAGTGCATGAGC	20
	We4245	GCTCATGCACTCCAGGTCATAGCACTGGCACGTTTTGGTAC	21
Y795C	We4246	GTACCAAACGTGCCAGAACTGTGACCTGGAGTGCATGAGC	22
	We4247	GCTCATGCACTCCAGGTCACAGTTCTGGCACGTTTTGGTAC	23
M800C	We4228	CTATGACCTGGAGTGCTGCAGCACTCCAGGTCATAG	24
	We4229	GAGACACAGCCCATGCTGCAGCACTCCAGGTCATAG	25
R816C	We4220	CCCCGGGCATGGTCTGCCATGAGAACAGATGTGTG	26
	We4221	CACACATCTGTTCTCATGGCAGACCATGCCCGGGG	27
H817C	We4248	GGGCATGGTCCGGTGTGAGAACAGATGTGTGGCC	28
	We4249	GGCCACACATCTGTTCTCACACCGGACCATGCC	29
P828C	We4250	TGGCCCTGGAAGGTGTTGCTGCTTCCATCAGGGC	30
	We4251	GCCCTGATGGAAGCAGCAACACCTTCCAGGGCCA	31
F830C	We4252	GAAAGGTGTCCCTGCTGCCATCAGGGCAAGGAG	32
	We4253	CTCCTTGCCCTGATGGCAGCAGGGACACCTTTC	33
E835C	We4254	CTTCCATCAGGGCAAGTGCTATGCCCTGGAGAAAC	34
	We4255	GTTTCTCCAGGGGCATAGCACTTGCCCTGATGGAAG	35
P838C	We4256	GGGCAAGGAGTATGCCTGTGGAGAAACAGTGAAGATT	36
	We4257	AATCTTCACTGTTTCTCCACAGGCATACTCCTTGCCC	37
D853C	We4258	CATTGTGTCTGTGCGGTCCGGAAGTGGAACTGCAC	38
	We4259	GTGCAGTTCCACTTCCGGCACCGACAGACACAAGTG	39
R854C	We4222	CTTGTGTCTGTGCGGACTGCAAGTGGAACTGCACAG	40
	We4223	CTGTGCAGTTCCACTTGCGAGTCCCGACAGACACAAG	41

10

20

30

40

【表 3】

K855C	We4260	CTGTCGGGACCGGTGCTGGAAGTGCACAGACCATG	42
	We4261	CATGGTCTGTGCAGTTCAGCACCGGTCCCGACAG	43
W856C	We4262	CTGTCGGGACCGGAAGTGCACACTGCACAGACCATG	44
	We4263	CATGGTCTGTGCAGTTGCACCTCCGGTCCCGACAG	45
D879C	We4230	CCACTACCTCACCTTCTGCGGGCTCAAATACCTGTTCC	46
	We4231	GGAACAGGTATTTGAGCCCGCAGAAGGTGAGGTAGTGG	47
R924C	We4224	CCTCAGTCAAATGCAAGAAATGCGTCACCATCCTGGTGG	48
	We4225	CCACCAGGATGGTGACGCATTTCTTGCACTTCACTGAGG	49
E933C	We4435	GTCGAGGGCGGCTGCATCGAACTGTTCCGACGGC	143
	We4436	GCCGTCAAACAGTTCGATGCAGCCGCCCTCGAC	91
T951C	We4447	GGCCTATGAAGGACGAATGCCATTTGAGGTGGTTCGAG	92
	We4448	CTCGACCACCTCGAAATGGCATTTCGTCCTTCATAGGCC	93
L984C	We4469	CCTGTCCATTAGTGTGGTGTGCAAACAGACCTATCAGGAAAAAGTCTG	94
	We4470	CAGACTTTTTCTGATAGGTCTGTTTGCACACCACACTAATGGACAGG	95
E1015C	We4485	CTAGCAACCTGCAGTCTGCGAGGACCCCGTGG	96
	We4486	CCACGGGGTCTCGCAGACCTGCAGGTTGCTAG	97
Q1053C	We4232	CTGCCATAACAACATCATGAAGTGCACGATGGTGGATTCCCTCTG	50
	We4233	CAGGAGGAATCCACCATCGTGCACCTCATGATGTTGTTATGGCAG	51
D1076	We4600	GGATTGCAACAACTGGTCTGCCCTGAACCTTACCTGGACG	98
	We4601	CGTCCAGGTAAGGTTCAAGGCAGACCAGTTTGTGCAATCC	99
E1078C	We4234	CAACAAGCTGGTGGACCCCTGCCATATCTGGATGTCTGC	52
	We4235	GCAGACATCCAGATATGGGCAGGGGTCCACCAGCTTGTTG	53
P1079C	We4604	CAACAACTGGTGCATCCTGAATGCTACCTGGACGTGTGTATCTAC	100
	We4605	GTAGATACACACGTCCAGGTAGCATTGAGGATCGACCAGTTTGTG	101
K1116C	We4519	GCGCTCAGCACGGATGCGTCGTGACATGGCGC	102
	We4520	GCGCCATGTACGACGCATCCGTGCTGAGCGC	103
N1134C	We4525	CCTGCGAGGAACGGTGCCTGCGCGAGAATGGC	104
	We4526	GCCATTCTCGCGCAGGCACCGTTCTCGCAGG	105
E1161C	We4531	CACATGCCAGCATCCCTGCCCCCTGGCTTGTC	106
	We4532	GGACAAGCCAGGGGGCAGGGATGCTGGCATGTG	107
R1204C	We4539	CGAAGTGGCCGGCTGCAGATTGCCTCCGGC	108
	We4540	GCCGGAGGCGAATCTGCAGCCGGCCACTTCG	109

10

20

30

【 0 1 5 0 】

上記のプロトコル及びプラスミドを使用して、そして当業者に公知の（そして例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*、（同書）に記載されるような）分子生物学的技術を適用することにより、他の構築物は、配列番号 2 内のいずれかのアミノ酸残基の変異のために当業者により製造され得る。

40

【 0 1 5 1 】

これらの実施例における半減延長方式として、VWF へのアルブミン融合を選択した。これは接尾辞 - FP により示される。

【 0 1 5 2 】

VWF 及び VWF 変異体のアルブミン融合物を生成するために、リンカー及びアルブミン cDNA 配列の挿入を、WO 2009/156137 に記載される実施例と同様にして行った。

【 0 1 5 3 】

プロペプチド配列を含有しない VWF 変異体を含有する発現カセットの生成のために、

50

上記の変異誘発を、配列番号 5 4 及び 5 5 を有するプライマーを使用して行った。

【 0 1 5 4 】

これにより、シグナルペプチド（配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 2 2 ）が直接 D ' 領域（配列番号 2 のアミノ酸 7 6 4 ）に融合されている V W F 配列を生じる。

【 0 1 5 5 】

以下の表は、散在（scattered）アプローチで V W F D ' D 3 ドメイン中のシステインと交換された残基を記載する：

【 0 1 5 6 】

【表 4】

ヒトフォン・ビルブラント因子中のシステイン残基

S 764	D 853	E 957	T 1064
R 768	R 854	R 960	D 1067
P 770	K 855	I 963	V 1075
K 773	W 856	L 966	D 1076
N 780	I 870	A 969	P 1077
R 782	A 873	V 972	E 1078
G 785	L 876	D 975	P 1079
E 787	D 879	L 978	Y 1080
T 789	K 882	S 981	L 1081
T 791	F 885	L 984	I 1094
Q 793	V 892	T 987	A 1105
N 794	Q 895	E 990	A 1108
Y 795	P 902	D 1000	K 1116
M 800	F 905	Q 1003	W 1120
S 801	L 908	D 1006	A 1123
M 802	N 911	S 1009	N 1134
G 813	S 918	L 1012	N 1138
R 816	R 924	E 1015	R 1145
H 817	I 927	P 1018	E 1161
E 818	E 930	F 1021	K 1181
L 824	E 933	S 1024	E 1185
P 828	L 936	V 1027	P 1193
F 830	G 939	R 1035	R 1204
Q 832	N 942	L 1039	S 1208
E 835	R 945	A 1042	T 1213
P 838	K 948	I 1050	S 1217
T 841	T 951	Q 1053	V 1230
K 843	E 954	V 1056	G 1241

【 0 1 5 7 】

実施例 2 : a 3 ドメイン中にシステイン残基を含む F V I I I 変異体の生成

発現プラスミドにおいてクローンされたいずれかの F V I I I c D N A 配列を使用して、C y s 変異を a 3 ドメインに導入することができる。好ましくは、部分的 B ドメイン欠失を有する 1 本鎖 F V I I I 構築物が使用される（例えば、W O 2 0 0 4 / 0 6 7 5 6 6 を参照のこと）。

【 0 1 5 8 】

F V I I I 発現ベクターを生成するために、F V I I I c D N A を、配列番号 5 6 及び 5 7 のプライマーセットを使用して、当業者に公知の（そして例えば C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y 、 A u s u b e l F

10

20

30

40

50

M e t a l . (e d s .) J o h n W i l e y & S o n s , I n c . ; <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/>に記載されるような) 標準的条件下で、F V I I I c D N A を含有するプラスミドからポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) により増幅し得る。得られた P C R フラグメントを制限エンドヌクレアーゼ N h e I 及び N o t I により消化し、そして N h e I 及び N o t I により直線化された発現ベクター p I R E S p u r o 3 (B D B i o s c i e n c e s , F r a n k l i n L a k e s , N J , U S A) に連結した。得られた発現プラスミドは、C M V プロモーターの下流に F V I I I の c D N A を含有し、そして動物細胞培養における F V I I I 発現に適する。

【 0 1 5 9 】

F V I I I 配列中に変異を導入するために、部位特異的変異誘発 (Q u i c k C h a n g e X L 部位特異的変異誘発キット、A g i l e n t T e c h n o l o g i e s , L a J o l l a , C A , U S A) をキット製造者により勧められるように F V I I I 発現プラスミドに対して適用した。

【 0 1 6 0 】

以下の表は、F V I I I c D N A 配列の変異誘発に使用されたオリゴヌクレオチド及び導入されたそれぞれの変異を記載する。

【 0 1 6 1 】

【表5】

FVIII 変異	記号表示	変異誘発オリゴヌクレオチド配列 (5' →3')	配列番号
T1654C	We4630	GCCACCACAATTCCAGAAAATACTTGCCCTTCAGTCAGATCAAGAGG	110
	We4631	CCTCTTGATCTGACTGAAGGCAAGTATTTCTGGAATTGTGGTGCC	111
Q1656C	We4634	CACAATTCAGAAAATACTACTCTTTGCTCAGATCAAGAGGAAATTGAC	112
	We4635	GTCAATTCCTCTTGATCTGAGCAAAGAGTAGTATTTCTGGAATTGTG	113
D1658C	We4196	CTACTCTTCAGTCATGTCAAGAGGAAATTGACTATGATGATACC	58
	We4197	GGTATCATCATAGTCAATTCCTCTTGACATGACTGAAGAGTAG	59
E1660C	We4640	CTACTCTTCAGTCAGATCAATGCGAAATTGACTATGATGATACCATATC	114
	We4641	GATATGGTATCATCATAGTCAATTCGCATTGATCTGACTGAAGAGTAG	115
D1663C	We4198	CAGTCAGATCAAGAGGAAATTTGCTATGATGATACCATATCAGTTG	60
	We4199	CAACTGATATGGTATCATCATAGCAAATTCCTCTTGATCTGACTG	61
Y1664C	We4200	GATCAAGAGGAAATTGACTGTGATGATACCATATCAGTTGAAATG	62
	We4201	CATTTCAACTGATATGGTATCATCACAGTCAATTCCTCTTGATC	63
D1665C	We4202	GATCAAGAGGAAATTGACTATTGTGATACCATATCAGTTGAAATGAAGAAGG	64
	We4203	CCTTCTTCATTTCAACTGATATGGTATCACAATAGTCAATTCCTCTTGATC	65
D1666C	We4204	GATCAAGAGGAAATTGACTATGATTGTACCATATCAGTTGAAATGAAGAAGG	66
	We4205	CCTTCTTCATTTCAACTGATATGGTACAATCATAGTCAATTCCTCTTGATC	67
S1669C	We4650	GAAATTGACTATGATGATACCATATGCGTTGAAATGAAGAAGGAAGATTTTG	116
	We4651	CAAAATCTTCTTCTTCATTTCAACGCATATGGTATCATCATAGTCAATTC	117
V1670C	We4652	GACTATGATGATACCATATCATGCGAAATGAAGAAGGAAGATTTTGAC	118
	We4653	GTCAAAATCTTCTTCTTCATTTGCGATGATATGGTATCATCATAGTC	119
E1671C	We4206	TGACTATGATGATACCATATCAGTTTGCATGAAGAAGGAAGATTTTGACATTTATG	68
	We4207	CATAAATGTCAAAATCTTCTTCTTCATGCAAATGATATGGTATCATCATAGTCA	69
M1672C	We4608	GATGATACCATATCAGTTGAATGCAAGAAGGAAGATTTTGACATTTATG	120
	We4609	CATAAATGTCAAAATCTTCTTCTTCATTTCAACTGATATGGTATCATC	121
K1673C	We4610	GATACCATATCAGTTGAAATGTGCAAGAAGGAAGATTTTGACATTTATGATG	122
	We4611	CATCATAAATGTCAAAATCTTCTTGCACATTTCAACTGATATGGTATC	123
K1674C	We4612	CCATATCAGTTGAAATGAAGTGCGAAGATTTTGACATTTATGATGAGGATG	124
	We4613	CATCCTCATCATAAATGTCAAAATCTTGCACATTTCAACTGATATGG	125
E1675C	We4208	GATGATACCATATCAGTTGAAATGAAGAAGTGCGATTTTGACATTTATGATGAGG	70
	We4209	CCTCATCATAAATGTCAAAATCGCACTTCTTCATTTCAACTGATATGGTATCATC	71
D1676C	We4210	GATACCATATCAGTTGAAATGAAGAAGGAATGTTTTGACATTTATGATGAGGATG	72
	We4211	CATCCTCATCATAAATGTCAAAACATTCCTTCTTCATTTCAACTGATATGGTATC	73

10

20

30

40

【 0 1 6 2 】

【表 6】

F1677C	We4614	CAGTTGAAATGAAGAAGGAAGATTGCGACATTTATGATGAGGATGAAAATCAG	126
	We4615	CTGATTTTCATCCTCATCATAAATGTCGCAATCTTCCCTTCATTTCAACTG	127
D1678C	We4212	GAAATGAAGAAGGAAGATTTTGCATTTATGATGAGGATGAAAATCAGAGCCC	74
	We4213	GGGCTCTGATTTTCATCCTCATCATAAATGCAAAAATCTTCCCTTCTCATTTTC	75
I1679C	We4294	GAAATGAAGAAGGAAGATTTTACTGTTATGATGAGGATGAAAATCAGAGCCC	76
	We4295	GGGCTCTGATTTTCATCCTCATCATAACAGTCAAAAATCTTCCCTTCTCATTTTC	77
Y1680C	We4214	GAAGAAGGAAGATTTTGCATTTGCGATGAGGATGAAAATCAGAGCC	78
	We4215	GGCTCTGATTTTCATCCTCATCGCAAATGTCAAAAATCTTCCCTTCTTC	79
D1681C	We4616	GAAGAAGGAAGATTTTGCATTTATTGCGAGGATGAAAATCAGAGCCCCC	128
	We4617	GGGGGCTCTGATTTTCATCCTCGCAATAAATGTCAAAAATCTTCCCTTCTTC	129
E1682C	We4216	GGAAGATTTTGACATTTATGATGCGATGAAAATCAGAGCCCCCGCAG	80
	We4217	CTGCGGGGGCTCTGATTTTCATCGCAATCATAAATGTCAAAAATCTTCC	81
D1683C	We4618	GGAAGATTTTGACATTTATGATGAGTGCGAAAATCAGAGCCCCCGCAG	130
	We4619	CTGCGGGGGCTCTGATTTTCGCACTCATCATAAATGTCAAAAATCTTCC	131
E1684C	We4620	GGAAGATTTTGACATTTATGATGAGTGCGAAAATCAGAGCCCCCGCAG	132
	We4621	CTGCGGGGGCTCTGATTTTCGCACTCATCATAAATGTCAAAAATCTTCC	133
N1685C	We4622	GGAAGATTTTGACATTTATGATGAGGATGAATGCCAGAGCCCCCGCAG	134
	We4623	CTGCGGGGGCTCTGGCATTCTCCTCATCATAAATGTCAAAAATCTTCC	135
Q1686C	We4624	GAAGATTTTGACATTTATGATGAGGATGAAAATGCAGCCCCCGCAGC	136
	We4625	GCTGCGGGGGCTGCAATTTTCATCCTCATCATAAATGTCAAAAATCTTC	137
S1687C	We4654	CATTTATGATGAGGATGAAAATCAGTGCCCCCGCAGCTTTCAAAG	138
	We4655	CTTTTGAAGCTGCGGGGGCACTGATTTTCATCCTCATCATAAATG	139
P1688C	We4656	TGATGAGGATGAAAATCAGAGCTGCCGAGCTTTCAAAGAAAAACAG	140
	We4657	CGTGTTCCTTTTGAAGCTGCGGCAGCTCTGATTTTCATCCTCATCA	141

10

20

30

【0163】

上記及びWO 2004/067566に記載されるプロトコル及びプラスミドを使用して、当業者に公知の（そして例えばCurrent Protocols in Molecular Biology、同書に記載されるような）分子生物学的技術を適用することにより、いずれかの他の構築物が、F V I I I の a 3 ドメイン内のいずれかの他のアミノ酸残基の変異のために当業者により作製され得る。

【0164】

以下の表は、第V I I I 因子 a 3、C 1 及び C 2 ドメインにおいてシステインと交換される残基を記載する。

【0165】

40

【表 7】

第 VIII 因子一本鎖におけるシステイン残基

T 1653	E 1675	
T 1654	D 1676	
L 1655	F 1677	
Q 1656	D 1678	
S 1657	I 1679	
D 1658	Y 1680	
Q 1659	D 1681	10
E 1660	E 1682	
E 1661	D 1683	
I 1662	E 1684	
D 1663	N 1685	
Y 1664	Q 1686	
D 1665	S 1687	
D 1666	P 1688	
T 1667	R 1689	
I 1668	I 2098	
S 1669	S 2119	20
V 1670	N 2129	
E 1671	R 2150	
M 1672	P 2153	
K 1673	W 2229	
K 1674	Q 2246	

【0166】

実施例 3 : VWF 由来 C 末端伸長を有する F V I I I 分子のための発現ベクターの生成

そのカルボキシ末端に加えられた VWF ドメイン又はフラグメントを有する F V I I I 分子を、当業者に公知の分子生物学的方法により生成した。これらを使用して VWF - F P と同時トランスフェクトし (c o t r a n s f e c t)、両方のタンパク質の C 末端で C K ドメインを介して共有結合により連結された修飾された F V I I I 及び VWF - F P を含有するヘテロダイマーを生成した。

【0167】

そのために F V I I I cDNA をプライマー

We 4 3 2 3 G T G G C T A G C G C A T G G A A A T A G A G C T C T C C A C

(配列番号 8 2)

We 4 3 2 4 C A C G C G G C C G C G T T A C C G G T G T A G A G G T C C T G

T G C C T C G C (配列番号 8 3)

により増幅し、そして得られた PCR フラグメントを適切な発現ベクター、例えば N h e I 及び N o t I により開かれた p I R E S p u r o 3 (同書) に挿入した。得られた A g e I 及び N o t I 部位を通して、それぞれプライマー対

We 4 2 6 4 G T G A C C G G T A A C T C C A C A G T G A G C T G T C C C (

配列番号 8 4)

We 4 2 6 7 A C A G C G G C C G C T A T C A C T T G C T G C A C T T C C T G

G (配列番号 8 5) 及び

We 4 2 6 5 G T G A C C G G T C A A A G G A A C G T C T C C T G C C C (配列番号 1 4 2)

We 4 2 6 7 A C A G C G G C C G C T A T C A C T T G C T G C A C T T C C T G 50

G (配列番号85)及び

We4266 GTGACCGGTTGCAACGACATCACTGCCAG (配列番号86)

We4267 ACAGCGGCCGCTATCACTTGCTGCACTTCCTG

G (配列番号85)を使用してPCRにより増幅された、VWF由来C末端ドメインC3-C4-C5-C6-CK (VWFアミノ酸2400~2813)、C5-C6-CK (VWFアミノ酸2544~2813)又はCKドメイン単独(VWFアミノ酸2724~2813)のコード配列を挿入した。これにより、それぞれVWF C末端ドメインC3-C4-C5-C6-CK、C5-C6-CK又はCKによりC末端を伸長されたFVIIICDNAを含有する発現ベクターが得られた。

10

【0168】

AgeI制限部位に、FVIIII活性化の間にVWF-FPからFVIIIIを放出する切断可能なリンカー配列を導入した。リンカー配列をFVIIIIのトロンピン切断部位の1つを囲む配列から選択したが、いずれの他のトロンピン切断部位も同様に使用され得る(例えば、WO 03/035861に記載されるとおり)。例として、トロンピン切断部位372及び1689は、以下のcDNA配列により表される:

CS372 (配列番号87): 5' ACCGGTGATGACAACCTCTCCTTCCTTTATCCAAATTCGCTCAGTTGCCAAGAAGCATCCTAAAACTTTGGACCGGT^{3'}

CS1689 (配列番号88): 5' ACCGGTGATGAGGATGAAAATCAGAGCCCCCGCAGCTTTCAAAAAGAAAACACGACACTATTTTATTGCTGCAGTGGAGAGGCTCTGGACCGGT^{3'}

20

これらの配列は、それらの末端にAgeI制限部位を含む適切なPCRプライマーにより増幅され得る。次いでPCRフラグメントはAgeIにより切断されて上記のAgeIにより開かれた発現ベクター中に挿入される。

【0169】

同様のアプローチが、そのBドメイン若しくはその一部がVWF D'D3領域で置き換えられているFVIIII cDNA分子又はVWF D'D3領域がFVIIIIのN末端若しくはC末端へ直接もしくはリンカーを介して接続されているFVIIII cDNA分子を含有する発現プラスミドを構築するために当業者により使用され得る。

30

【0170】

実施例4: CHO細胞におけるVWF変異体の安定な発現のためのプラスミドのトランスフェクション

pIRESneo3に基づく発現プラスミドを、XL10 Gold (Agilent Technologies)で増殖させ、そして標準のプロトコル(Qiagen, Hilden, Germany)を使用して精製した。

【0171】

CHO細胞、好ましくはCHO-K1を、標準的な方法、例えばnucleofection又はリポフェクションを使用してトランスフェクトし、そして所望のVWF-FP変異体を発現している単一クローンを選択した。

40

【0172】

正確なVWFプロペプチド切断のために、プロテアーゼフリン(NM002569.2)をコードする発現プラスミドを、VWFプラスミドと一緒に1:4のモル比(フリン:VWF変異体)で同時トランスフェクトした。

【0173】

実施例5: VWF-FP変異体を発現するCHO細胞のトランスフェクション及びFVIIII変異体の一過性発現

FVIIII変異体発現プラスミドを上記のように精製した。安定なVWF-FP変異体CHOクローン(実施例4)への一過性トランスフェクションを標準的な方法に従って行った。

50

【 0 1 7 4 】

一過性トランスフェクションの収穫を、遠心分離により行って上清から細胞を分離した。上清のアリコートを生成し、そして組み換え産物を特徴づけした。

【 0 1 7 5 】

以下の表は、F V I I I 変異体発現プラスミド（カラム 1）の V W F - F P 変異体を安定に発現する C H O 細胞（カラム 2）への一過性トランスフェクションからの代表的結果を記載する。総 F V I I I 活性に対する共有結合で連結された F V I I I 抗原の比率（カラム 7）又は総 F V I I I 抗原に対する共有結合で連結された F V I I I 抗原の比率（カラム 8）が 1 . 0 に等しいか又はそれより大きくなるように選択され、これを最も好ましい変異体の組み合わせの選択基準として使用した。

10

【 0 1 7 6 】

共有結合で連結された F V I I I 抗原の量を、実施例 6 に記載されるアッセイにより決定し、F V I I I 及び V W F 活性並びに抗原を実施例 9 及び 1 0 に記載されるアッセイにより決定した。

【 0 1 7 7 】

【表 8】

FVIII アミノ酸位置での Cys 残基	VWF アミノ酸位置での Cys 残基	共有結合 FVIII [amU/ml] ¹	FVIII 活性 [mU/ml]	FVIII 抗原 [mU/ml]	VWF 抗原 [mU/ml]	比		FVIII 活性 / FVIII 抗原
						共有結合 FVIII / 総 FVIII 活性	共有結合 FVIII / 総 FVIII 抗原	
1654	1079	409	257	421	12	1,59	0,97	0,61
1654	1134	424	371	495	56	1,14	0,85	0,75
1656	1134	435	981	436	66	0,44	1,00	2,25
1677	1116	1076	649	1361	1208	1,66	0,79	0,48
1679	1079	398	316	349	12	1,26	1,14	0,91
1679	1116	992	889	1171	1400	1,12	0,85	0,76
1681	768	87	58	56	71	1,50	1,55	1,04
1681	1116	1440	2414	646	1405	0,60	2,23	3,74
1682	768	328	156	147	93	2,11	2,23	1,06
1682	1116	488	1424	397	1575	0,34	1,23	3,59
1683	768	2209	543	721	86	4,07	3,07	0,75
1683	1116	1346	3190	767	1475	0,42	1,76	4,16
1684	768	491	467	711	63	1,05	0,69	0,66
1684	1116	1150	2996	752	1548	0,38	1,53	3,98
1684	1134	741	844	236	63	0,88	3,15	3,58
1686	768	506	490	997	75	1,03	0,51	0,49
1686	1015	1639	1360	2568	331	1,21	0,64	0,53
1686	1116	2744	3180	523	1484	0,86	5,24	6,08
1686	1134	693	914	128	71	0,76	5,43	7,16
1687	768	390	271	797	77	1,44	0,49	0,34
1687	1134	843	804	411	65	1,05	2,05	1,95
1688	768	2058	110	968	69	18,75	2,13	0,11
1688	817	367	194	1279	1636	1,89	0,29	0,15
1688	984	1904	777	1974	438	2,45	0,96	0,39
1688	1015	1083	680	2053	390	1,59	0,53	0,33
1688	1116	666	1083	353	1654	0,61	1,89	3,07
1688	1134	650	348	106	62	1,87	6,11	3,27
2129	817	292	285	898	1789	1,02	0,33	0,32

¹ 1 ml あたりの任意ミリ単位

【0178】

実施例 6 : VWF 変異体に共有結合で結合された FVIII 変異体の Elisa による検出

一過性トランスフェクションからの細胞培養上清サンプル (10 ml) を、Amicon Ultracell-30K (Millipore UFC903024; 3000 g 遠心分離) を用いて濃縮した。培養上清 (濃縮物) 中の VWF-FP に共有結合で結合された FVIII を、標準的 ELISA により測定した。手短には、マイクロプレート (捕捉抗体 1 ウェルあたり 100 μL (ウサギ抗ヒト VWF-IgG、Dako A0082 [Dako, Hamburg, Germany]、緩衝液 A で 1:2000 希釈 [Sigma C3041, Sigma-Aldrich, Munich, Germany]) とともに終夜周囲温度でインキュベートした。プレートを緩衝液 B (Sigma T

10

20

30

40

50

9039)で3回洗浄した後、各ウェルを200 μ L緩衝液C(Sigma T6789)とともに1.5時間周囲温度でインキュベートした(ブロッキング)。さらに3回の緩衝液Bでの洗浄工程の後、緩衝液Bでの試験サンプルの段階希釈、さらには共有結合で連結されたFVIIII-VWF-FPの対照製剤の段階希釈、(緩衝液B中2.0~0.03任意U/ml(これらは標準ヒト血漿を使用して決定された標準FVIIII単位に対応しないかもしれないので、我々はこれらを「任意単位」と呼ぶ);1ウェルあたりの体積:100 μ L)を、周囲温度で1.5時間インキュベートした。緩衝液Bでの3回の洗浄工程の後、350mM CaCl₂ 200 μ Lを各ウェルに加え、そして1時間周囲温度でインキュベートした。CaCl₂を(洗浄することなく)除去し、そしてさらに200 μ Lを各ウェルに加え、そしてさらに1時間インキュベートした。緩衝液Bでの3回の洗浄工程の後、検出抗体(に対する検出抗体FVIIII:C、ペルオキシダーゼ標識、Cedarlane CL20035K-D)の緩衝液B中の1:2希釈100 μ Lを各ウェルに加え、そして1時間周囲温度でインキュベートした。緩衝液Bでの3回の洗浄工程の後、基質溶液(OUVF、Siemens Healthcare Diagnostics)100 μ Lを各ウェルに加え、そして15分間周囲温度で暗所にてインキュベートした。100 μ L未希釈停止希釈(undiluted stop dilution)(OSFA、Siemens Healthcare Diagnostics)を加えて、波長450nmでの適切なマイクロプレートリーダーでの読み取りのためのサンプルを準備した。次いで、試験サンプルの濃度を、対照製剤を用いた標準曲線を使用して計算した。

10

20

【0179】

実施例7: ウェスタンブロット及びクーマシー染色による、VWF変異体に共有結合で結合されたFVIIII変異体の検出

あるいは、共有結合複合体を染色又はウェスタンブロット法により検出した。サンプルを、還元又は非還元条件下で変性SDS-PAGE、そしてその後のウェスタンブロットを用いて試験した。FVIIIIの検出のために、社内の(in house)マウス抗FVIIIIモノクローマ抗体混合物、続いてアルカリホスファターゼ結合二次抗マウス抗体(Invitrogen)及びVWF検出のためにHRP標識ポリクローナルウサギ抗ヒトVWF(Fa.Dako P0226)抗体を使用した。

【0180】

図8は、非還元SDS-PAGEからの上記の2つの方式による、rVWF-FPダイマーに共有結合で連結されたFVIIII(FVIIII-SingleChain)のウェスタンブロット分析を示す。Aは抗FVIIII抗体を使用して検出され、Bは抗VWF抗体を使用して検出された。レーン1は、そのC末端に加えられたVWF由来C3-C4-C5-C6-CK配列及びFVIIIIとC3-C4-C5-C6-CK配列との間のさらなるトロンピン切断部位によりFVIIII部分がVWF-FPダイマーに連結されている連結された物質を表す。これは、実施例8に記載される特異的EliSaにより測定した共有結合FVIIIIの、総FVIIII活性に対する比5.78及び総FVIIII抗原に対する比7.47を有していた。460kDaより上の高分子量帯を、抗FVIIII抗体及び抗VWF抗体の両方により可視化し、そして共有結合で連結されたFVIIII-VWF-FP複合体の存在を実証した。Mは分子サイズマーカーを示す。レーン2及び3は、それぞれFVIIII-SC及びVWF-FPの対照製剤を表す。

30

40

【0181】

レーン4及び5は、それぞれCys変異によりFVIIII a3ドメインとVWF-FPD3ドメインとの間のジスルフィド架橋により連結された共有結合複合体を表す。レーン4は、VWF-FPE1078C変異体上のFVIIII-SCI1679C変異体を表す。レーン5はVWF-FPE1078C変異体上のFVIIII-SCI1675C変異体を表す。レーン6は、VWF-FP変異体E1078Cのみを含有する対照製剤である。プロットは、遊離FVIIII分子のほかに互いに共有結合で連結された高分子量FVIIII-VWF-FP複合体の存在を実証する。

50

【0182】

図9は、Gelcode Blue Stain試薬で染色された還元SDS-PAGEを示す。レーン1はrVWF-FPダイマーに共有結合で連結された精製FVIIII (FVIIII - 一本鎖) を含有し、レーン2は、平行してFVIIIIを活性化しながらリンカー配列において共有結合で連結したFVIIII部分を放出するトロンビン消化後の同じ製剤を示す。レーン1の帯は共有結合複合体及びFVIIIIダイマーを表し、268と460kDaのマーカの間レーン2における顕著なバンドはVWF-FP部分を表すが、71kDaの下の範囲におけるバンドはFVIIIIフラグメントを表す。

【0183】

実施例8： FVIIIIのVWFへの化学的架橋

FVIIIIを、好ましくは生理的NaCl及びCaCl₂濃度を含有する緩衝水溶液中で好ましくは4と37との間の一定の温度で、500Daと100kDaとの間の分子量を有する二重特異的ビス-スクシンイミドエステル(PEG)_nと、2:1~1:1000(好ましくは約1:1)のFVIIIIと架橋剤とのモル比で反応させる。FVIIII濃度は、好ましくはそれ自身とのFVIIIIの架橋を最少にするために低い。1分から60分の期間の後、半減期延長VWFを、VWFの単量体ビルディング単位に基づいて2:1~200:1のモル過剰でFVIIII溶液に加えた。上に示した温度で1~300分の期間インキュベートした後、残留試薬を、好ましくは第一級アミノ基を含有する低分子量化合物を使用してクエンチし、そしてFVIIII及びVWFの共有結合複合体を、この分野の専門家に公知の方法により精製し、未反応のFVIIII又はFVIIIIのオリゴマー及び未反応のVWFを除去した。所望の共有結合複合体の含有量を最大にし、かつ副生成物の含有量を最少にすることを目的として、異なるインキュベーション工程についての反応時間及び温度を、この分野の専門家に公知の方法により、例えば抗FVIIII抗体又は抗VWF抗体を用いてSDS-PAGE/ウェスタンブロット分析を使用することにより最適化した。

【0184】

修飾されたFVIIII及びVWF分子の化学的架橋のために様々な試薬が使用され得る。これらは、FVIIII及びVWFの異なる反応性基の架橋に基づく：

- a) アミン-アミン架橋剤(例えば、ビス-イミドエステル(PEG)_n又はビス-スクシンイミドエステル(PEG)_n)
- b) カルボキシル-カルボキシル架橋剤
- c) スルフヒドリル-スルフヒドリル架橋剤(例えば、ビス-マレイミド(PEG)_n)
- d) 炭水化物-炭水化物架橋剤
- e) アミン-スルフヒドリル架橋剤
- f) スルフヒドリル-炭水化物架橋剤
- g) スルフヒドリル-ヒドロキシル架橋剤
- h) カルボキシル-アミン架橋剤

【0185】

実施例9： 第VIIII因子活性及び抗原の分析

インビトロでのFVIIII:Cの活性測定のために、凝固アッセイ(例えば、Dade Behring、Germanyにより供給されるPathromtin SL試薬及びFVIIII欠乏血漿)又は発色アッセイ(例えば、Haemochromにより供給されるCoamatic FVIIII:Cアッセイ)のいずれかを使用した。これらのアッセイを製造者の指示に従って行った。

【0186】

FVIIII抗原(FVIIII:Ag)を標準的ELISAにより測定した。手短には、マイクロプレートに、1ウェルあたり100µLの捕捉抗体(ヒツジ抗ヒトFVIIII IgG、Cedarlane CL20035K-C、緩衝液A[Sigma C3041]中1:200希釈)とともに2時間周囲温度でインキュベートした。プレートを緩衝

10

20

30

40

50

液B (Sigma P3563) で3回洗浄した後、サンプル希釈緩衝液 (Cedarlane) 中の試験サンプルの段階希釈、さらにはサンプル希釈緩衝液中のFVIIII製剤の段階希釈 (CSL Behring; 200~2mU/mL) (1ウェルあたりの体積: 100 μ L) を2時間周囲温度でインキュベートした。緩衝液Bを用いた3回の洗浄工程の後、検出抗体 (ヒツジ抗ヒトFVIIII IgG, Cedarlane CL20035K-D、ペルオキシダーゼ標識) の緩衝液B中の1:2希釈100 μ Lを各ウェルに加え、そしてさらに1時間周囲温度でインキュベートした。緩衝液Bを用いた3回の洗浄工程の後、基質溶液 (1:10 (体積/体積) TMB OUVF: TMB緩衝液 OUVG, Dade Behring) 100 μ Lをウェルごとに加え、そして30分間周囲温度で暗所にてインキュベートした。停止溶液 (Dade Behring, OSFA) 100 μ Lを加えて、波長450nmにて適切なマイクロプレートリーダーでの読み取りのためのサンプルを調製した。次いで、試験サンプルの濃度を、参照としてFVIIII製剤を用いた標準曲線を使用して計算した。

10

【0187】

実施例10: VWF活性及び抗原の分析

サンプルを、VWF:Agの免疫比濁 (immunoturbidimetric) 測定 (OPAB03, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) により、そしてコラーゲン結合 (Technozym VWF: CBA ELISA, Ref. 5450301, 較正セット5450310及び対照セット5450312, Technoclone, Vienna, Austria) を用いて) について製造者により記載されるように分析した。

20

【0188】

VWF:RCO試験を、製造者の記載に従ってSiemens Healthcare Diagnostics, Marburg, GermanyのBC VWF試薬を使用して行った。国際濃縮標準 (International Concentrate Standard) を一次標準製剤として使用して日常的な使用のための社内標準製剤を較正した。

【0189】

薬物動態分析のために、VWF抗原を標準的ELISAにより測定した。手短には、マイクロプレートを、1ウェルあたり100 μ Lの捕捉抗体 (ウサギ抗ヒトvWF-IgG, Dako A0082 [Dako, Hamburg, Germany], 緩衝液A [Sigma C3041, Sigma-Aldrich, Munich, Germany] 中で1:2000希釈) とともに周囲温度で終夜インキュベートした。プレートを緩衝液B (Sigma P3563) で3回洗浄した後、各ウェルを、200 μ L緩衝液C (Sigma P3688) とともに1.5時間周囲温度でインキュベートした (ブロッキング)。緩衝液Bを用いたさらに3回の洗浄工程の後、緩衝液B中の試験サンプルの段階希釈、さらには緩衝液B中の標準ヒト血漿の段階希釈 (ORKL21; 20~0.2mU/mL; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) (1ウェルあたりの体積: 100 μ L) を1.5時間周囲温度でインキュベートした。緩衝液Bを用いた3回の洗浄工程の後、検出抗体 (ウサギ抗ヒトvWF-IgG, Dako P0226、ペルオキシダーゼ標識) の緩衝液B中の1:16000希釈100 μ Lを各ウェルに加え、そして1時間周囲温度でインキュベートした。緩衝液Bでの3回の洗浄工程の後、基質溶液 (OUVF, Siemens Healthcare Diagnostics) 100 μ Lをウェルごとに加え、そして30分間周囲温度で暗所にてインキュベートした。未希釈の停止希釈 (OSFA, Siemens Healthcare Diagnostics) 100 μ Lを加えて、波長450nmでの適切なマイクロプレートリーダーにおける読み取りのためのサンプルを調製した。次いで試験サンプルの濃度を、参照として標準ヒト血漿を用いて標準曲線を使用して計算した。

30

40

【0190】

50

実施例 11 : VWF マルチマー分析

VWF マルチマー分析を、近年記載されたように (Tatewaki et al., Thromb. Res. 52: 23-32 (1988)、及び Metzner et al., Haemophilia 4 (Suppl. 3): 25-32 (1998)) 少し変更して SDS-アガロースゲル電気泳動により行った。手短には、ランニングバッファで平衡化した後、使用準備のできた 1% アガロースミニゲル (BioRad) を使用して、可能な限りこの方法を標準化した。同程度の量の VWF 抗原を SDS-アガロースゲルでの電気泳動にかけた。ウェスタンブロット後に、タンパク質のバンドを、抗 VWF 抗体、抗 FV III 抗体又は抗アルブミン抗体、続いてアルカリホスファターゼ標識抗 IgG 抗体 (SIGMA、製品番号 1305) を使用して検出し、そして色反応を濃度測定により定量した。

10

【0191】

共有結合 FV III - SC / VWF - FP マルチマー複合体の 2 つの製剤を、マルチマーゲル分析により分析した。図 10 のレーン 2 及び 3 は、FV III 部分が、FV III と C3 - C4 - C5 - C6 - CK 配列との間にさらなるトロンピン切断部位を含むその C 末端に加えられた VWF 由来 C3 - C4 - C5 - C6 - CK 配列により VWF - FP マルチマーに連結されている物質を表す (実施例 3)。レーン 1 は血漿由来 VWF、レーン 4 は VWF - FP を表す。結果は、共有結合 FV III / VWF - FP 複合体が、WF - FP 又は天然 VWF と同様の程度まで確かに多量体化するということを実証する。さらなるバンドは、1 つ又はそれ以上の共有結合 FV III 分子の付加を表す。抗 VWF 抗体により検出された大部分のマルチマーバンド (A) はまた抗 FV III でも染色することができ (B)、共有結合 FV III / VWF - FP マルチマーを実証する。

20

【0192】

実施例 12 : 共有結合で連結された FV III / VWF - FP 複合体の精製

共有結合で連結された FV III / VWF - FP ダイマー複合体を含有する細胞培養上清を、0.2 μm フィルターを通して滅菌ろ過し、そして 30 kDa UF ユニット (Centramate™, Pall) で 20 倍まで濃縮した。共有結合で連結した FV III / VWF - FP マルチマー複合体を含有する細胞培養上清を、0.2 μm フィルターを通して滅菌ろ過し、そして Cadence™ 使い捨てインライン濃縮器 (30 kDa カットオフ, Pall) を用いて濃縮した。次いでこの物質を、平衡緩衝液 (EB、20 mM Tris pH 7.0) で平衡化したヒトアルブミン捕捉選択カラム (BAC) にアプライした。カラムを EB で洗浄し、そして FV III / VWF - FP 複合体を EB 中 2 M MgCl₂ で溶出した。溶出ピークをプールし、そして少し変更して McCue et al., 2009; J. Chrom. A, 1216 (45): 7824-30 に記載されるように、50 mM HEPES、400 mM CaCl₂、50 mM NaCl、pH 7 を含有する SEC HiPrep Sephacryl S-500 高分解能 (GE Healthcare) のランニングバッファに対して透析した。次いでこの物質を予め平衡化した SEC HiPrep Sephacryl S-500 高分解能 (GE Healthcare) にアプライし、そしてサイズにより分離した後、共有結合により連結された FV III / VWF - FP を含有するフラクションのみをプールし、そして SEC HiPrep Sephacryl S-500 高分解能 (GE Healthcare)。このプールを 1.7 mM CaCl₂、10 mM L-His、308 mM NaCl、8.76 mM ショ糖、0.01% Tween 80、pH 7 に対して透析した。最後にこの物質をアリコートで凍結した。

30

40

【0193】

あるいは、特定の構築物については、V III 選択カラム (GE Healthcare) により、ヒトアルブミン捕捉選択カラムよりも良好な精製結果が得られ得る。このような場合、細胞培養上清濃縮物を予め平衡化された V III 選択カラム (GE Healthcare) にアプライし、そして平衡化緩衝液 (10 mM HEPES、5 mM CaCl₂、150 mM NaCl、0.03% Tween 80 pH 7) で洗浄した

50

後、高塩濃度 (1 M NaCl) の平衡化緩衝液で洗浄し、次いで再び平衡化緩衝液で洗浄する。F V I I I / V W F - F P 複合体を、20 mM L - H i s、5 mM CaCl₂、150 mM NaCl、60%エチレングリコール、0.03% Tween 80、pH7で溶出した。溶出ピークをプールし、そして50 mM H E P E S、400 mM CaCl₂、50 mM NaCl、pH7を含有するその後のS E Cカラムのランニングバッファに対して透析した。次いでこの物質を、予め平衡化したS E C H i P r e p S e p h a c r y l S - 500高解像度 (G E H e a l t h c a r e) カラムにアプライした。共有結合で連結されたF V I I I / V W F - F Pを含有するフラクションをプールした。このプールを、1.7 mM CaCl₂、10 mM L - H i s、308 mM NaCl、8.76 mMシヨ糖、0.01% Tween 80、pH7に対して透析した。最後に、この物質をアリコートで凍結した。

10

【0194】

実施例13: F V I I I 欠損マウス及びラットにおける共有結合で連結されたF V I I I / V W F 複合体の薬物動態分析。

F V I I I / V W F 複合体を、F V I I I 欠損マウス (1物質あたり12匹のマウス) に100 IU (F V I I I : A g) / 体重1 kgの用量で静脈内投与した。血液サンプルを、交互サンプリングスキームを使用して適切な間隔で採取し、3動物/時点 (サブセット1番についてt = 0分及び16時間、サブセット2番について5分及び24時間、サブセット3番について2時間及び4時間、そしてサブセット4番について8時間及び32時間) からサンプルを得た。このスキームは、定量しようとする血漿濃度に対する血液サンプリングの潜在的効果を最少にするよう設計されている。血液を処理して血漿にし、そして分析まで急速冷凍した。その後、F V I I I 及びV W F 抗原含有量を特異的E L I S A アッセイ (実施例7、9及び10を参照のこと) により定量した。処置群の平均値を使用して、5分後のインビボ回収を計算した。式 $t_{1/2} = \ln 2 / k$ に従って排出のベータ期の時点を使用して半減期を計算したが、kは回帰線の傾きである。通常、抗原を薬物動態研究における基準として使用した。抗原及び機能的活性は相関すると予測される。

20

【0195】

F V I I I / V W F 複合体を、麻酔をかけたC D / L e w i s ラット (物質あたり6匹のラット) に100 IU (V W F : A g) / 体重k gの用量で静脈投与した。交互サンプリングスキームを使用して試験物質の適用の5分後に開始して適切な間隔で血液サンプルを採取し、3動物/時点からサンプルを得た (サブセット番号1についてt = 0、5、30、90分、4時間、1日、そしてサブセット番号2について0、15分、1、2、8時間及び2日)。このスキームは、定量しようとする血漿濃度に対する血液サンプリングの潜在的影響を最少にするように設計される。血液を処理して血漿にし、そして分析まで急速冷凍して貯蔵した。その後、F V I I I 及びV W F 抗原含有量を特異的E L I S A (上記参照) により定量した。処置群の平均値を使用して、5分後のインビボ回収を計算した。。式 $t_{1/2} = \ln 2 / k$ に従って排出のベータ期の時点を使用して半減期を計算したが、kは回帰線の傾きである。通常、測定からの動物における固有のF V I I I 活性のバックグラウンドを排除するために、抗原を正常動物における薬物動態研究における基準として使用した。抗原及び機能的活性は相関すると予測される。

30

40

【0196】

V W F C 3 ~ C 6 及びC K ドメインが切断可能なリンカーを介してそのカルボキシ末端へと結合された1本鎖F V I I I 配列及びアルブミン融合V W F からなる共有結合F V I I I / V W F - F P 製剤 (実施例3に記載されるとおり) を、ラットP K モデルにおけるそれらの半減期について試験した。図11は、組み換えF V I I I (A d v a t e、Aにおける四角)、V W F - F P (Bにおける四角) 及び血漿由来F V I I I - V W F 複合体 (H a e m a t e、三角) と比較した、共有結合複合体 (丸、図説明文においてF V I I I - C K + V W F - F P と称される) の排出動態を示す。AはF V I I I データを示し (共有結合複合体は、実施例6に記載されるような特異的E l i s a により測定される; 全ての他の化合物はF V I I I E l i s a により測定した)、BはV W F E l i s a

50

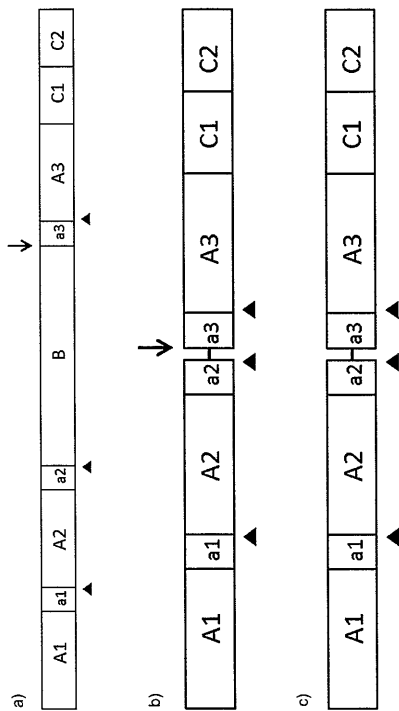
のデータを示す。共有結合構築物の排出動態は、両方の部分が共有結合で結合されている場合に期待されるように、F V I I I 及び V W F 抗原が測定された場合に同様であった。F V I I I 抗原についての終末相半減期を 7 . 9 時間と計算し、V W F の終末相半減期を 7 . 8 時間と計算した。驚くべきことに、V W F - F P 対照 (V W F 抗原) について計算された終末相半減期は非常に類似して 8 . 1 時間であった。クリアランス速度もまた共有結合複合体について 9 . 8 I U / m L / 時間、そして V W F - F P について 1 0 . 1 I U / m L / 時間と類似していた。r F V I I I (A d v a t e) の半減期を 2 . 5 時間と計算し、これは遊離 F V I I I の約 3 倍の共有結合複合体の半減期延長を生じるだろう。

【 0 1 9 7 】

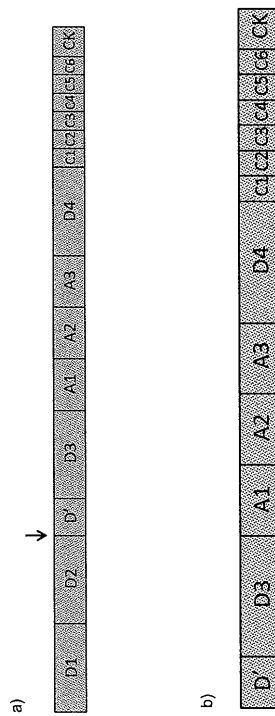
これらの結果は、半減期を延長された V W F 分子への F V I I I 配列の共有結合が、F V I I I 分子の半減期を有意に、かつ非融合半減期延長 V W F 分子の半減期と似た程度まで実際に延長するというを示す。

10

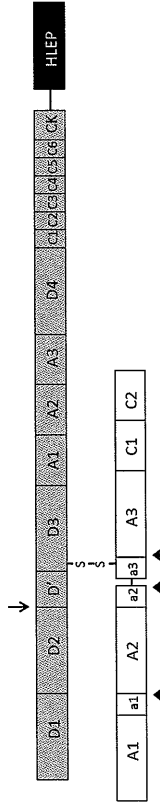
【 図 1 】



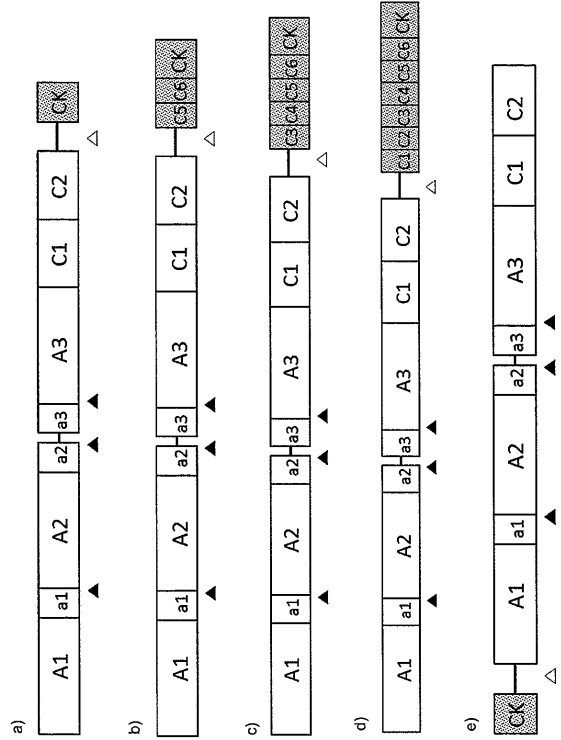
【 図 2 】



【 図 3 】

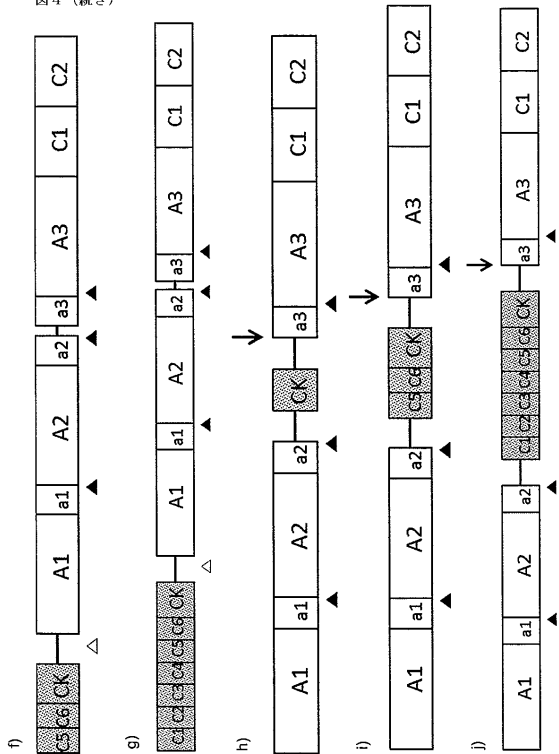


【 図 4 - 1 】



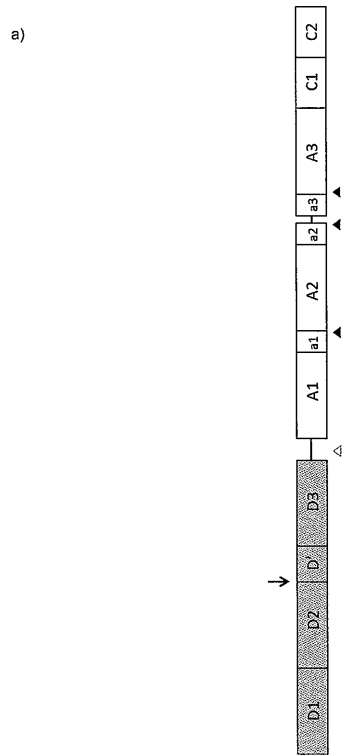
【 図 4 - 2 】

図 4 (続き)



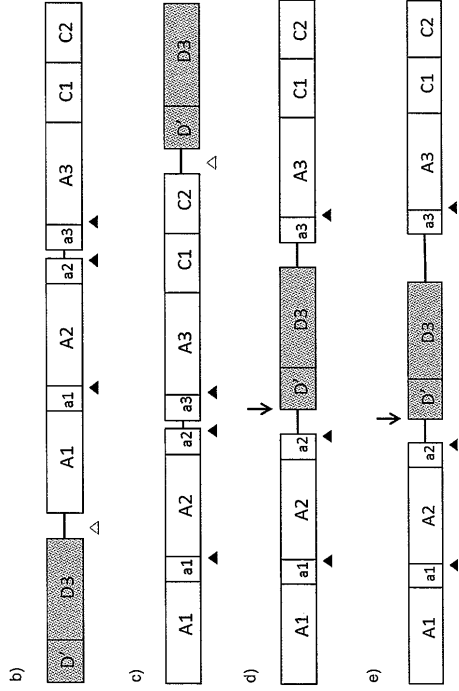
【 図 5 - 1 】

図 5 (VWFの1つ又はそれ以上のDドメインで修飾されたFVIII)



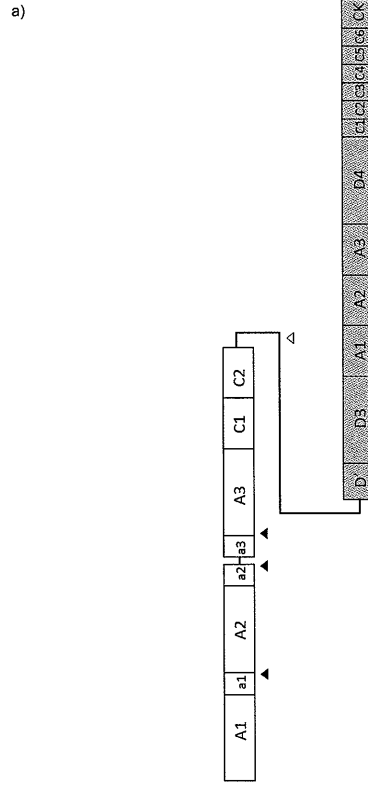
【 5 - 2 】

図5 (続き)



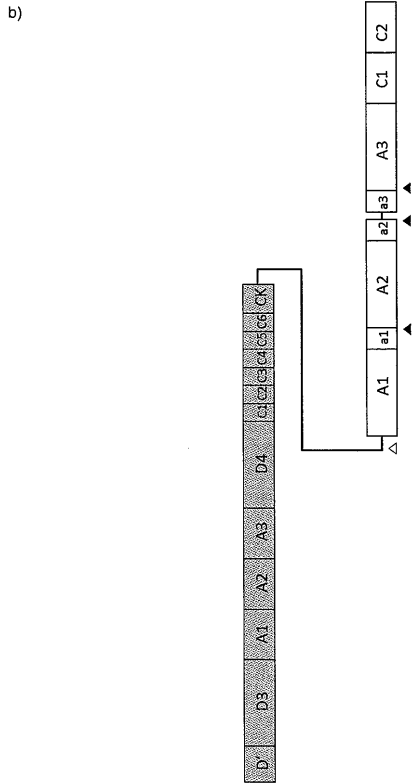
【 6 - 1 】

図6 : さらなるVWFドメインにより修飾されたFVIII



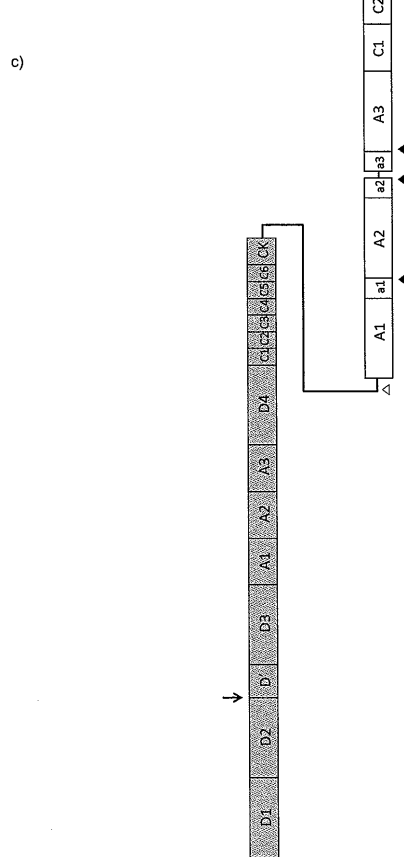
【 6 - 2 】

図6 (続き)

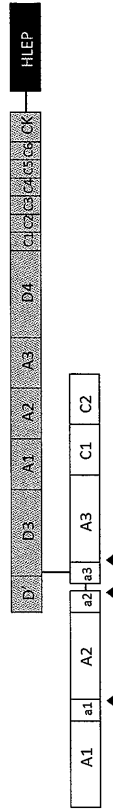


【 6 - 3 】

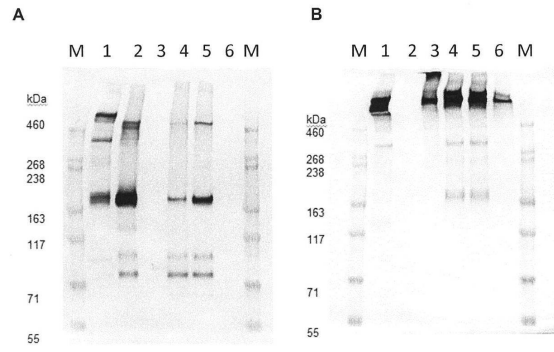
図6 (続き)



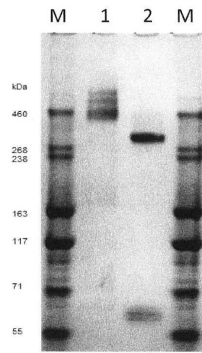
【 図 7 】



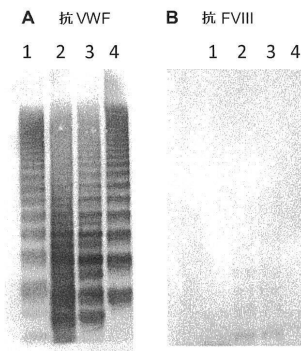
【 図 8 】



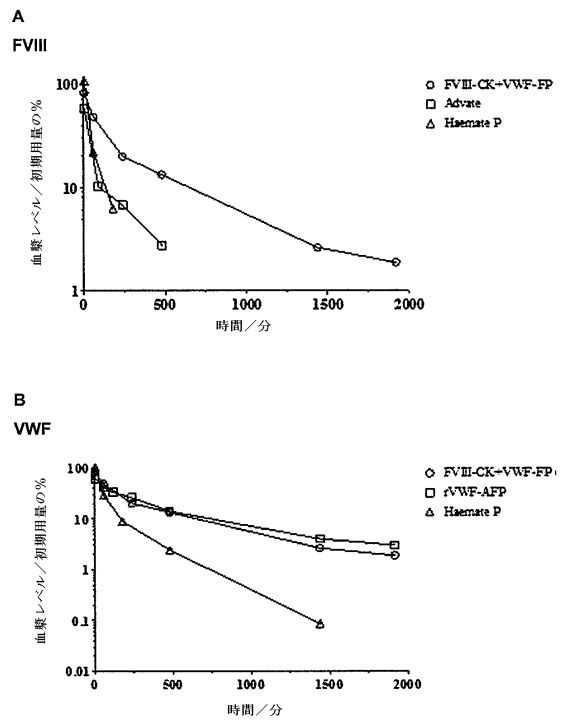
【 図 9 】



【 図 10 】

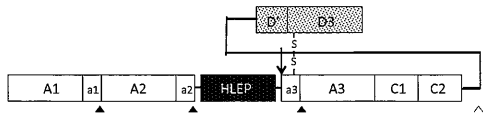


【 図 11 】

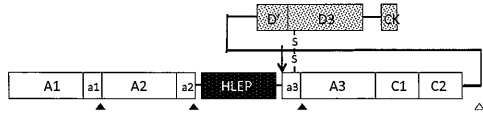


【 1 2 - 1 】

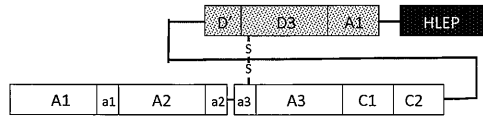
a)



b)

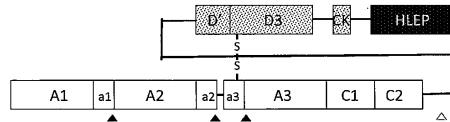


c)

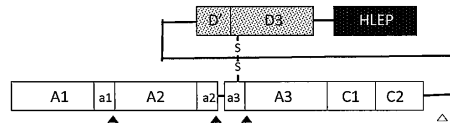


【 1 2 - 2 】

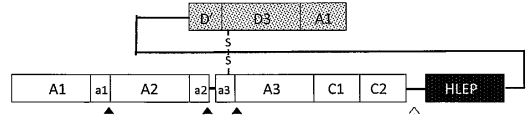
d)



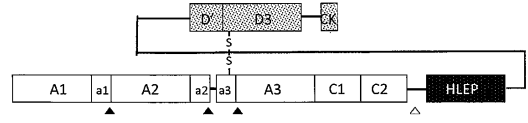
e)



f)

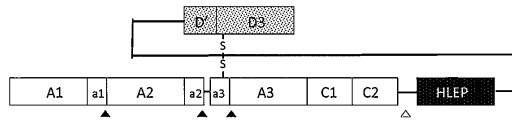


g)

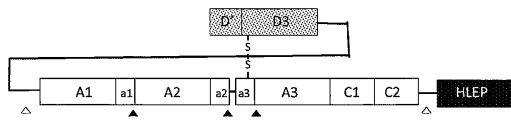


【 1 2 - 3 】

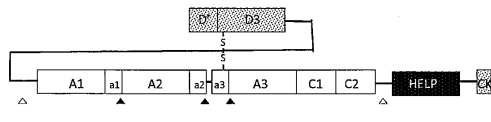
h)



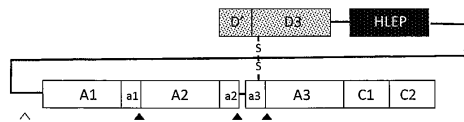
i)



j)

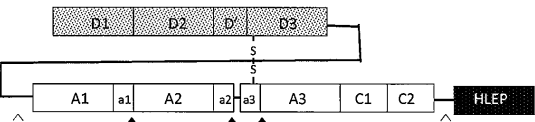


k)

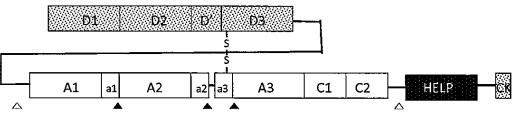


【 1 2 - 4 】

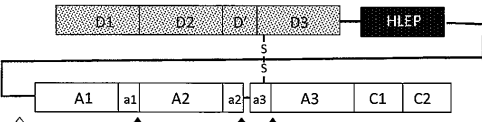
l)



m)



n)



【配列表】

0006474386000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 38/37 (2006.01) A 6 1 K 38/37
A 6 1 P 7/04 (2006.01) A 6 1 P 7/04
C 1 2 N 15/62 (2006.01) C 1 2 N 15/62 Z

(72)発明者 トーマス・ヴァイマー
ドイツ連邦共和国35075グラードンバッハ・リヒャルト・ヴァーグナー・シュトラッセ8

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 米国特許第04970300(US,A)
特表2011-525363(JP,A)
国際公開第2011/101242(WO,A1)
Blood, 2012年, Vol.120, No.2, p.449-458

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 1/00 - 15/90
C07K 1/00 - 19/00
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
UniProt/GeneSeq
PubMed