

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6431541号
(P6431541)

(45) 発行日 平成30年11月28日(2018.11.28)

(24) 登録日 平成30年11月9日(2018.11.9)

(51) Int.Cl.

F 1

C 07 K	14/81	(2006.01)	C 07 K	14/81	Z N A
C 12 N	15/15	(2006.01)	C 12 N	15/15	
C 12 N	1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15	
C 12 N	1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	
C 12 N	1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	

請求項の数 10 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-538525 (P2016-538525)
(86) (22) 出願日	平成26年12月15日 (2014.12.15)
(65) 公表番号	特表2017-505114 (P2017-505114A)
(43) 公表日	平成29年2月16日 (2017.2.16)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2014/077783
(87) 國際公開番号	W02015/086854
(87) 國際公開日	平成27年6月18日 (2015.6.18)
審査請求日	平成29年12月14日 (2017.12.14)
(31) 優先権主張番号	1322091.8
(32) 優先日	平成25年12月13日 (2013.12.13)
(33) 優先権主張国	英國 (GB)

早期審査対象出願

(73) 特許権者	500341551 ケンブリッジ エンタープライズ リミテ ィッド イギリス国 シービー2 1ティーエヌ ケンブリッジ トリニティ レーン ジ オールド スクールズ
(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝國際特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】出血性障害の治療に対する改変セルピン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 配列番号 1 2 の残基 2 5 ~ 4 1 8 のアミノ酸配列；
 (i i) 配列番号 1 2 の残基 2 5 ~ 4 1 8 のアミノ酸配列であり、残基 2 5 6 における C から S への変異を有する；
 (i i i) 配列番号 1 2 の残基 2 5 ~ 4 1 8 のアミノ酸配列であり、残基 2 5 における E から S への変異を有する；又は
 (i v) 配列番号 1 2 の残基 2 5 ~ 4 1 8 のアミノ酸配列であり、残基 2 5 における E から S への変異、及び残基 2 5 6 における C から S への変異を有する
 を含む、改変セルピン。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の改変セルピンをコードする核酸。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の改変セルピンをコードする核酸を含むベクター。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の改変セルピンを発現するベクターを含む組換え細胞。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の改変セルピン、及び薬学的に許容可能な賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 6】

ヒト又は動物の身体の治療用である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

10

20

【請求項 7】

個体における出血の治療用若しくは予防用、又は止血の促進用である、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記個体が出血性障害を有する、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記出血性障害が血友病である、請求項8に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記個体が外傷患者である、請求項7に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】**【0001】**

本発明は、変更された特異性を有する改変セルピン分子、特に活性化プロテインC（A P C）等の抗凝固性プロテアーゼに対する特異性を増すように改変されたセルピン分子に関する。

【背景技術】**【0002】**

血友病は出血性障害であり、循環血漿 f V I I I (血友病 A 、 H A) 又は f I X (血友病 B 、 H B) の欠乏によって引き起こされる (非特許文献 1 で再考される) 。これにより、生得的なテナーゼ (X a s e) の活性を減少することで組織傷害が生じた場合に產生されるトロンビンの量が減少する。これにより、傷害後の制御されていない出血、また関節及び軟組織への自然発生的な出血が起こる。

20

【0003】

血友病にはおよそ 5 0 0 0 人に 1 人が罹患する。世界血友病連盟の世界的調査で特定された 1 7 0 0 0 0 人の患者は、健康負荷 (the global health burden) の過小評価である (非特許文献 2) 。治療費は非常に高額で、治療は頻回で生涯に亘る。

【0004】

血友病の標準的な治療は、組換え又は血漿に由来する因子のいずれかを使用する影響を受けた凝固因子の置き換えを必要とする (非特許文献 3 及び特許文献 4 において再考される) 。しかしながら、この方法で治療された患者はかなりの割合で補充された凝固因子に対して阻害抗体を発現し、治療を無効にする (非特許文献 5 において再考される) 。治療された血友病の患者の 3 0 % においてインヒビターが発生する (非特許文献 6 において再考される) が、治療されていないインヒビター患者における高い死亡率、及び第 V I I I 因子の補充療法を利用することができない多くの国におけるインヒビターの低い普及率のため全体的な推定は低い。従来の治療法の別の欠点は費用であり、また注入された凝固因子の短い半減期のため頻繁な治療を必要とすることである (非特許文献 7 において再考される) 。

30

【0005】

患者が阻害抗体を発現する場合、バイパス止血剤 (bypassing agent) を出血事象の治療に対して使用する (非特許文献 8 において再考される) 。バイパス止血剤は、冒された凝固因子を直接供給せずに出血を減少し、すなわちバイパス止血剤はテナーゼ複合体の活性を「バイパス」する。現在のバイパス止血剤の例として、組換え f V I I a 及びプロトロンビン複合体濃縮物である F E I B A (Factor Eight Bypassing Activity : 第 V I I I 因子バイパス止血活性) が挙げられる。これらの補充治療は非常に高額であり (非特許文献 9 、非特許文献 10 、非特許文献 11 、非特許文献 12) 、両製品の短い半減期のため従来の治療法よりも更に頻繁に高用量で与えられる必要がある (非特許文献 13 において再考される) 。さらに、患者の応答は変動的であり、予測不可能であることが示された (非特許文献 14 において再考される) 。

40

【0006】

さらに、因子濃縮物の短い半減期は、血友病の標準的な補充療法を最適以下にする。

50

10
これは、第VII因子が12時間未満の半減期を有することから、血友病Aにおいて特に明白である。その結果として、血友病A及びBの両方に対する治療の利用可能性にもかかわらず、出血率は血友病Aでより高く、慢性血友病性関節症において更に一般的である。これは、第VII因子の短い半減期、その結果として第VII因子の止血レベルの維持が困難であることに関連する可能性がある（非特許文献15）。治療の全国的な報告において、インヒビターを有しない重篤な血友病Aの患者における年間出血頻度は、血友病Bの患者における9に比べて14であった（非特許文献16）。筋骨格手術の必要性は、血友病Aの患者において3倍高かった。Tagarielloらは、血友病Aの患者は、血友病Bの患者より3倍も頻繁に関節置換を必要とすることを見出した（非特許文献17）。Loweらは、血友病Aの患者は血友病Bと比較して3倍に及ぶ頻繁な入院が必要であったことを見出した（非特許文献18）。

【0007】

したがって、血友病等の出血性障害の現在の治療には様々な欠点がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Bolton-Maggs & Pasi, 2003

【非特許文献2】World Federation of Hemophilia, 2011

【非特許文献3】Mannucci, 2003

【非特許文献4】Mannucci, 2008

20

【非特許文献5】Brettler, 1996

【非特許文献6】Teitel & Sholzberg 2013

【非特許文献7】Lee et al, 2006

【非特許文献8】Negrier et al, 2006

【非特許文献9】Bohn et al, 2004

【非特許文献10】Di Minno et al, 2010

【非特許文献11】Gringeri et al, 2003

【非特許文献12】Escobar, 2010

【非特許文献13】Haya et al, 2007

【非特許文献14】Berntorp, 2009

30

【非特許文献15】Escobar and Sallah 2013

【非特許文献16】Nagel, et al 2011

【非特許文献17】Tagariello, et al 2009

【非特許文献18】Lowe and Ludlam 2008

【発明の概要】

【0009】

40
本発明者らは、反応中心ループ（RCL）内の残基の改変によってセルピン分子の特異性を操作することができるることを認識し、抗凝固性プロテアーゼに対する特異性が増した改変セルピン分子を同定した。これらの改変セルピン分子は、治療法、例えば出血の治療に有用な可能性がある。

【0010】

本発明の態様は、改変セルピンであって、その反応中心ループ（RCL）の残基P4、P2、P1及びP1'のうちの1つ又は複数に変異を有する、改変セルピンを提供する。

【0011】

本発明の別の態様は、改変セルピンであって、その反応中心ループ（RCL）の残基P1'及び残基P2うちの一方又は両方と、任意に残基P4及び/又は残基P1とに変異を有する、改変セルピンを提供する。

【0012】

前記変異はトロンビンの阻害に関する活性化プロテインCの阻害を増大する場合がある。
。

50

【0013】

また、上記変異は、 $fVIIa$ 、 $fIXa$ 、 fXa 及び $fXIa$ 等の他の凝固性プロテアーゼの阻害に関連する活性化プロテインCの阻害を増大する場合がある。

【0014】

本発明の他の態様は、出血、例えば、遺伝性出血性障害及び外傷、手術を含む後天性出血を伴う患者並びに抗凝固療法を受ける患者における出血の治療に対する、本明細書に記載される改変セルピンの使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】凝固カスケード及びこのカスケードにおけるセルピンの調節的役割を示す図である。 10

【図2】21残基のN末端トランケーション（N末端残基は、成熟タンパク質の残基1としてプロペプチドの残基1を数えた場合、野生型配列のA22である）を有し、RCR内のP2位及びP1'位にK残基を有する（A22 P2KP1'K PCI）、プロテインCインヒビター（PCI）の組織因子経路（外因系）による凝固に対する効果を判定するためのプロトロンビン時間（PT）アッセイの結果を示す図である。3つの別々の血漿に由来するプールされた正常な血漿を、PCIなし（黒色棒グラフ、-）又は5μM A22野生型（WT）PCI（灰色棒グラフ、WT）又は5μM A22 P2KP1'K PCI（白色棒グラフ、P2KP1'K PCI）のいずれかとインキュベートした。

外因系経路による凝固を開始するため凝固をPT試薬の添加によって開始し、凝固塊が形成されるまでの時間を測定した。上記アッセイを3回行い、エラーバーは標準偏差を示す。2倍希釈した血漿を使用して、凝固のインヒビターに対するアッセイの感度を上げた。A22 P2KP1'K PCIはこのプロトロンビン時間（PT）アッセイにおける凝固に対して何の効果も有しない。この結果は、TF : $fVIIa$ 、トロンビン、及び他の凝固原プロテアーゼのA22 P2KP1'K PCIによる顕著な阻害がないことを示す。 20

【図3】接触活性化経路（内因系）による凝固に対するA22 P2KP1'K PCIの効果を判定するための活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）アッセイの結果を示す。図3Aは、PCIなし（黒色棒グラフ、-）又は5μM A22野生型（WT）PCI（灰色棒グラフ、WT）又はA22 P2KP1'K PCI（白色棒グラフ、P2KP1'K PCI）のいずれかとインキュベートした3つの別々の血漿に由来するプールされた正常な血漿を示す。aPTT試薬を添加し、37で5分間試料をインキュベートした。その後、内因系の経路による凝固を開始するためCaCl₂の添加により凝固を開始し、凝固塊が形成されるまでの時間を測定した。棒グラフは少なくとも3つの測定の平均を示し、エラーバーは標準偏差を示す。上記アッセイを300秒で停止した。300秒の実験時間内に凝固しなかった試料を星印で示す。図3Bは凝固時間に対するわずかな効果を示すため、A22 WT PCI試料を含まないAによるデータを示す。 30

【図4】RCR内にC232S変異及びP357K（P2）変異及びS359K（P1'K）変異を更に含む全長（FL）₁-アンチトリプシンピツツバーグ（antitrypsin Pittsburgh）（Pitts）変異（M358R=P1R）（FL₁AT Pitts C232S P2KP1'K）の組織因子経路（外因系）による凝固に対する効果を判定する、プロトロンビン時間アッセイ（PT）の結果を示す図である。3つの別々の血漿に由来するプールした正常な血漿を₁ATなし（-、黒色棒グラフ）又は5μMのFL₁AT Pitts C232S（Pitts、灰色棒グラフ）又は5μMのFL₁AT Pitts C232S P2KP1'K（P2KP1'K、白色棒グラフ）のいずれかとインキュベートした。凝固をPT試薬の添加によって開始し、凝固塊を形成するまでの時間を測定した。棒グラフは少なくとも3つの測定の平均を示し、エラーバーは標準偏差を示す。2倍希釈した血漿を使用して、凝固のインヒビターに対するアッセイの感度を増した。FL₁AT Pitts C232S P2KP1'KはPTを延長しない。これは、TF - $fVIIa$ 、トロンビン、又は fXa を含むどの凝固原プロテアーゼに対しても顕著な阻害効果が 40

ないことを示す。

【図5】接觸活性化経路（内因系）による凝固に対する F_L $\text{AT Pitts C 232S P2KP1'K}$ の効果を判定するための活性化部分トロンボプラスチン時間アッセイ（aPTT）の結果を示す図である。図5Aは、 ATなし （黒色棒グラフ）又は増大する濃度の F_L AT Pitts C 232S （灰色棒グラフ）又は F_L $\text{AT Pitts C 232S P2KP1'K}$ （白色棒グラフ）のいずれかとインキュベートした3つの別々の血漿に由来するプールされた血漿を示す。aPTT試薬を添加し、試料を37℃で5分間インキュベートした。その後、凝固を CaCl_2 の添加によって開始し、凝固塊を形成するまでの時間を測定した。棒グラフは少なくとも3つの測定の平均を示し、エラーバーは標準偏差を示す。上記アッセイを300秒で停止した。30秒の実験時間内に凝固しなかった試料を星印で示す。図5Bは、 F_L $\text{AT Pitts C 232S P2KP1'K}$ による凝固時間に対するわずかな影響を示すための F_L AT Pitts C 232S 試料を含まないAによるデータを示す。しかしながら、この効果は用量依存的に増大しない。
10

【図6】 F_L AT Pitts C 232S が正常ヒト血漿（NP）におけるトロンビン生成を阻害することを示す図である。図6A～図6Cは、(A)トロンボモデュリン(TM)なし、(B)1.25nMのトロンボモデュリン(TM)、(C)10nMのトロンボモデュリン(TM)の存在下での増大する濃度の F_L AT Pitts C 232S を含む反応に対する代表的なトロンビン生成曲線を示す図である。曲線は2回のアッセイの平均を示す。全てのアッセイをGeorge King Biomedical製のプールした正常ヒト血漿（NP）において行った。外因系経路による凝固を活性化するため、 CaCl_2 及びTF/リン脂質（Technoclone GmbH製のRB low TF及びリン脂質試薬#5006210）を添加することによって凝固を開始した。蛍光発生基質（Z-Gly-Gly-Arg-AMC）の開裂により、トロンビン生成を測定した。Technothrombin較正キット（Technoclone）を使用して、既知濃度のトロンビンに対して蛍光単位を較正することによって蛍光単位をトロンビン濃度に変換した。図6Dは、反応の間に生成されたトロンビンの総量を表す平均ETP（内因性トロンビン活性）を示す。棒グラフは、2回のアッセイで行われた2つの独立した実験の平均を示す。エラーバーは標準偏差を表す。使用したトロンボモデュリン(TM)はHEK-EBNA細胞から組換え産生され、TMの細胞外ドメインからなる。
20

【図7】 F_L $\text{AT Pitts C 232S P2KP1'K}$ が正常ヒト血漿（NP）におけるTMの抗凝固性効果を補助する（rescues）ことを示す図である。図7A～図7Cは、(A)TMなし、(B)1.25nMのTM、(C)10nMのTMの存在下での増大する濃度の F_L $\text{AT Pitts C 232S P2KP1'K}$ を含む反応に対する代表的なトロンビン生成曲線を示す図である。曲線は2回のアッセイの平均を示す。全てのアッセイをGeorge King Biomedical製のプールした正常ヒト血漿（NP）において行った。外因系経路による凝固を活性化するため、 CaCl_2 及びTF/リン脂質（Technoclone GmbH製のRB low TF及びリン脂質試薬#5006210）を添加することによって凝固を開始した。蛍光発生基質（Z-Gly-Gly-Arg-AMC）の開裂により、トロンビン生成を測定した。Technothrombin較正キット（Technoclone GmbH製）を使用して、既知濃度のトロンビンに対して蛍光単位を較正することによって蛍光単位をトロンビン濃度に変換した。図7Dは、反応の間に生成されたトロンビンの総量を表す平均ETP（内因性トロンビン活性）を示す。棒グラフは、2回のアッセイで行われた3つの独立した実験の平均を示す。エラーバーは標準偏差を表す。
30

【図8】 F_L AT Pitts C 232S がヒト血友病A血漿（HA、fVII^I欠乏）及びヒト血友病B血漿（HB、fIX欠乏）におけるトロンビン生成を消滅させることを示す図である。グラフは、指定の量で添加されたトロンボモデュリン(TM)を含む(A)fVII^I欠乏血漿(fVII^I活性1%未満)又は(B)fIX欠乏血漿(fIX活性1%未満)のいずれかにおける、増大する濃度の F_L AT Pitts C 232S によってスパイクされたトロンビン生成実験による平均ETPを示す。血漿
40

は全てGeorge King Biomedical製であった。外因系経路による凝固を活性化するための1 : 4000最終希釈率のDade Innovin(Siemens)を含むCaCl₂及びTF/リン脂質(Technoclone GmbH製のRB low TF及びリン脂質試薬#5006210)の添加により反応を開始した。蛍光発生基質(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)の開裂によりトロンビン生成を測定した。Technothrombin較正キット(Technoclone)を使用して、既知濃度のトロンビンに対して蛍光単位を較正することにより、蛍光単位をトロンビン濃度に変換した。2回のアッセイで行われた少なくとも2つの独立した実験より平均ETPを示す。エラーバーは標準偏差を示す。

【図9】FL₁AT Pitts C232S P2KP1'KがヒトHA血漿(fVIII欠乏血漿)におけるTMの効果を補助することを示す図である。図9A~図9Cは、(A)TMなし、(B)1.25nMのTM、(C)5nMのTMの存在下での増大する濃度のFL₁AT Pitts C232S P2KP1'Kを含む反応に対する代表的なトロンビン生成曲線を示す図である。曲線は2回のアッセイの平均を示す。全てのアッセイをGeorge King Biomedical製のfVIII欠乏血漿(fVIII活性1%未満)において行った。外因系経路による凝固を活性化するため、CaCl₂、及びTF/リン脂質(Technoclone GmbH製のRB low TF及びリン脂質試薬#5006210)を添加することによって凝固を開始した。蛍光発生基質(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)の開裂により、トロンビン生成を測定した。Technothrombin較正キット(Technoclone)を使用して、既知濃度のトロンビンに対して蛍光単位を較正することによって蛍光単位をトロンビン濃度に変換した。図9Dは、反応の間に生成されたトロンビンの総量を表す平均ETP(内因性トロンビン活性)を示す。棒グラフは、2回のアッセイで行われた2つの独立した実験の平均を示す。エラーバーは標準偏差を表す。

【図10】FL₁AT Pitts C232S P2KP1'KがヒトHB血漿(fIX欠乏血漿)におけるTMの効果を補助することを示す図である。図10A~図10Cは、(A)TMなし、(B)1.25nMのTM、(C)5nMのTMの存在下での増大する濃度のFL₁AT Pitts C232S P2KP1'Kを含む反応に対する代表的なトロンビン生成曲線を示す図である。曲線は2回のアッセイの平均を示す。全てのアッセイをGeorge King Biomedical製のfIX欠乏血漿(fIX活性1%未満)において行った。外因系経路による凝固を活性化するため、CaCl₂、及びTF/リン脂質(Technoclone GmbH製のRB low TF及びリン脂質試薬#5006210)、及び1:4000のDade Innovin(Siemens)を添加することによって凝固を開始した。蛍光発生基質(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)の開裂により、トロンビン生成を測定した。Technothrombin較正キット(Technoclone)を使用して、既知濃度のトロンビンに対して蛍光単位を較正することによって蛍光単位をトロンビン濃度に変換した。図10Dは、反応の間に生成されたトロンビンの総量を表す平均ETP(内因性トロンビン活性)を示す。棒グラフは、2回のアッセイで行われた少なくとも2つの独立した実験の平均を示す。エラーバーは標準偏差を表す。

【図11】HBマウス血漿におけるFL₁AT Pitts C232S及びFL₁AT Pitts C232S P2KP1'Kの効果を示す図である。図11A~図11Dは、TMなし(A及びC)、及び750nMの可溶性ヒトTMの存在下(B及びD)における、増大する濃度のFL₁AT Pitts C232S(A及びB)又はFL₁AT Pitts C232S P2KP1'K(C及びD)を含む反応に対する代表的なトロンビン生成曲線を示す。クエン酸塩への尾部の出血、赤血球除去のための遠心分離、及び-80°での凍結によって採取されたHBマウス血漿において全てのアッセイを行った。外因系経路による凝固を活性化するため、CaCl₂、TF/リン脂質(Technoclone製のRB low TF及びリン脂質試薬)、及び1:12000のDade Innovin(Siemens)の添加により凝固を開始した。トロンビン生成を蛍光発生基質(Z-Gly-Gly-Arg-AM)の開裂により測定した。Technothrombin較正キット(Technoclone)を使用して、既知濃度のトロンビンに対して蛍光単位を較正することにより、蛍光単位をトロンビン濃度に変換した。図11Eは、

10

20

30

40

50

反応の間に生成されたトロンビンの総量を表す平均 E T P (内因性トロンビン活性) を示す。棒グラフは、4 つの独立した実験の平均を示す。エラーバーは標準偏差を表す。全てのアッセイを 33 で行った。

【図 12】 $F L_{-1} A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1' K$ がテールクリップアッセイ (tail clip assay) において H B マウスの出血を減少することを示す図である。テールクリップの結果は、野生型マウス又は H B マウスに対する直径 3 mm の尾部切断後の 10 分間の採取時間に亘る総失血を示す。200 μl の総注射容量中、指定の用量の P B S 、 $F L_{-1} A T P i t t s C 2 3 2 S$ 又は $F L_{-1} A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1' K$ いずれかをマウスに注射した。P B S を使用してタンパク質溶液を 200 μl にした。失血容量を尾部から 14 ml の生理食塩水へ採血により特定した。採取した血液を遠心沈殿し、赤血球を溶解した後、575 nm での吸光度を測定した。既知容量の採取した血液を使用して赤血球溶解後の 575 nm での吸光度を特定することにより、標準曲線を構築した。その後、この基準より実験試料における失血を計算した。示される各点は単一のマウスによるデータを示し、水平線は 1 群当たりの全ての動物の平均を示す。独立 t 検定を使用して P 値を計算した。円は P B S を注射した野生型マウスを示し、四角は P B S を注射した H B マウスを示し、三角は 7.5 mg / kg の $F L_{-1} A T P i t t s C 2 3 2 S$ を注射した H B マウスを示し、逆三角は 7.5 mg / kg の $F L_{-1} A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1' K$ を注射した H B マウスを示し、菱形は 15 mg / kg の $F L_{-1} A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1' K$ を注射した H B マウスを示す。

【図 13】 $F L_{-1} A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1' K$ が精巣拳筋細動脈レーザー傷害モデル (cremaster arteriole laser injury model) の H B マウスにおいて安定な凝固塊形成を増大することを示す図である。頸静脈カニューレにより血小板を標識化するための蛍光タグ付き - フィブリン抗体及び蛍光タグ付き抗体を H B マウスに注入した。対照は、抗体のみを注入したマウスにおける傷害後の凝固塊形成のベースラインレベルを示す。m は各条件に対するマウスの数を示し、n はその条件に対して行われた傷害の数を示す。薄い灰色は凝固塊がないことを示し、濃い灰色は血小板のみの凝固塊を示し、黒色は血小板及びフィブリンを含有する凝固塊を表す。

【図 14】 $F L_{-1} A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1' K$ が精巣拳筋細動脈レーザー傷害モデルの H B マウスにおける安定な凝固塊形成を増大することを示す図である。図 14 は、図 13 で示された結果の代表的な生データを示す。各条件について全ての傷害から蛍光を経時的に定量した。グラフは、指定の条件における全ての傷害に由来する中央値を示す。マウスの数及び傷害の総数は以下の通りであった。対照：マウス 5 匹、傷害 8 個、7.5 mg / kg の $F L_{-1} A T P i t t s C 2 3 2 S$: マウス 1 匹、傷害 7 個、7.5 mg / kg の $F L_{-1} A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1' K$: マウス 4 匹、傷害 18 個、15 mg / kg の $F L_{-1} A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1' K$: マウス 3 匹、傷害 20 個。

【図 15】f X a 阻害について再スクリーニングされたトロンビンよりも A P C に特異的な $-1 A T$ の変異体によるトロンビン及び f X a の阻害を示す図である。その後、トロンビン又は f X a を阻害しなかった A P C 特異的変異体の産生においてスクリーニングが成功したかどうかを判定するため、減少した f X a 阻害を有するはずである得られた 4 つの変異体を、(A) トロンビン及び (B) f X a の阻害について試験した。1 μm のセルピンを 12.5 nM のプロテアーゼと共に種々の時間に亘ってインキュベートした。指定の時間点において、過剰な発色基質 (トロンビンに対して S 2 2 3 8 、 f X a に対して S 2 2 2 2) の添加により反応を停止した。残留酵素活性を初期酵素活性で除し、この値の自然対数を時間に対してプロットした。これらのプロットの傾きは、実測速度定数 k_{obs} である。二次速度定数 k_2 の推定を得るために、 k_{obs} をセルピン濃度で除した。トロンビン及び f X a の最も高い阻害、また実質的に f X a を阻害しなかった唯一の変異体 (P 2 R P 1' Q) に対する値を説明するため、選択した値を図に示す。示される上記変異体は全て P i t t s (M 3 5 8 R 、 P 1 R) 変異を有する。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0016】

詳細な説明

本発明は、他の凝固プロテアーゼと比べて A P C に対する特異性を増大するためのセルピンの改変に関する。A P C に特異的な改変セルピンバリアントは、例えば凝血促進剤として有用な可能性がある。

【0017】

改変セルピンバリアントは A P C に対して特異的であることから、本明細書に記載される改変セルピンはわずかなオフターゲット効果を有するか、又はオフターゲット効果を有さず、傷害によって活性化される経路に特異的であると期待される。これは、治療的及び予防的に、また緊急の状況、すなわち外傷において上記改変セルピンを適用することを可能とする。改変セルピンの投薬は、それらが自殺インヒビターであることから予測可能であり、1分子のセルピンは2分子以上のプロテアーゼを阻害することができないことを意味する。さらに、効率的な自然のクリアランス機構はセルピン単独よりもセルピン：プロテアーゼ複合体に特異的であることから、改変セルピンの血漿半減期は現在のバイパス止血剤の血漿半減期を超える可能性が高い。例えば、本明細書に記載される改変セルピンの半減期は約5日の場合がある。

【0018】

プロテインC（遺伝子ID5624）は、トロンビン・トロンボモデュリン複合体によってその活性化形態（活性化プロテインC、A P C）へと開裂される、ビタミンK依存性血漿糖タンパク質である。ヒトプロテインCは、参照アミノ酸配列N P _ 0 0 0 3 0 3 . 1 G I : 4 5 0 6 1 1 5 を有し、参照ヌクレオチド配列N M _ 0 0 0 3 1 2 . 3 G I : 2 7 0 4 8 3 7 2 0 によりコードされ得る。A P Cは、f V a 及び f V I I I a をタンパク質分解により開裂する（図1）ことによって、トロンビンの産生を減ずる抗凝固性プロテアーゼである。

【0019】

本明細書に記載される改変セルピンは、その反応中心ループ（R C L）に1又は複数の変異を有してもよい。例えば、改変セルピンは、そのR C Lに1個、2個、3個、4個、又は5個以上の変異を有してもよい。P 4、P 2、P 1及びP 1'の位置の1個、2個、3個、又は4個全てにおける残基が変異されてもよい。例えば、P 1'及びP 2の位置のうち一方又は両方と、任意にP 1及び/又はP 4の位置との残基が変異されてもよい。

【0020】

本明細書では、R C L残基はセリンプロテアーゼの基質及びインヒビターに対するSchechter-Berger命名法（Schechter & Berger, 1967）に従って番号付けされる。この標準的な命名法は、P 1'、P 1、P 2及び/又はP 4の位置等のR C Lの特定の位置の残基を任意のセルピン配列の中で容易に同定することを可能とする。

【0021】

1又は複数の変異が改変セルピンのR C Lにおける唯一の変異であることが好ましい。例えば、R C Lは、P 1'及びP 2の位置のうち一方又は両方と、任意にP 1及び/又はP 4の位置とに変異を有する野生型セルピンのR C Lの配列からなってもよい。

【0022】

改変セルピンのR C LはP 1'位とP 2位との変異；P 1'位とP 2位とP 1位との変異；P 1'位とP 2位とP 4位との変異、若しくはP 1'位とP 2位とP 1位とP 4位との変異；P 1'位の変異；P 1'位とP 1位との変異；P 1'位とP 4位との変異、若しくはP 1'位とP 1位とP 4位との変異；P 2位の変異；P 2位とP 1との変異；P 2位とP 4位との変異、P 2位とP 1位とP 4位との変異、P 1位の変異、P 4位の変異；又はP 1位とP 4位との変異を有してもよい。R C Lの他の位置の残基は変異されていない野生型の残基であってもよい。

【0023】

R C Lの位置P 1'、位置P 1' とP 2と、位置P 1' とP 1とP 2と、位置P 2とP

10

20

30

40

50

1と、位置P1とP1' と、位置P1' とP2とP4と、又は位置P1' とP1とP2とP4との残基が変異されていることが好ましい。幾つかの好ましい実施形態では、P1' とP1とP2との残基が変異される。

【0024】

セルピンの反応中心ループ(RCL)は、典型的には長さ約20の残基であり、標的プロテアーゼによって開裂される切断しやすいP1-P1' 結合を含む。RCLは、セルピンのベータシートAの鎖5からベータシートCの鎖1へと伸びる。残基P17のGlu、残基P15のGly、及び残基P14のThrはセルピンにおいて保存される。例えば、セルピンのRCLはコンセンサス配列P17のE、P16のE/K/R、P15のG、P14のT/S、P12～P9の(A/G/S)₄(Hopkins et al. 1993, Irving et al. 10 2000)を含んでもよい。RCLは残基P17で開始し、通常残基P3' で終わる。RCLは、PC1等の一部のセルピンにおいて、P' 側に対する追加の残基により伸長されてもよい。例えば、₁-抗トリプシンのRCLは残基P17～P3' からなり、PC1のRCLは残基P17～P6' からなる。強調されたP1' 、P1、P2及びP4の残基を有するセルピンの例を以下の配列番号1～配列番号11に示す。成熟セルピンの配列を構成する残基も示される。

【0025】

上記セルピンにおけるRCLの他の位置の残基は改変されていなくてもよく、すなわち、それらの残基は、野生型セルピン配列の本来の残基であってもよい。したがって、改変セルピンは、上に記載されるP1、P1' 、P2及び/又はP4の位置における変異を含む野生型配列を有するRCLを含んでもよい。20

【0026】

改変セルピンの反応中心ループ(RCL)中の1又は複数の変異は、P1' 位における変異を含んでもよく、又はそれからなってもよい。上記変異は置換であることが好ましい。野生型セルピンのRCL中の本来のP1' 残基は、改変セルピンにおいて非天然残基で置き換えられてもよい。例えば、₁AT又はPC1の野生型配列中のP1' 位の本来のS残基は、改変セルピンにおいてS以外の残基で置き換えられてもよい。

【0027】

野生型セルピンのRCL中の本来のP1' 残基は、Q、N、Y等の大きな極性残基、I、M及びV等の大きな疎水性残基、R、H若しくはK等の正電荷を持つ残基、又はC、A、S及びE等の別の残基で置き換えられてもよい。30

【0028】

幾つかの好ましい実施形態では、P1' 残基は、Q、N、Y等の大きな極性残基、V等の大きな疎水性残基、又はR、H若しくはK等の正電荷を持つ残基、より好ましくはH、K、R若しくはQ等の正電荷を持つか、又は大きな極性の残基、最も好ましくはKへと改変されてもよい。

【0029】

他の実施形態では、P1' 残基は改変セルピンにおいて改変されていなくてもよい。例えば、改変セルピンのRCL中のP1' 位の残基は、野生型セルピン配列のP1' 残基に存在する残基であってもよい。40

【0030】

改変セルピンの反応中心ループ(RCL)における1又は複数の変異は、P2残基における変異を含んでもよく、又はそれからなってもよい。その変異は置換であることが好ましい。例えば、野生型セルピンのRCL中の本来のP2残基は、改変セルピン中の非天然残基で置き換えられてもよい。

【0031】

野生型セルピンのRCLにおける本来のP2残基は、D、Q、N、Y等の大きな極性残基、W、L、I、V及びF等の大きな疎水性残基、R、H若しくはK等の正電荷を持つ残基、又はC、A、T、S若しくはP等の別の残基によって置き換えられてもよい。

【0032】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態では、改変セルピンのP2残基はP以外であってもよい。

【0033】

幾つかの好ましい実施形態では、P2残基は、Q、N、Y等の大きな極性残基、W等の大きな疎水性残基、又はR、H若しくはK等の正電荷を持つ残基、最も好ましくはH、K若しくはR等の正の残基、好ましくはKへと改変されてもよい。

【0034】

幾つかの実施形態では、P2残基は改変セルピンにおいて改変されていなくてもよい。例えば、改変セルピンのRCL中のP2位の残基は、野生型セルピン配列のP2残基に存在する残基であってもよい。

【0035】

改変セルピンのRCL中の1又は複数の変異は、P1'残基及び/又はP2残基における置換を含んでもよく、又はそれからなってもよく、すなわち、野生型セルピン配列のRCL中のP1'位及び/又はP2位に位置する残基が改変セルピンにおいて他の残基に置き換えられてもよい。

【0036】

好ましい実施形態では、改変セルピンは、RCLのP2位及びP1'位の両方に変異を有する。

【0037】

改変セルピンのP2位及びP1'位に適した残基は上に記載される。

【0038】

本明細書に記載される幾つかの改変セルピンでは、P1'残基及びP2残基の少なくとも一方が、R、H若しくはK等の正電荷を持つ残基、又はD、Y、Q若しくはN等の大きな極性残基；W、L、F、V、M若しくはI等の大きな疎水性残基、又はL、C、A、E、T、S若しくはP等の別の残基であってもよい。P1'残基及びP2残基の少なくとも一方は、R、H若しくはK等の正電荷を持つ残基、Y、Q若しくはN等の大きな極性残基、又はW、L、F、V若しくはI等の大きな疎水性残基であることが好ましい。

【0039】

本明細書に記載される改変セルピンにおけるP2残基及びP1'残基の例としてはそれぞれ、KK、FK、RK、VK、LK、QK、CK、PK、FR、HR、IR、SR、TR、VR、YR、AR、PR、RS、KS、QV、RV、RI、RH、KH、TH、RC、RA、LY、QY、TY、DM、TM、WN、RN、HN、TN、KN、NN、PE、RQ、KQ及びTQが挙げられる。

【0040】

幾つかの好ましい実施形態では、P1'残基及びP2残基の両方が、K、H又はR等の正電荷を持つ残基、最も好ましくはKに改変されてもよい。

【0041】

幾つかの実施形態では、P2残基及びP1'残基は、本明細書に記載される改変セルピンにおいてそれぞれ、PN、FS、QS、AS、TS、HS、TA、PT、CC、PS、PT、PM、PH、PA又はPC以外であってもよい。例えば、P2残基及びP1'残基は、PC1スカフォールドにおいてPN、FS、QS、AS、TS、HS、TA、PT、CC若しくはPC以外であってもよく、又は1ATスカフォールドにおいてPS、PT、PM、PH若しくはPA以外であってもよい。

【0042】

幾つかの実施形態では、P1残基は改変セルピンにおいて改変されなくともよい。例えば、改変セルピンのRCL中のP1位における残基は、野生型セルピン配列中のP1残基に存在する残基であってもよい。例えば、改変PC1中のP1残基はR残基であってもよい。

【0043】

他の実施形態では、P1残基は改変セルピンにおいて変異されてもよい。例えば、改変セルピンの反応中心ループ(RCL)中の1又は複数の変異は、P1残基における変異を

10

20

30

40

50

更に含む。上記変異は置換であることが好ましい。野生型セルピンのRCL中の本来のP1残基は、改変セルピン中の非天然残基によって置き換えられてもよい。

【0044】

幾つかの実施形態では、P1残基は、H、K又はR等の正電荷を持つ残基、好ましくはRに変異又は改変されてもよい。

【0045】

野生型セルピンのP1位において正電荷を有しない本来の残基は、改変セルピンにおいて正電荷を有する残基によって置き換えられてもよい。例えば、野生型₁ATのP1位におけるMは、改変₁ATにおいてR等の正電荷を持つ残基によって置き換えられてもよい。₁ATのピツツバーグ(Pitts)バリエントは、P1位のM残基をR残基で置き換える残基358における変異を有する。

10

【0046】

幾つかの実施形態では、P4残基は改変セルピンにおいて改変されていなくてもよい。例えば、改変セルピンのRCL中のP4位における残基は、野生型セルピン配列中のP4残基に存在する残基であってもよい。例えば、PCISカフォールドにおけるP4残基はFであってもよく、₁ATスカフォールドにおけるP4残基はAであってもよい。

【0047】

他の実施形態では、P4残基は改変セルピンにおいて変異されてもよい。例えば、改変セルピンの反応中心ループ(RCL)中の1又は複数の変異は、P4残基における変異を更に含む。

20

【0048】

上記変異は置換であることが好ましい。野生型セルピンのRCL中のP4残基における残基は、改変セルピンにおいて異なる残基で置き換えられてもよい。例えば、改変PCIIのP4残基は、F以外の残基に変異又は改変されてもよく、改変₁ATにおけるP4残基はA以外の残基に変異又は改変されてもよい。

【0049】

改変セルピンのRCLのP4位に適した残基としてS、R、V、C、W、K、G、L、H、F、T、Q及びAが挙げられる。

【0050】

本明細書に記載される改変凝固原セルピンの例では、(1)P4残基がQであり、P2残基がRであり、P1残基がRであり、P1'残基がNである；

30

(2)P4残基がKであり、P2残基がRであり、P1残基がRであり、P1'残基がHである；

(3)P4残基がSであり、P2残基がLであり、P1残基がRであり、P1'残基がKである；

(4)P4残基がHであり、P2残基がRであり、P1残基がRであり、P1'残基がVである；

(5)P4残基がFであり、P2残基がKであり、P1残基がRであり、P1'残基がKである；

40

(6)P4残基がFであり、P2残基がRであり、P1残基がRであり、P1'残基がKである；

(7)P4残基がFであり、P2残基がVであり、P1残基がRであり、P1'残基がKである；

(8)P4残基がCであり、P2残基がLであり、P1残基がRであり、P1'残基がKである；

(9)P4残基がFであり、P2残基がFであり、P1残基がRであり、P1'残基がRである；

(10)P4残基がSであり、P2残基がHであり、P1残基がRであり、P1'残基がRである；

50

(37) P₄ 残基が A であり、P₂ 残基が S であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が R である；

(38) P₄ 残基が A であり、P₂ 残基が K であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が N である；

(39) P₄ 残基が A であり、P₂ 残基が K であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が H である；

(40) P₄ 残基が A であり、P₂ 残基が K であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が K である；

(41) P₄ 残基が A であり、P₂ 残基が V であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が R である；

(42) P₄ 残基が A であり、P₂ 残基が Y であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が R である；

(43) P₄ 残基が A であり、P₂ 残基が A であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が R である；

(44) P₄ 残基が A であり、P₂ 残基が C であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が K である；

(45) P₄ 残基が A であり、P₂ 残基が W であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が N である；

(46) P₄ 残基が A であり、P₂ 残基が H であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が N である；

(47) P₄ 残基が A であり、P₂ 残基が Q であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が K である；又は、

(48) P₄ 残基が A であり、P₂ 残基が N であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が N である。

(49) P₄ 残基が F であり、P₂ 残基が F であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が K である。

(50) P₄ 残基が A であり、P₂ 残基が K であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が Q である、

(51) P₄ 残基が A であり、P₂ 残基が R であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が Q である。

【0051】

幾つかの好ましい改变セルピンにおいて、P₄ 残基が A であり、P₂ 残基が K であり、P₁ 残基が R であり、P_{1'} 残基が K である。

【0052】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される改变凝固原セルピンにおける P₄ 位、P₂ 位及び P_{1'} 位の残基は、それぞれ H P N、D K N、H P E、F F S、L Q S、H A S、Y T S、A H S、A T A、L P T、A C C、A P T、A P A、A P M、A P H、A P S 及び V P C 以外であってもよい。例えば、改变 P C I は P₄ 位、P₂ 位及び P_{1'} 位において H P N、D K N、H P E、F F S、L Q S、H A S、Y T S、A H S、A T A、L P T、A C C、及び V P C 以外の残基を有してもよく、改变 P C II は P₄ 位、P₂ 位及び P_{1'} 位において A P T、A P A、A P M、又は A P H 以外の残基を有してもよい。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される改变凝固原セルピンにおける P₄ 位、P₂ 位及び P_{1'} 位の残基の組合せは非天然であってもよく、すなわち、親の野生型（すなわち、改变されていない）セルピン又は他の野生型セルピンには見られない P₄ 位、P₂ 位及び P_{1'} 位の残基の組合せであってもよい。

【0053】

本明細書に記載される改变セルピンは、上に記載されるその R C L において 1 又は複数の変異、及び任意に R C L の外に 1 又は複数の追加の変異を有する、野生型（すなわち、改变されていない）セルピン、好ましくは成熟な野生型セルピンの配列を含んでもよい。

【0054】

10

20

30

40

50

野生型セルピンの配列は当該技術分野でよく知られており、本明細書に提示される配列番号1～配列番号11を含んでもよい。野生型セルピンの配列は成熟な野生型タンパク質の配列を含んでもよい。

【0055】

そのプロペプチドを含む成熟プロテインCインヒビター(PCI)配列は、配列番号1の残基20～406に対応する。成熟₁-抗キモトリプシンは、配列番号2の残基26～423に対応する。成熟C1-エステラーゼインヒビター配列は、配列番号3の残基23～500に対応する。成熟₂-抗プラスミン配列は、配列番号4の残基28～491に対応する。成熟抗トロンビン(ATIII)配列は、配列番号5の残基33～464に対応する。成熟ヘパリン補因子II配列は、配列番号6の残基20～499に対応する。
成熟₁-抗トリプシン(₁AT)配列は、配列番号7の残基25～418に対応する。
成熟カリスタチン配列は、配列番号8の残基21～427に対応する。成熟プラスミノーゲン活性化因子インヒビター配列は、配列番号9の残基24～402に対応する。成熟プロテインZ依存性インヒビター配列は、配列番号10の残基22～444に対応する。成熟プロテアーゼネキシン1アイソフォーム配列は、配列番号11の残基20～398に対応する。

【0056】

上に記載されるRCL中の残基の変異以外に、改变セルピンは、野生型セルピンアミノ酸配列(例えば、配列番号1～配列番号11のうちの1個、好ましくは配列番号1又は配列番号7の成熟セルピン配列)と比較して変更された50以下、好ましくは45以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、5以下、又は3以下のアミノ酸残基を有してもよい。例えば、改变セルピンは、上に記載されるように変異又は変更されたセルピンのRCLにおける1個、2個、3個、又は4個のアミノ酸残基(すなわち、P1'及び/又はP2、並びに任意にP1及び/又はP4の位置の残基)に加えて、50以下、45以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、5以下又は3以下の変異又は変更されたアミノ酸残基を有する野生型セルピンの配列を含んでもよい。

【0057】

野生型アミノ酸配列におけるアミノ酸残基は、挿入、欠失又は置換、好ましくは種々のアミノ酸残基に対する置換によって変更又は変異されてもよい。かかる変更は、コード核酸における1又は複数のヌクレオチドの1又は複数の付加、挿入、欠失、又は置換によって引き起こされてもよい。

【0058】

例えば、改变セルピンは、50以下の変異を有し、上記変異がP4、P2、P1及びP1'以外の位置である、配列番号12の残基25～418のアミノ酸配列を含んでもよく、すなわち、改变セルピンのRCL中のP4残基がAであり、P2残基がKであり、P1残基がRであり、P1'残基がKである。

【0059】

配列番号12の改变セルピン中のP4残基は379位(成熟タンパク質の355)に位置し、P2残基は381位(成熟タンパク質の357)に位置し、P1残基は382位(成熟タンパク質の358)に位置し、P1'残基は383位(成熟タンパク質の359)に位置する。

【0060】

改变セルピンは、野生型セルピンの野生型アミノ酸配列、例えば、配列番号1～配列番号11のいずれか1個、好ましくは配列番号1又は配列番号7の成熟セルピン配列と少なくとも50%の配列同一性を共有してもよく、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも約80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を共有してもよい。

【0061】

例えば、改变セルピンは、改变セルピンのRCL中のP4残基がAであり、P2残基がKであり、P1残基がRであり、P1'残基がKである、配列番号12の残基25～41

10

20

30

40

50

8に対して少なくとも50%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

【0062】

配列同一性は、一般的にはアルゴリズムGAP(米国サンディエゴのAccelrys Inc製Wisconsin GCG package)を参照して規定される。GAPは、2つの完全配列を整列するため、一致する数を最大化し、ギャップの数を最小化するNeedleman及びWunschのアルゴリズムを使用する。一般的には、ギャップ作製ペナルティ(gap creation penalty)=12及びギャップ伸長ペナルティ(gap extension penalty)=4を有するデフォルトパラメーターを使用する。GAPの使用が好ましい場合があるが、一般的に採用されるデフォルトパラメーターである他のアルゴリズム、例えば、BLAST(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410の方法を使用する)、FASTA(Pearson and Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448の方法を使用する)、若しくはSmith-Watermanのアルゴリズム(Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197)、又は前述のAltschul et al. (1990)のTBLASTNプログラムを使用してもよい。特に、psi-Blastアルゴリズムが使用され得る(Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402)。また、Genomequest(商標)ソフトウェア(米国マサチューセッツ州ウースターのGene-IT)を使用して配列の同一性及び類似性を決定してもよい。

【0063】

配列比較は、本明細書に記載される関連のある配列の全長に対して行われることが好ましい。

20

【0064】

本明細書に記載される改変凝固原セルピンは、RCLCNSPP17E、P16S/E/K/R、P15G、P14T/S、P12-P9(A/G/S)₄を含むことが好ましい。

【0065】

改変セルピンは、野生型セルピン配列に保存される1又は複数の残基を更に含んでもよい。例えば、変性セルピンは、下記の残基(1ATにおける位置に従って付番している):33F、49N、53S、54P、56S、61L、67G、72T、80L、130F、147F、157I、158N、161V、165T、167G、169I、180T、184L、186N、190F、191K、192G、194W、198F、203T、208F、218V、220M、221M、277Y、254L、255P、289P、290K、299L、303L、307G、312F、316A、327L、334H、342E、344G、347A、369P、370F、383L、384F、386G及び391P(Irving et al 2008)の幾つか又は全てを含み得る。他のセルピン配列において対応する保存された残基は、通例の配列分析を使用して容易に決定され得る。

30

【0066】

改変セルピンのRCLCの外での変異又はバリエーションとして、ジスルフィド架橋形成又は他の改変を消滅させるための₁ATのC232(成熟配列によるナンバリング)残基等の改変セルピンにおける1又は複数のCys残基の置き換え、例えば発現を促進するための野生型配列のN末端における残基の欠失若しくは置換、又は改変セルピンのヘパリン結合活性を変更するための改変セルピンのヘパリン結合部位(すなわち、ヘリックスD又はヘリックスH)における残基の変異若しくは改変が挙げられ得る。

40

【0067】

幾つかの実施形態では、改変セルピンは、野生型セルピンと比較してN末端トランケーションを有してもよい。例えば、改変セルピンは、N末端に10残基~30残基、好ましくは約20残基のトランケーションを有してもよい。

【0068】

改変セルピンにおける1又は複数の残基は、非天然アミノ酸、改変アミノ酸又はDアミノ酸であってもよい。かかるアミノ酸の使用は当業者によく知られている。

【0069】

50

本明細書に記載される改変セルピンは野生型セルピンの二次構造を呈してもよく、例えば、改変セルピンは3つのペータシート、8~9のアルファヘリックス及び約20残基の柔軟なRCLを含む構造を呈してもよい。

【0070】

幾つかの好ましい実施形態では、改変セルピンは、本明細書に記載されるようにその反応中心ループ(RCL)中に1又は複数の変異を有する野生型セルピンのアミノ酸配列からなってもよい。

【0071】

改変セルピンはヒトにおいて非免疫原性であることが好ましい。例えば、野生型セルピンは、ヒトセルピン、好ましくはヒト血漿セルピンであってもよい。

10

【0072】

野生型セルピンは、₁-抗キモトリプシン(SERPINA3)、₂-抗プラスミン(SERPINF2)、抗トロンビン(ATIII)(SERPIN C1)、ヘパリン補因子II(HCII)(SERPIN D1)、プロテインCインヒビター(PCI)(SERPIN A5)、₁-抗トリプシン(₁AT)(SERPIN A1)、カリスタチン(SERPIN A4)、プラスミノーゲン活性化因子インヒビター-1(SERPIN E1)、C1-エステラーゼインヒビター(SERPING1)、プロテアーゼネキシン1(SERPIN E2)又はプロテインZ-依存性インヒビター(SERPIN A10)であってもよい(Whisstock et al JBC. 285 32 24307-24312、Rau et al Journal of Thrombosis and Hemostasis, 5 (Suppl. 1): 102-115、Huntington, Journal of Thrombosis and Hemostasis, 9 (Suppl. 1): 26-34)。

20

【0073】

野生型セルピンは、好ましくはATIII、HCII、PCI又は₁ATであり、最も好ましくはPCI又は₁ATである(Huntington et al Cell. Mol. Life Sci. 66 (2009) 113-121、Li et al JBC. 283 51 36039-36045、及びLi et al PNAS 2008 105 4661-4666)。

【0074】

₁-抗キモトリプシン(SERPINA3、遺伝子ID12)は、NP_001076.2 GI:50659080(配列番号2)の参照アミノ酸配列を有してもよく、またNM_001085.4 GI:73858562の参照ヌクレオチド配列によってコードされてもよい。

30

【0075】

C1-エステラーゼインヒビター(SERPING1、遺伝子ID710)は、NP_000053.2 GI:73858568(配列番号3)の参照アミノ酸配列を有してもよく、またNM_000062.2 GI:73858567の参照ヌクレオチド配列によってコードされてもよい。

【0076】

₂-抗プラスミン(SERPINF2、遺伝子ID5345)は、NP_000925.2 GI:115583663(配列番号4)の参照アミノ酸配列を有してもよく、またNM_001165920.1 GI:260064047の参照ヌクレオチド配列によってコードされてもよい。

40

【0077】

抗トロンビン(ATIII)(SERPIN C1、遺伝子ID462)は、NP_000479.1 GI:4502261(配列番号5)の参照アミノ酸配列を有してもよく、またNM_000488.3 GI:254588059の参照ヌクレオチド配列によってコードされてもよい。

【0078】

ヘパリン補因子II(HCII)(SERPIN D1、遺伝子ID3053)は、NP_000176.2 GI:73858566(配列番号6)の参照アミノ酸配列を有してもよく、またNM_000185.3 GI:73858565の参照ヌクレオチド配

50

列によってコードされてもよい。

【0079】

プロテインCインヒビター(PCI)(SERPINA5、遺伝子ID5104)は、NP_000615.3 GI:194018472の参照アミノ酸配列を有してもよく、またNM_000624.5 GI:401782581の参照スクレオチド配列によってコードされてもよい。幾つかの好ましい実施形態では、プロテインCインヒビター(PCI)は、SNP rs6115における置換によって生じた対立遺伝子バリアントVAR_013081(S45Nバリアント、プロペプチドを含む成熟タンパク質によるナンバリング)であって、配列番号1に示される配列を有してもよい。配列番号1の残基1~19はシグナル配列に対応する。血漿では、PCIは、配列番号1の残基20~25のプロペプチドを含む全長形態(すなわち、配列番号1の残基20~406)、又はプロペプチドを欠くN末端切断形態(すなわち、配列番号1の残基26~406)で存在し得る。
10

【0080】

₁-抗トリプシン(₁AT)(SERPINA1、遺伝子ID5265)は、NP_000286.3 GI:50363217(配列番号7)の参照アミノ酸配列を有してもよく、またNM_000295.4 GI:189163524の参照スクレオチド配列によってコードされてもよい。

【0081】

カリスタチン(SERPINA4、遺伝子ID5267)は、NP_006206.2 GI:21361302(配列番号8)の参照アミノ酸配列を有してもよく、またNM_006215.2 GI:21361301の参照スクレオチド配列によってコードされてもよい。
20

【0082】

プラスミノーゲン活性化因子インヒビター-1(SERpine1、遺伝子ID5054)は、NP_000593.1 GI:10835159(配列番号9)の参照アミノ酸配列を有してもよく、またNM_000602.4 GI:383286745の参照スクレオチド配列によってコードされてもよい。

【0083】

プロテインZ依存性プロテアーゼインヒビター(PZI)(Serpina10、遺伝子ID51156)は、NP_057270.1 GI:7705879(配列番号10)の参照アミノ酸配列を有してもよく、またNM_016186.2 GI:154759289の参照スクレオチド配列によってコードされてもよい。
30

【0084】

プロテアーゼネキシン1(PN1)(Serpine2、遺伝子ID5270)は、NP_001130000.1 GI:24307907、NP_001130002.1 GI:211904152又はNP_006207.1 GI:211904156(配列番号11)の参照アミノ酸配列を有してもよく、NM_001136528.1 GI:211904151、NM_001136530.1 GI:211904155又はNM_006216.3 GI:211904150の参照スクレオチド配列によってコードされてもよい。
40

【0085】

上に記載されるように変異され得るP1'、P1、P2及びP4の残基を配列番号1~配列番号11において太字で強調する。

【0086】

RCL中の1又は複数の変異は、改変されていない野生型セルピンと比較して改変セルピンの特異性を変更する。改変セルピンは、野生型セルピンと比べて凝血原プロテアーゼよりも抗凝固性プロテアーゼに対して増大された選択性を呈する。

【0087】

RCL内の1又は複数の変異は、他の凝固性プロテアーゼ、特にトロンビン、fXa、
50

$fVIIa$ 、 $fIXa$ 及び $fXIa$ のうちの1又は複数の凝血原プロテアーゼの阻害と比較して、改変セルピンによるAPCの阻害を増大することが好ましい。

【0088】

例えば、改変セルピンのRCL中の1又は複数の変異は、トロンビンの阻害と比較して改変セルピンによるAPCの阻害を増大し得る。トロンビンと比較してAPCの選択的阻害は、ヘパリンの存在下又は不在下において増大し得る。

【0089】

さらに、改変セルピンのRCL中の1又は複数の変異は、凝血原プロテアーゼ fXa 、 $fVIIa$ 、 $fIXa$ 及び $fXIa$ のうちの1個、2個、3個又は4個全ての阻害と比較して、改変セルピンによるAPCの阻害を増大し得る。10

【0090】

本明細書で記載されるように改変されたセルピンは、改変されていない野生型セルピンよりも、トロンビン及び他の凝固原プロテアーゼと比較してより大きなAPCの阻害を呈する。

【0091】

改変セルピンは、トロンビンの阻害よりも大きなAPCの阻害を示し得る。例えば、改変セルピンによるAPCの阻害は、改変セルピンによるトロンビンの阻害よりも少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも100、又は少なくとも1000倍であってもよい。幾つかの実施形態では、改変セルピンは、トロンビンの阻害に対する二次速度定数よりも少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも100、又は少なくとも1000倍の二次速度定数(k_2)によりAPCを阻害してもよい。改変セルピンのAPCに対する阻害の化学量論は1であることが好ましい。20

【0092】

本明細書に記載される改変セルピンは、APCに結合して阻害し得るが、トロンビンへの結合若しくは阻害を示さないか、又は実質的にトロンビンへの結合若しくは阻害を示さないことが好ましい。

【0093】

また、RCL中の1又は複数の変異は、 $fVIIa$ 、 $fIXa$ 、 fXa 及び $fXIa$ のうちの1個、2個、3個、又は4個全ての阻害と比べてAPCの阻害を増大し得る。 $fVIIa$ 、 $fIXa$ 、 fXa 及び/又は $fXIa$ と比較したAPCの阻害は、ヘパリンの存在下又は不在下で増大され得る。30

【0094】

例えば、改変セルピンは、野生型セルピンよりも $fVIIa$ 、 $fIXa$ 、 fXa 及び $fXIa$ のうちの1個、2個、3個、又は4個全てと比べてより大きなAPCの阻害を呈し得る。

【0095】

改変セルピンは、 $fVIIa$ を阻害するよりもAPCを阻害し得る。例えば、改変セルピンによるAPCの阻害は、改変セルピンによる $fVIIa$ の阻害よりも少なくとも2倍、少なくとも10倍、少なくとも100、又は少なくとも1000倍であってもよい。改変セルピンは、 $fVIIa$ の阻害に対する二次速度定数よりも少なくとも2倍、少なくとも10倍、少なくとも100、又は少なくとも1000倍の二次速度定数(k_2)でAPCを阻害する。40

【0096】

改変セルピンは、 $fIXa$ を阻害するよりもAPCを阻害し得る。例えば、改変セルピンによるAPCの阻害は、改変セルピンによる $fIXa$ の阻害よりも少なくとも2倍、少なくとも10倍、少なくとも100、又は少なくとも1000倍であってもよい。改変セルピンは、 $fIXa$ の阻害に対する二次速度定数よりも少なくとも2倍、少なくとも10倍、少なくとも100、又は少なくとも1000倍の二次速度定数(k_2)でAPCを阻害する。

【0097】

10

20

30

40

50

改変セルピンは、 fXa を阻害するよりもAPCを阻害し得る。例えば、改変セルピンによるAPCの阻害は、改変セルピンによる fXa の阻害よりも少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも10倍、少なくとも100、又は少なくとも1000倍であってもよい。改変セルピンは、 fXa の阻害に対する二次速度定数よりも少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも10倍、少なくとも100、又は少なくとも1000倍の二次速度定数(k_2)でAPCを阻害する。

【0098】

改変セルピンは、 $fXIa$ を阻害するよりもAPCを阻害し得る。例えば、改変セルピンによるAPCの阻害は、改変セルピンによる $fXIa$ の阻害よりも少なくとも2倍、少なくとも10倍、少なくとも100、又は少なくとも1000倍であってもよい。改変セルピンは、 $fXIa$ の阻害に対する二次速度定数よりも少なくとも2倍、少なくとも10倍、少なくとも100、又は少なくとも1000倍の二次速度定数(k_2)でAPCを阻害する。

10

【0099】

本明細書に記載される改変セルピンは、改変セルピン配列に加えて1又は複数の異種性アミノ酸配列を含む融合タンパク質の一部であってもよい。例えば、改変セルピンを含む融合タンパク質は、改変セルピンの安定性、薬物動態、ターゲッティング、親和性、精製及び生産の特性を改善する1又は複数の追加のドメインを更に含んでもよい。

【0100】

好適な更なるドメインとして、免疫グロブリンFcドメインが挙げられる。免疫グロブリンFcドメインは当該技術分野でよく知られており、ヒトIgG1Fcドメインが挙げられる。ヒト免疫グロブリンFcドメインは、改変セルピンのN末端又はC末端に位置してもよい。

20

【0101】

本明細書に記載される改変セルピンは、当該技術分野で標準的な合成又は組換えの技法を使用して提供され得る。

【0102】

幾つかの実施形態では、改変セルピンは、例えば精製に有用な場合がある親和性タグを更に含む融合タンパク質として產生されてもよい。親和性タグは、特異的結合対の1つのメンバーを形成する異種性のペプチド配列である。タグを含むポリペプチドは、例えばアフィニティカラムにおいて、ポリペプチドに対する特異的結合対の他のメンバーの結合により精製されてもよい。例えば、タグ配列は、抗体分子によって結合されるエピトープを形成する場合がある。

30

【0103】

好適な親和性タグとしては、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、(GST)、マルトース結合ドメイン(MBD)、MRGS(H)₆、DYKDDDDK(FLAG(商標))、T7-S-(KETAAAKFERQHMD S)、ポリ-Arg(R₅-₆)、ポリ-His(H₂-₁₀)、ポリ-Cys(C₄)ポリ-Phe(F₁₁)ポリ-Asp(D₅-₁₆)、SUMOタグ(InvitrogenのChampion pET SUMO発現システム)、Strept-タグII(WSHPQFEK)、c-my c(EQKLISEEDL)、インフルエンザ-HAタグ(Murray, P. J. et al (1995) Anal Biochem 229, 170-9)、Glu-Glu-Pheタグ(Stammers, D. K. et al (1991) FEB S Lett 283, 298-302)、Tag.100(Qiagen、哺乳動物のMAPキナーゼ2から誘導される12aaタグ)、Cruzタグ09(商標)(MKAEFRRQESDR、Santa Cruz Biotechnology Inc.)及びCruzタグ22(商標)(MRDALDRLLDRLLA、Santa Cruz Biotechnology Inc.)が挙げられる。既知のタグ配列は、Terpe (2003) Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 523-533に概説される。好ましい実施形態では、(H)₆、His-SUMOタグ(InvitrogenのChampion pET SUMO発現システム)、又はMRGS(H)₆等のポリ-Hisタグを使用することができます。

40

【0104】

50

親和性タグ配列は、例えば部位特異的プロテアーゼを使用して、精製の後に改変セルピンから分離されてもよい。

【0105】

幾つかの実施形態では、改変セルピンは、細胞から培養培地中への融合ポリペプチドの直接分泌に対する適切なシグナルリーダーペプチドに連結されてもよい。好適なシグナルリーダーペプチドの範囲は当該技術分野で知られている。シグナルリーダーペプチドはセルピンシグナル配列であってもよく、又は改変セルピンに対して異種性、すなわち非セルピンシグナル配列であってもよい。例えば、 - 因子分泌シグナル又は B i P シグナル配列が採用されてもよい。シグナルペプチドは、上記ポリペプチドの発現後に翻訳後プロセシングによって除去されることが好みしい。

10

【0106】

本明細書に記載される改変セルピンは、改変されていないセルピン及び他のポリペプチド及び / 又は血清成分等の汚染物質を含まないという意味で単離され得る。

【0107】

本明細書に記載される改変セルピンは、活性化プロテイン C (A P C) の 1 又は複数の活性を阻害し得る。例えば、本明細書に記載される改変セルピンは、 f V a 又は f V I I I a 等の 1 又は複数の A P C 基質のタンパク質分解による開裂を阻害し得る。例えば、改変セルピンの A P C への結合は、 f V a 、 f V I I I I a 及び / 又は別の A P C 基質のタンパク質分解による開裂の少なくとも 5 倍、少なくとも 10 倍、又は少なくとも 15 倍の減少をもたらす場合がある。幾つかの実施形態では、改変セルピンによる A P C の結合では、 A P C による f V a 又は f V I I I I a の開裂を検出することができない場合がある。

20

【0108】

例えば *in vitro* で A P C 基質のタンパク質分解による開裂を測定することによる A P C 活性を測定する技法は、当該技術分野で標準的であり、本明細書に記載される。 A P C 活性の判定における使用に適したアッセイとして、例えば速度定数を測定する標準的な反応速度アッセイ、及びトロンビン生成アッセイ (T G A) を含む凝固アッセイが挙げられる。

【0109】

例えば、 *in vitro* で発色基質のタンパク質分解による開裂を測定することにより、凝固原プロテアーゼの活性を測定する技法は、当該技術分野で標準的であり、本明細書に記載される。プロテアーゼ活性の判定における使用に適したアッセイとして、例えば速度定数を測定するための標準的な反応速度アッセイ、及びトロンビン生成アッセイ (T G A) 、プロトロンビン時間アッセイ (P T) 及び活性化部分トロンボプラスチン時間アッセイ (a P T T) を含む凝固アッセイが挙げられる。

30

【0110】

幾つかの実施形態では、例えば *in vivo* 半減期を増加することにより薬学的特性を改善するため、化学修飾によって、例えば P E G 化によって、又はリポソーム中の組込みによって本明細書に記載される改変セルピンを更に改変してもよい。

【0111】

本明細書に記載される改変セルピンは、改変セルピンの *in vivo* 半減期を増加するため 1 又は複数のポリエチレングリコール (P E G) 又は他の部分に付着されてもよい (Cantin et al. 2002, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 27; 659-665) 。例えば、改変セルピンは、モノペグ化又はポリペグ化 (例えば、 2 ~ 6 の P E G 部分により) されてもよい。好適なペグ化方法は当該技術分野でよく知られている。

40

【0112】

改変セルピンの凝固及び出血に対する効果を判定してもよい。好適な技法は当該技術分野で標準的である。例えば、改変セルピンのトロンビン生成に対する効果を、本明細書に記載されるトロンビン生成アッセイ (T G A) 又は活性化部分トロンボプラスチン時間アッセイ又はプロトロンビン時間アッセイを使用して判定してもよい。好適な *in vivo* モデルとして、本明細書に記載される精巣拳筋細動脈レーザー傷害モデル、 F e C l₃

50

頸動脈モデル及びテールクリップアッセイが挙げられる。他の好適な凝固モデルは当該技術分野でよく知られている。

【0113】

本発明の他の態様は、上に記載される改変セルピンをコードする核酸及びかかる核酸を含むベクターを提供する。

【0114】

好適なベクターは、選択されても構築されてもよく、プロモーター配列、ターミネーター・フラグメント、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マークー遺伝子及び必要に応じて他の配列を含む、適切な調節配列を含有する。ベクターは、哺乳動物細胞において上記核酸の発現を誘導する適切な調節配列を含むことが好ましい。また、ベクターは、大腸菌 (*E. coli*) 等の細菌宿主においてその選択、発現及び複製を可能とする、複製起点、プロモーター領域、及び選択可能なマークー等の配列を含んでもよい。10

【0115】

ベクターは、必要に応じてプラスミド、ウイルス、例えばファージ、又はファージミドであってもよい。更なる詳細については、例えば、Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, Russell et al., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参考されたい。例えば核酸コンストラクトの作製、変異導入、配列決定、細胞へのDNAの導入、及び遺伝子発現における核酸の操作に関する多くの既知の技法及びプロトコルがCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. eds. John Wiley & Sons, 1992に詳細に記載されている。20

【0116】

本明細書に記載される核酸又はベクターは宿主細胞へと導入され得る。

【0117】

本発明の別の態様は、上に記載される改変セルピンを含む又はそれからなるポリペプチドを発現する核酸又はベクターを含む組換え細胞を提供する。

【0118】

組換え改変セルピンの產生に適した宿主細胞の範囲は当該技術分野で知られている。好適な宿主細胞として、原核細胞、特に細菌、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*) 及びラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) の細胞、並びに、哺乳類の細胞、例えばCHO及びCHO由来の細胞株 (Lec細胞)、HeLa、COS、HEK293 及びHEK-EBNA細胞、両生類の細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞、昆虫細胞、例えばイラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) の細胞、Sf9 及びSf21、及び酵母細胞、例えばピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) の細胞を含む真核細胞を挙げができる。30

【0119】

細胞への核酸の導入に関する技法は当該技術分野でよく確立されており、特定の状況に応じて任意の適した技法が採用され得る。真核細胞について適した技法として、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-Dextran、電気穿孔法、リポソーム媒介性トランスフェクション、及びレトロウイルス又は他のウイルス、例えばアデノウイルス、AAV、レンチウイルス又はワクシニアウイルスを用いた形質導入を挙げができる。細菌細胞について適した技法として、塩化カルシウム形質転換、電気穿孔法、及びバクテリオファージを用いたトランスフェクションを挙げができる。40

【0120】

当該技術分野でよく知られているように、抗生物質に耐性又は感受性の遺伝子等のマークー遺伝子を目的の核酸を含むクローニングの同定に使用してもよい。

【0121】

導入された核酸は、細胞内の染色体外ベクター上にあってもよく、又は核酸は宿主細胞のゲノム中に統合されてもよい。統合は、標準的な技法に従って、核酸内での配列の包含によって促進されてもよく、又はゲノムとの組換えを促進するベクターによって促進されてもよい。50

【 0 1 2 2 】

或る実施形態では、本明細書に記載される改変セルピンをコードする核酸は、個体への投与に適した、例えば遺伝子治療用途のベクターに含まれてもよい。好適なベクターとして、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター及びA A T ベクターが挙げられる。

【 0 1 2 3 】

導入に続き、核酸を発現してコードされる改変セルピンを産生してもよい。幾つかの実施形態では、コードされたセルピンポリペプチドが産生されるように、（実際に形質転換された細胞を含み得るが、どちらかといえばその細胞が形質転換細胞の子孫である可能性が高い）宿主細胞を核酸の発現のための条件下で *in vitro* で培養してもよい。誘導性プロモーターを使用する場合、発現は誘導性プロモーターの活性化を必要とする場合がある。10

【 0 1 2 4 】

改変セルピンを含む又はそれからなる発現されたポリペプチドを、産生後、単離及び／又は精製してもよい。これは、当該技術分野で知られている任意の簡便な方法を使用して達成され得る。組換えポリペプチドの精製のための技法は、当該技術分野でよく知られており、例えば、HPLC、FPLC、又はアフィニティクロマトグラフィーが挙げられる。幾つかの実施形態では、精製は上に記載されるポリペプチドに対するアフィニティタグを使用して行われてもよい。

【 0 1 2 5 】

本発明の別の態様は、宿主細胞において上に記載される改変セルピンをコードする核酸を発現することと、任意にそのようにして産生された改変セルピンを単離及び／又は精製することとを含む、改変セルピンを産生する方法を提供する。20

【 0 1 2 6 】

記載されるように産生された改変セルピンを含む又はそれからなるポリペプチドは更に調査されてもよく、例えば、薬理学的な特性及び／又は活性が特定されてもよい。タンパク質分析の方法及び手段は、当該技術分野でよく知られている。

【 0 1 2 7 】

本明細書に記載される改変セルピン、改変セルピンをコードする核酸又は改変セルピンを発現する組換え細胞は治療法において有用な可能性がある。例えば、本明細書で記載される改変セルピン、改変セルピンをコードする核酸、又は改変セルピンを発現する組換え細胞を、出血の治療のため個体に投与してもよい。30

【 0 1 2 8 】

改変セルピンは単独で投与されてもよいが、改変セルピンは通常、改変セルピン、例えば改変セルピンをコードする核酸又は改変セルピンを発現する組換え細胞に加えて少なくとも1つの成分を含んでもよい医薬組成物の形態で投与される。したがって、医薬組成物は、改変セルピン、核酸又は細胞に加えて、当業者によく知られている薬学的に許容可能な賦形剤、担体、バッファー、安定化剤又は他の材料を含んでもよい。本明細書で使用される「薬学的に許容可能な」という用語は、合理的な利点／リスクの比率に見合った、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応又は他の問題若しくは合併症のない被験体（例えば、ヒト）の組織との接触における使用に適した、健全な医学的判断の範囲内の化合物、材料、組成物、及び／又は剤形に関係する。また、各担体、賦形剤等は、上記製剤の他の原料と適合性であるという意味で「許容可能」でなくてはならない。担体又は他の材料の正確な特徴は、以下に考察されるボーラス、注入、注射又は任意の他の好適な経路であってもよい投与経路に依存する。40

【 0 1 2 9 】

幾つかの実施形態では、改変セルピン、核酸又は細胞は、投与に先立つ再構成用に凍結乾燥形態で提供されてもよい。例えば、凍結乾燥されたセルピンを、個体への投与に先立って滅菌水中で再構成し、生理食塩水と混合してもよい。

【 0 1 3 0 】

10

20

30

40

50

非経口、例えば、注射による皮下又は静脈内の投与に対して、上記改変セルピン、核酸又は細胞を含む医薬組成物は、発熱物質を含まない (pyrogen-free)、好適な pH、等張性、及び安定性を有する、非経口的に許容可能な水溶液の形態であってもよい。当業者であれば、例えば塩化ナトリウム液、リンゲル液、乳酸リンゲル液等の等張ビヒクルを用いて好適な溶液を調製することが十分に可能である。防腐剤、安定化剤、緩衝剤、抗酸化剤及び／又は他の添加剤を必要に応じて利用することができ、これらには緩衝剤、例えばリソ酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸及びメチオニン；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブチルアルコール又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルパラベン又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサンノール；3'-ペントノール；及びm-クレゾール等）；低分子量ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン若しくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン若しくはリシン；グルコース、マンノース若しくはデキストリンを含む、单糖、二糖及び他の炭水化物；キレート剤、例えばEDTA；糖、例えばスクロース、マンニトール、トレハロース若しくはソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウムイオン；金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）；及び／又は非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）若しくはポリエチレングリコール（PEG）が挙げられる。好適な担体、賦形剤等は、標準的な医薬書、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990に見ることができる。

【0131】

医薬組成物及び製剤は、簡便には単位用量の形態で提示されてもよく、薬学の技術分野でよく知られている任意の方法によって作製されてもよい。かかる方法は、改変セルピンと、1又は複数の副成分を構成する担体と合わせる（association）工程を含む。一般的には、上記組成物は、液体担体若しくは微粉化された固体担体、又はそれらの両方と活性化合物とを均一に及び密接に合わせた後、必要に応じて製品を成形することによって作製される。

【0132】

本明細書に記載される改変セルピン、核酸又は細胞は、静脈内又は皮下の投与に対する医薬組成物に製剤化されることが好ましい。

【0133】

治療される状態に応じて、改変セルピン、核酸又は細胞を含む医薬組成物を、単独で又は他の治療と組み合せて、同時に又は順次のいずれかで投与してもよい。

【0134】

本明細書に記載される改変セルピン、核酸又は細胞を、治療的及び予防的若しくは防止的な処置（例えば、個体において生じる状態のリスクを減じるため、その発症の遅延のため、又は発症後のその重症度を減じるための個体における状態の発症前の処置）を含むヒト又は動物の身体を治療する方法において使用してもよい。上記治療の方法は、改変セルピンを、それを必要とする個体に投与することを含んでもよい。

【0135】

上記のような治療に適した個体は、哺乳類、例えば齧歯類（例えばモルモット、ハムスター、ラット、マウス）、ネズミ科動物（例えばマウス）、イヌ科動物（例えばイヌ）、ネコ科動物（例えばネコ）、ウマ科動物（例えばウマ）、靈長類、類人猿（例えばサル又はエイプ）、サル（例えばマーモセット、ヒヒ）、エイプ（例えばゴリラ、チンパンジー、オランウータン、テナガザル）、又はヒトとすることができる。

【0136】

幾つかの好ましい実施形態では、上記個体はヒトである。他の好ましい実施形態では、非ヒト哺乳動物、特に、ヒトにおける治療的有効性を実証するためのモデルとして従来使用される哺乳動物（例えば、ネズミ科動物、靈長目の動物、ブタ、イヌ科動物、又はウサ

10

20

20

30

40

50

ギ動物)を採用してもよい。ヒト又はネズミ科動物のトロンビンの阻害を伴わない改変セルピンによるヒト及びネズミ科動物のA P Cの阻害を以下に示す。

【0137】

投与は、通常「治療的有効量」又は「予防的有効量」であり、これは患者に対する利益を示すのに十分である。かかる利益は、少なくとも1つの症状の少なくとも改善であってもよい。投与される実際の量、並びに投与の速度及び時間経過は、治療される特徴及び重症度、治療される特定の哺乳動物、個別の患者の臨床状態、障害の原因、組成物の送達部位、投与方法、投与計画、及び医師に知られている他の要因に依存する。

【0138】

組成物は、治療される個体の状況に応じて単独又は他の治療と組合せて、同時又は順次のいずれかで投与され得る。

【0139】

治療の処方、例えば投与量の決定等は、一般医及び他の医師の責任の範囲に含まれ、治療される疾患の症状の重症度及び/又は進行に依存する場合がある。治療用ポリペプチドの適切な用量は当該技術分野でよく知られている (Ledermann J.A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664、Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922)。投与される医薬の種類に応じて、本明細書又はPhysician's Desk Reference (2003) に示され得る具体的な投与量を使用してもよい。改変セルピンの治療的有効量又は好適な用量は、動物モデルにおけるその *in vitro* 活性及び *in vivo* 活性を比較することによって特定され得る。マウス及び他の試験動物における有効投薬量をヒトに外挿する方法が知られている。正確な用量は、改変セルピンが予防用であるのか又は治療用であるのか、治療される領域の大きさ及び位置、改変セルピンの正確な特徴、並びに改変セルピンに付着された任意の検出可能な標識又は他の分子の特徴を含む多くの要因に依存する。

【0140】

典型的な改変セルピンの用量は、0.1 mg / kg ~ 100 mg / kg、例えば1 mg / kg ~ 80 mg / kg の範囲となる。例えば、100 µg ~ 1 g の範囲の用量を全身適用に対して使用してもよく、1 µg ~ 1 mg を局所適用に使用してもよい。初期のより高い負荷用量に続いて、1又は複数のより低用量が投与されてもよい。これは、成人患者の1回の治療に対する用量であり、幼児及び乳児に対して比例的に調整されてもよく、また分子量に対する割合で他の改変セルピンの形式に合わせて調整されてもよい。治療は、内科医の裁量で毎日、1週間に2回、毎週又は毎月の間隔で繰り返されてもよい。或る個体に対する治療計画は、改変セルピン組成物の薬物動態学的及び薬力学的な特性、投与経路、並びに治療される状態の特徴に依存する場合がある。

【0141】

治療は定期的であってもよく、投与の間の期間は、約1週間以上、例えば約2週間以上、約3週間以上、約4週間以上、約1ヶ月に1回以上、約5週間以上、又は約6週間以上であってもよい。例えば、治療は、2週間毎~4週間毎、又は4週間毎~8週間毎であってもよい。治療は、手術の前及び/又は後に行われてもよく、及び/又は外傷、外科処置、又は侵襲性処理の解剖学的部位に投与又は直接塗布されてもよい。好適な製剤及び投与経路は上に記載される。

【0142】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される改変セルピンは、皮下注射として投与されてもよい。皮下注射は、例えば長期の予防/治療のため自動注入装置を使用して投与されてもよい。

【0143】

幾つかの好ましい実施形態では、改変セルピンの治療的效果は、その用量に依存して数回の半減期に亘って持続する場合がある。

【0144】

本明細書に記載される改変セルピンは、トロンビン等の凝血促進因子を阻害することな

10

20

30

40

50

く又は実質的に阻害することなく A P C を阻害し、出血及び出血性障害の治療、特にトロンビン生成の減少又は A P C 抗凝固性経路活性の増大によって引き起こされる障害に有用な可能性がある。

【 0 1 4 5 】

止血は、傷害に対する正常な凝固反応、すなわち、例えば損傷された血管からの出血又は大出血 (hemorrhage) の防止である。止血は、身体の血管からの出血又は大出血を阻止する。改変セルピンは止血を促進する可能性があり、すなわち、改変セルピンは、身体、例えば出血性障害又は外傷を有する個体の血管からの出血及び大出血の阻止を促進又は増大し得る。

【 0 1 4 6 】

本発明の態様は、ヒト又は動物の身体の治療方法における使用に対する本明細書に記載される改変セルピン、出血を治療する又は止血を促進する方法における使用に対する本明細書に記載される改変セルピン、出血の治療又は止血の促進のための医薬の製造における本明細書に記載される改変セルピンの使用、並びに出血を治療する又は止血を促進する方法であって、それを必要とする個体に本明細書に記載される改変セルピンを投与することを含む、方法を提供する。

【 0 1 4 7 】

出血として、身体の血管からの出血又は大出血が挙げられ得る。

【 0 1 4 8 】

本明細書に記載される改変セルピンによる治療に適した個体は、出血性障害を有する場合がある。

【 0 1 4 9 】

出血性障害は、トロンビン生成の減少又は A P C 抗凝固性経路の活性の増大によって引き起こされるか、又はそれらと関連する場合がある。

【 0 1 5 0 】

出血性障害として、トロンビン生成の減少、フィブリン凝固塊形成の減少又は凝固塊安定性の減少がある任意の遺伝性又は後天性の出血性障害が挙げられ得る。例えば、出血性障害として、第 V I I 因子、第 V I I I 因子、第 X 因子、第 I X 因子、第 X I 因子及び第 X I I I 因子の先天性欠乏、V 及び V I I I の重複欠乏、プロトロンビン欠乏、フィブリン欠乏、並びに他の凝血因子の珍しい欠乏、血友病 A、B、及び C、線溶解亢進と関連する出血の増加、血小板数の減少又は血小板機能の減少に起因する出血の増加、並びに因子 V 局所的活性化欠乏病が挙げられ得る。

【 0 1 5 1 】

後天性出血性障害として、大量失血と関連する希釈性凝固障害、外傷及び手術に起因する出血、並びに抗凝固療法の影響が挙げられる。

【 0 1 5 2 】

幾つかの実施形態では、個体は、外因性の f V I I I 又は f I X 等の外因性凝固因子に対して抵抗性の場合がある。例えば、外因性の f V I I I 又は f I X は個体において免疫応答、例えば抑制性アロ抗体の産生を惹起する場合がある。

【 0 1 5 3 】

本明細書に記載される改変セルピンによる治療に適した個体は、外傷、手術又は抗凝固療法と関連する出血等の後天性出血性障害を有してもよい。例えば、本明細書に記載される改変セルピンによる治療に適した個体は、外傷を受けた場合があるか、又は手術若しくは抗凝固療法を経験した若しくは経験している場合がある。好適な個体は、身体の 1 又は複数の血管から出血している場合がある、又は出血のリスクにある場合がある。

【 0 1 5 4 】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される改変セルピンは、i) 凝固因子アロ抗原を有する患者における出血、ii) 例えは、アロ抗体の発現を回避するためインヒビター発現リスクの高い患者における出血、iii) インヒビター不在下の第 V I I I 因子欠乏を伴う患者における出血、iv) 先天性出血性障害、例えは、重篤な第 V I I 因子欠乏、

10

20

30

40

50

第 X 因子欠乏、VII 及び V の重複欠乏、第 X 因子欠乏及び第 V 因子欠乏等の現在組換えの最適な補充療法が存在しない先天性出血性障害を伴う患者における出血、v) 血友病の患者、例えば、補充療法が不適切若しくは利用不可能な患者における出血、又は vi) 外傷、手術、及び抗凝固療法に関連する出血を含む、後天性出血の予防又は治療において有用な可能性がある。

【 0 1 5 5 】

本発明の他の態様は、本明細書に記載される改変セルピンの凝血促進剤としての使用、出血の治療において APC を阻害するための改変セルピンの使用を提供する。

【 0 1 5 6 】

本開示を考慮して、本発明の様々な更なる態様及び実施形態が当業者に明らかとなる。 10

【 0 1 5 7 】

本発明の他の態様及び実施形態は、「からなる (consisting of)」という用語によって置き換えられる「を含む (comprising)」という用語を伴う上に記載の態様及び実施形態、並びに「から本質的になる (consisting essentially of)」という用語で置き換えられる「を含む (comprising)」という用語を伴う上に記載の態様及び実施形態を提供する。

【 0 1 5 8 】

本出願は、文脈上別段の要求がない限り、上の態様及び上に記載される実施形態のいずれかと互いとの全ての組合せを開示すると理解される。同様に、本出願は、文脈上別段の要求がない限り、好ましい及び / 又は任意の特徴の単独又は他の態様のいずれかとの全ての組合せを開示する。 20

【 0 1 5 9 】

上の実施形態の変更形態、更なる実施形態及びその変更形態は、本開示を読むことで当業者に明らかとなり、したがってこれらが本発明の範囲に含まれる。

【 0 1 6 0 】

本明細書で言及される全ての文書及び配列データベース登録は、全ての目的に対してそれら全体において参照により本明細書に援用される。

【 0 1 6 1 】

本明細書で使用される場合「及び / 又は」は、2つの明示された特徴又は成分の各々と他方とを含む、又は他方を含まない具体的な開示として理解される。例えば、「A 及び / 又は B」は、各々が本明細書で個別に提示される場合と全く同じように、(i) A、(ii) B、並びに(iii) A 及び B の各々の具体的な開示として理解される。 30

【 0 1 6 2 】

ここで、本発明の特定の態様及び実施形態を、例として、また上記の図面及び下記の表を参照して解説する。

【 0 1 6 3 】

表 1 は、A22 PCI (N 末端トランケーションを有し、A1a22 で開始する PCI、ナンバリングはプロペブチドを含む成熟タンパク質配列を使用する)、FL₁ AT Pitts (P1R ピッツバーグ (Pitts) 変異を含む全長₁ AT)、及びそれらのバリアントによるトロンビン及び APC の阻害に対する二次速度定数を示す。標準誤差を示す。* PCI の P2KP1' バリアントによるトロンビンに対する阻害の速度定数は初期阻害の後の推定であり、反応は、潜在的にセルピンが基質経路又は共有結合性のセルピン : プロテアーゼの阻害性複合体の分離を止める (shuttled down) ことに起因して、完全な阻害に近づくことはなさそうである。 40

【 0 1 6 4 】

表 2 は、ヘパリンの存在下での PCI 及びバリアントによるトロンビン及び APC の阻害に対する二次速度定数を示す。標準誤差を示す。* PCI の P2KP1' K バリアントによるトロンビンの阻害の速度定数は、残留トロンビン活性対時間のプロットの初期傾きからの推定である。セルピンが基質経路又は共有結合性のセルピン : プロテアーゼの阻害性複合体の分離を止める可能性があるため、完全な阻害は達成されない。 50

【0165】

表3は、₁AT Pitts及びPCI、並びにそれらのバリアントによるfXaの阻害に対する二次速度定数を示す。標準誤差を示す。

【0166】

表4は、PCI及びPCI P2Kp1'KバリアントによるfXIaの阻害に対する二次速度定数を示す。比較のためAPC阻害を示す(表1より)。標準誤差を示す。

【0167】

表5は、標的化ランダム変異導入によって作製されたPCIバリアントによるトロンビン及びAPCの阻害に対する二次速度定数を示す。標準誤差を示す。比較のためWT及びP2Kp1'PCIに対する定数を示す。¹⁰* PCIのP2Kp1'バリアントによるトロンビンに対する阻害の速度定数は初期阻害の後の推定であり、反応は、潜在的にセルピングが基質経路又は共有結合性のセルピング：プロテアーゼの阻害性複合体の分離を止めることに起因して、完全な阻害に近づくことはなさそうである。

【0168】

表6は、FL ₁AT Pitts C232S及びそのP2Kp1'KバリアントによるfXIaの阻害に対する二次速度定数を示す。比較のためAPC阻害を示す(表1より)。標準誤差を示す。

【0169】

表7は、標的化ランダム変異導入によってトロンビン阻害よりもAPC阻害に対して特異的であると判定されたPCIバリアントのRCL配列の画分を示す。²⁰示される配列は、88の変異体を判断した初期の実験に由来する。本実験において変化されたP4、P2及びP1'の残基を太字で示す。比較のためWT PCI及びP2Kp1'K PCIの配列を示す。

【0170】

表8は、標的化ランダム変異導入によってトロンビン阻害よりもAPC阻害に対して特異的であると判定されたPCIバリアントのRCL配列の画分を示す。示される配列は、460の変異体を判断したより大規模な実験に由来する。本実験において変化されたP4、P2及びP1'の残基を太字で示す。比較のためWT PCI及びP2Kp1'K PCIの配列を示す。

【0171】

表9は、標的化ランダム変異導入によってトロンビン阻害よりもAPC阻害に対して特異的であると判定された₁ATバリアントのRCL配列の画分を示す。³⁰WT ₁AT及び₁AT Pittsの両方と比較して配列を示す。P2残基及びP1'残基を太字で示し、P1残基に下線を引く。接頭辞は、P2バリアントライプラリに由来するP2.n.rと表示される変異体、P1'バリアントライプラリに由来するP1'.n.r.と表示される変異体、及びP2P1'バリアントライプラリのプレート1~5に由来する標識化された変異体1-5.n.r.を含む、特定の変異体に対する起源のライプラリを示す。

【0172】

表10は、トロンビンに対するよりもAPCに対してより特異的であるよう標的化ランダム変異導入によって特定された、₁ATのバリアントのサブセットによるトロンビン及びAPCの阻害に対する二次速度定数を示す。標準誤差が示される。比較のためFL ₁AT Pitts C232S P2Kp1'K及びFL ₁AT Pitts C232Sによるトロンビン及びAPCの阻害に対する二次速度定数を示す。

【0173】

表11は、FL ₁AT Pitts C232Sバックグラウンドに対するランダム変異導入に由来するヒットによる凝血原プロテアーゼの阻害を調べるためのPT及びaPTTアッセイの結果を示す。アッセイに対する感受性を増すため、1/4希釈した血漿を使用してPTアッセイを行い、2回行われたFL ₁AT Pitts C232S P2RP1'Cに対して示される反応を除いて、3回行った。示される誤差は標準偏差である。aPTTアッセイは単独の実験であり、誤差を示していない。PT及びaPTT ⁵⁰

の両方に対して、タンパク質に代えてバッファー（TBS）を血漿に添加したバッファーのみの対照を対照として使用した。対照に関してPT又はaPTTの増加は、凝血原プロテアーゼの阻害の指標である。PT及びaPTTアッセイの両方に対して、セルピン変異体を5μMの濃度で使用した。比較のため、P2K変異体及びP1'K変異体を3回のアッセイの平均として示す。表1及び表3の阻害速度定数から示されるように、これらの変異体はトロンビンよりもAPCに対して高い特異性を示すが、fXaを顕著に阻害する。したがって、これらの変異体は、トロンビン以外の凝血原プロテアーゼの阻害に良好なコンパレーター（comparator）である。NDは特定されていないことを示す。

【0174】

表12は、標的化ランダム変異導入に由来する₁ATバリアントによるfXaの阻害に対する二次速度定数を示す。ここで評価された変異体は、トロンビンよりもAPCに対して特異性、すなわち実質的なAPC阻害を示し、PTの延長は示さなかった。また、大半はわずかなaPTTの延長を示したに過ぎなかった。これらの特徴のため、それらのバリアントを更なる分析に対して選択した。比較のため、FL₁AT Pitts C232S及びFL₁AT Pitts C232S P2KP1'KによるfXa阻害も示す（表3より）。

【0175】

表13は、合理的及びランダムな変異導入による情報を合わせることによって見出された₁ATの2つの更なる変異体の特性の要約を示す。比較のためFL₁AT Pitts C232S及びFL₁AT Pitts C232S P2KP1'Kに対するaPTTは、4つの別々の測定に対する平均であり、示される誤差は標準偏差である。バッファーを用いて血漿について得られた値を括弧で示し、ここでも標準偏差を誤差として示す。Pitts及びP2KP1'Kについて示されるaPTTは、少なくとも3つの別々の測定の結果であり、示される誤差は標準偏差である。括弧に示される値は、バッファーを用いて血漿について得られた値であり、誤差としての標準偏差と共に示される。全てのaPTTは最終濃度5μMのセルピンを使用して得られた。FL₁AT Pitts C232Sは、この濃度で血漿を凝固することができなくなる。示される300秒の値は該アッセイに対するカットオフである。バリアントによるトロンビン、APC及びfXaの阻害に対する二次速度定数を標準誤差と共に示す。

【実施例】

【0176】

実験

凝固カスケード及びこのカスケードにおけるセルピンの調節的役割を図1に示す。外因系カスケード（すなわち組織因子経路）及び内因系経路（接触活性化経路）の2つの経路が凝固カスケードの活性化をもたらす。活性化の主な生理学的経路は外因系経路であると考えられている。この経路では、組織因子（TF）が損傷した血管の表面に露出される。その後、TFはfVIIa及びfVIIに結合することができる。TF:fVIIaはfVIIを活性化し、同様にTF:fVIIはTF:fVIIaへと自然に活性化する。TF:fVIIaはfXをfXaへと活性化し、これがプロトロンビンを凝固カスケードの中心的なプロテアーゼであるトロンビン（fIIa）へと活性化する。トロンビンはプロテアーゼ活性化受容体（PAR）の開裂によって血小板を活性化し、フィブリノゲンをフィブリンへと開裂する。フィブリンは、それ自体がトロンビンによって活性化されるfXIaにより架橋されて安定なフィブリン塊を形成する。さらに、トロンビンはそれ自身の形成を増強するポジティブフィードバック機構を活性化する。トロンビンはfVIIaをfVIIaへと活性化し、fVをfVaへと活性化する。fVIIaはfIXaに結合して内因系テナーゼ（Xase）複合体を形成する。内因系XaseはfXをより活性化する。このfXaはfVaに結合してプロトロンビナーゼを形成することができる。プロトロンビナーゼはプロトロンビンをトロンビンへと活性化し、凝固の開始後に生成されるトロンビンの大半を担う。トロンビンのポジティブフィードバック機構に加えて、

10

20

30

40

50

トロンビンはネガティブフィードバック機構によってそれ自身の活性化を停止することができる。トロンビンがその補因子であるトロンボモデュリン（TM）に結合すると、トロンビン：TM複合体がプロテインC（PC）を活性化プロテインC（APC）へと活性化することができる。APCは開裂し、fVIIa及びfVaの両方を不活性化し、トロンビン生成を効果的に停止する。セルピンは凝固カスケードの重要なインヒビターである。セルピンプロテインCインヒビター（PCI）、抗トロンビン（ATIII）、ヘパリン補因子II（HCII）及び₁-抗トリプシン（₁AT）の阻害作用を図1に示す。

【0177】

以下に本発明者らは、血友病等の出血性障害の治療における凝血促進剤（治療、予防、バイパス又は相乗）としての使用に対する、セルピンのAPCの特異的インヒビターへの変換を説明する。本明細書で記載されるPCI及び₁ATの両方に対する修飾は、これらのタンパク質におけるわずかな変化が特異的APCインヒビターを作製するため使用することができることを原理の証明として示す。

【0178】

当初、PCIはAPCの生理学的インヒビターとして説明されたため、これらの調査に対する開始点としての役割を果たした（Suzuki et al, 1983; 1984）。しかしながら、PCIは乱雑であり、またトロンビン、トロンビン：TM、fXIIa、fXa及びTF：fVIIaも阻害する（Elisen et al, 1998、Mosnier et al, 2001、Suzuki et al, 1984、Fortenberry et al, 2011、Meijers et al, 1988）。結果として、PCIは凝血促進剤及び抗凝血剤の両方として機能することができる。PCIの活性は、ヘパリン及びヘパラン硫酸等のグリコサミノグリカンに結合することによって調節される（Pratt & Church, 1992、Pratt et al, 1992、Li & Huntington, 2008）。凝固カスケードにおけるPCIの役割の概要については図1を参照されたい。

【0179】

₁ATは好中球エラスターの天然インヒビターである（Kalsheker, 1989）。Arg又はLeuのいずれかをP1に有する凝固カスケードの他のセルピンと異なり、₁ATは代わりにMetを有する。これは、₁ATを凝固プロテアーゼの非常に乏しいインヒビターとする。それにもかかわらず、血漿中の高濃度の₁ATのため、₁ATは生理学的に有意な程度までAPCを阻害すると考えられている（Heeb & Griffin, 1988）。P1残基の変異導入は、P1におけるArg又はLeuの使用が₁ATによる凝固プロテアーゼの阻害を大幅に改善することを示した（Heeb et al, 1990）。これは、重篤な出血性障害を引き起こす₁ATのピツバーグ（M358R（P1R）、Pitts）バリエントによって説明される（Owen et al, 1983）。

【0180】

凝血原プロテアーゼよりもAPCの阻害に特異的なセルピンを開発するため、PCI及び₁ATのピツバーグ（P1R、₁AT Pitts）をテンプレートセルピンスカフォールドとして使用した。この研究で使用したタンパク質は全て、pETSUMO発現ベクター（Invitrogen）を使用する大腸菌培養物（NovagenのRosetta2（DE3）pLysS）から発現され、Niクロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフィー、またPCIの場合はヘパリンアフィニティクロマトグラフィーの組み合せを使用して精製した。SUMOプロテアーゼの開裂によって実質的にSUMOタグを除去し、₁ATのピツバーグ（Pitts、P1R）に対するタンデムNi-アニオン交換クロマトグラフィー、及びPCIに対するタンデムアニオン交換-ヘパリンクロマトグラフィーによってタグを除去した。PCIコンストラクトはN末端が切断され、Ala22で開始する（A22、プロペチドから開始する、成熟タンパク質配列に従って番号を付する）。₁AT Pitts（P1R）コンストラクトは全長（FL）であり、発現及び精製の間の分子間のジスルフィド結合形成及び他の修飾を消滅させるため更なるC232S変異を有する（Yamasaki et al, 2011）。使用した発現ベクターに起因して、₁AT Pittsコンストラクトはその第1の残基としてGlu（E）に代えてSer（S）を有

10

20

30

40

50

する。C 2 3 2 S 変異及びE 1 S 変異は、 I_1AT の活性を変更することは予想されていない。

【0181】

様々な位置でP C I 及び I_1AT のピッターバーグのR C LへとLys 残基を導入し、得られた変異体をトロンビン及びA P Cの阻害について試験した。この研究の初期段階では、A P C 阻害を選択して一旦トロンビン阻害が消滅されたという前提に基づき、他の凝固プロテアーゼのインヒビターによる阻害についてスクリーニングも試験も行わず、他の凝固プロテアーゼに対して顕著な残留阻害活性を有した場合に上記インヒビターを更に改変する可能性があった。セルピンに対するSchechter-Berger命名法に従ってR C L 残基に番号を付した (Schechter & Berger, 1967)。

10

【0182】

プロテアーゼよりも過剰のセルピンを使用して擬一次条件下でトロンビン及びA P Cの阻害の速度定数を測定した(表1)。セルピン及びプロテアーゼを様々な長さの時間に亘って共にインキュベートし、プロテアーゼに対する過剰な発色基質(トロンビンに対してS 2 2 3 8、及びA P Cに対してS 2 3 6 6)を添加することによって残留活性を特定した。その後、残留プロテアーゼ活性を405 nmの吸光度に従って測定した。時間に対する残留プロテアーゼ活性のプロットは、実測速度定数 $k_{\text{o}} \text{ b}_s$ を与えた。二次速度定数 k_2 は、 $k_{\text{o}} \text{ b}_s$ 対セルピン濃度のプロットの傾きである(線形回帰モデルを使用して適合させた)。傾きの標準誤差を示す。

【0183】

20

P 2 及びP 1' に導入されたリジン変異は、表1に示される全てのバリエントについてトロンビンよりもA P Cに対するP C I 及び I_1AT の特異性を増すことに非常に有効であった。概してトロンビン阻害は全ての場合で大きく減少した。A P C 阻害もまた全ての変異体について減少したが、同程度ではなかった。いずれのセルピンも当初はA P Cよりもトロンビンを良好に阻害した。これは試験した全ての変異体について逆転した。

【0184】

I_1AT と異なりP C I はヘパリンに結合し、この結合はトロンビン及びA P CのP C I による阻害を著しく増大する(Pratt & Church, 1992)。しがたって、本発明者らは、表1に見られる特異性の交換が持続するかどうかを見るため、ヘパリンの存在下においてP 1' K 変異体及びP 2 K P 1' K P C I 変異体によるトロンビン及びA P Cの阻害を試験した。プロテアーゼよりも過剰なP C I を使用して擬一次条件下で速度定数を測定した。実験に先立って、P C I を等モル濃度の未分画ヘパリンと共に30分間予めインキュベートした。P C I :ヘパリン及びプロテアーゼを変動する時間に亘って共にインキュベートし、ポリブレンと混合したプロテアーゼがヘパリンと結合するように過剰な発色基質の添加によって、幾つかの時間点後の残留活性を特定した。時間に対する残留プロテアーゼ活性のプロットは、実測速度定数 $k_{\text{o}} \text{ b}_s$ を与えた。二次速度定数 k_2 は、 $k_{\text{o}} \text{ b}_s$ 対セルピン濃度のプロットの傾きである(線形回帰モデルを使用して適合させた)。傾きの標準誤差を示す。P 2 K P 1' K P C I によるトロンビンの阻害について計算された値は、完全な阻害は達成されないことをグラフが示唆するように、残留トロンビン活性対時間のプロットの初期の傾きからの推定であった。これは、基質経路又は複合体の解離に起因する可能性がある。二次速度定数を表2に示す。ヘパリンの不在下での阻害について、W T タンパク質と異なり、P C I のP 1' K 変異体及びP 2 K P 1' K 変異体はトロンビンよりもA P C に対して特異的であった(表2)。

30

【0185】

40

これらの実験は、セルピンR C Lに唯一又は2つの改変を導入することは、補因子の存在下と不在化のいずれにおいてもトロンビンの阻害を消滅させるか、又は大きく減少するのに十分であったことを示した。A P Cの阻害は減少されたものの、特にヘパリンの存在下における I_1AT のバリエント及びP C I バリエントに対してかなりの阻害であった。しかしながら、P C I 及び I_1AT P i t t s の特異性はトロンビン及びA P Cに限定されない。これらのセルピンはいずれも別の凝血原プロテアーゼであるf X aも阻害する

50

。また、凝固を阻害しないように、本発明者らのバリアントは f X a よりも A P C に対して特異性である必要がある。したがって、本発明者らは、 P C I 及び γ A T 、並びにそれらのバリアントの f X a に対する阻害の速度定数を特定した(表 3)。プロテアーゼよりも過剰なセルピンを使用し、擬一次条件下で速度定数を測定した。セルピン及びプロテアーゼを変動する時間に亘って共にインキュベートし、残留活性をプロテアーゼに対して過剰な発色基質(S 2 2 2 2)を添加することによって特定した。時間に対する残留プロテアーゼ活性のプロットは、実測速度定数 k_{obs} を与えた。二次速度定数 k_2 は、 k_{obs} 対セルピン濃度のプロットの傾きである(線形回帰モデルを使用して適合させた)。傾きの標準誤差を示す(表 3)。

【 0186 】

10

トロンビンについて先に見られるように、 W T P C I は A P C よりも良好に f X a を阻害した。 γ A T P i t t s は f X a よりも良好に A P C を阻害したが、 f X a の阻害はなおもかなりあった。 f X a の阻害は、 P 1 ' K P C I 、 P 2 K γ A T P i t t s 及び P 1 ' K γ A T P i t t s に対してなおも顕著であった(表 3)。 γ A T P i t t s 及び P C I の P 2 K P 1 ' K バリアントはいずれも、 f X a の阻害がないか、又は無視することができる程度であり、 f X a よりも A P C に対して非常に特異的であったため、有力候補とされた。また、 P C I の P 1 ' K バリアントも、その f X a の阻害がヘパリンの不在下では非常に遅いことから関心が持たれる。ヘパリンの存在が A P C 阻害の速度を著しく加速し、 A P C に有利な特異性の比率を歪ませる可能性があった。

【 0187 】

20

P C I の有力化合物を最初に考察した後、 γ A T の有力化合物を考察する。

【 0188 】

より複雑な血漿系における A 2 2 P 2 K P 1 ' K P C I の特性を調べ、凝血原プロテアーゼに対するいかなる悪影響も排除するため、プロトロンビン時間アッセイ(P T)を行った。このアッセイは、外因系経路により凝固が開始された後に血漿中で凝固塊が形成されるまでの時間を測定する。 A 2 2 W T P C I は凝固時間のわずかな増加を示したのに対し、 P 2 K P 1 ' K はより少ない増加を示し、凝血原プロテアーゼに対する阻害活性の減少と一致していた(図 2)。

【 0189 】

30

さらに、本発明者らは、凝固の接触活性化経路に対する P C I 変異のいかなる影響も排除したかった。そのため、 f X I a の阻害に対する阻害の速度定数を測定し、 a P T T アッセイを行った。このアッセイは、内因系経路によって開始される凝固を測定すること以外は P T アッセイに類似する。

【 0190 】

プロテアーゼよりも過剰なセルピンを使用する擬一次条件下において、 P C I 及び P 2 K P 1 ' K バリアントによる f X I a の阻害に対する阻害の二次速度定数を測定した。セルピン及びプロテアーゼを変動する時間に亘って共にインキュベートし、プロテアーゼに対して過剰な発色基質(S 2 3 6 6)を添加することによって残留活性を特定した。時間に対する残留プロテアーゼ活性のプロットは実測速度定数 k_{obs} を与えた。二次速度定数 k_2 は k_{obs} 対セルピン濃度のプロットの傾きである(線形回帰モデルを使用して適合させた)。傾きの標準誤差を示す。潜在的にプロテアーゼによるセルピンの開裂に起因して、 A 2 2 P 2 K P 1 ' K P C I による f X I a 阻害は、一連の実験に亘って完了することはなかった。 W T と比較して、 P 2 K P 1 ' K 変異体は f X I a に対してより一層減少した阻害、及び f X I a に対するよりも A P C に対してより大きな特異性を示した(表 4)。

40

【 0191 】

a P T T アッセイは、 W T P C I が接触活性化経路の強力なインヒビターであり、 f X I a 又は f X I I a の阻害に起因する可能性があることを示した(図 3)。 P 2 K P 1 ' K 変異体は a P T T においてわずかな増加を示した。しかしながら、接触活性化経路が主に f I X a 活性化による凝固を活性化することから、わずかな接触活性化の阻害は、血

50

友病患者が接触活性化の主な標的 (fIX) 又はその補因子 (fVIII) のいずれかを欠乏することから、血友病患者においては顕著ではない可能性が高い。

【0192】

したがって、本明細書で示される結果は、今のところ A22 P1' K PCI 及び A22 P2KP1' K PCI の両方が血友病の治療用バイパス止血剤への開発に対する有望な APC 特異的な有力化合物であることを示す。

【0193】

トロンビンよりも APC に対して特異性を有する追加の PCI 变異体を作製するため、 PCI スカフォールドに対して標的化ランダム変異導入戦略を用いた。標的化した残基は P4、P2 及び P1' であった。ランダムなアプローチは、96 ウエルフォーマットにおける PCI 発現の後に溶菌液の阻害活性を試験することによる、APC 阻害に対する及びトロンビン阻害に対する選択に基づく。

【0194】

上に概略を述べた特異性に対する試験と合せた合理的変異導入により作製された最も特異的な PCI 变異体、すなわち A22 P2KP1' K PCI を使用して、上記アッセイを較正した。WT PCI を追加の対照として使用した。トロンビンの阻害に対する負の選択は、A22 WT PCI が完全な阻害を示すような時間に亘って溶菌液をインキュベートすることによって達成され、より小さな阻害に対する選択もするため該インキュベーション期間をその時間点から延長した。WT 及び P2KP1' K PCI の両方が APC 阻害活性の中間範囲に含まれるように APC 阻害に対する正の選択を較正し、これにより本発明者らが阻害の増加及び減少の両方を判定することができた。

【0195】

初期のアッセイでは、88 のバリエントをトロンビン及び APC の阻害活性についてスクリーニングした。96 ウエルプレートで培養物を成長させ、誘導し、タンパク質発現を行った。溶解バッファーの添加によって細胞を溶解し、トロンビンについて 1 時間、APC について 30 分間に亘って溶解物をプロテアーゼと共にインキュベートすることにより、トロンビン及び APC に対する阻害活性について溶解物をアッセイした。その後、プロテアーゼに対する発色基質の添加により残留プロテアーゼアッセイを読んだ。A22 WT PCI 及び A22 P2KP1' K PCI を対照として使用した。P2KP1' K PCI と比較して、より高い又は同等の残留トロンビン活性、及びより低い又は同等の残留 APC 活性を有する任意の溶解物を有望な APC 特異的候補とした。これらの配列を表 7 に示す。P4 位、P2 位及び P1' 位を太字で示す。

【0196】

この一組の実験による最も大きな APC 阻害活性を有する变異体 (D8; P4Q P2R P1' N) を予備的な様式で特性評価し、P2KP1' K と異なる変異を利用するが、トロンビンよりも APC の阻害に対してより特異的であることが示された (表 5)。これは、既に記載された変異と同等の効果を有し得るセルビン RCL において、更なる変異を作製することができることを示した。

【0197】

より大きなデータセットを作製するため、更に 460 の变異体を陽性及び陰性の選択アッセイの両方においてスクリーニングした。5つの 96 ウエルプレートにおいて培養物を成長させ、誘導し、タンパク質発現を行った。溶解バッファーの添加により細胞を溶解し、その溶解物をトロンビンについて 1 時間、APC について 30 時間に亘ってプロテアーゼと共にインキュベートすることにより、トロンビン及び APC に対する阻害活性について該溶解物をアッセイした。その後、プロテアーゼに対する発色基質 (トロンビンに対して S2238、APC に対して S2366) の添加により残留プロテアーゼ活性を読んだ。A22 WT PCI 及び A22 P2KP1' K PCI を対照として使用した。P2KP1' K PCI と比較してより高い又は同等の残留トロンビン活性及びより低い又は同等の残留 APC 活性を有する任意の溶解物を、有望な APC 特異的候補とした。このデータセットより、P2KP1' K よりも良好な APC の阻害を示し、より不良又は同等

10

20

30

40

50

のトロンビンの阻害を示したセルピンについてコロニーを選択して配列を決定し、これらのセルピンが実際に真のヒットであり疑陽性ではないことを検証するため、同じアッセイにおいてこれらのセルピンを3回再試験した。この再試験より、初期スクリーンで見出された17の変異体のうち15の一連の変異体をP2K P1' KよりもAPCの阻害においてより良好であるか又は同等であり、トロンビンの阻害においてより不良であるか又は同等であると決定した(表8)。再試験後に陽性であったバリアントの配列を表8に示す。興味深いことに、ランダム変異導入は、P2位及びP1'位における正電荷を持つ残基の有利な効果を確認した。しかしながら、代替的なRCL組成物も見出された。

【0198】

プロテアーゼよりも過剰のセルピンを使用する擬一次条件下において、ランダム変異導入PCIバリアントによるトロンビン及びAPCの阻害に対する予備的な二次速度定数を測定した。セルピン及びプロテアーゼを変動する時間に亘って共にインキュベートし、プロテアーゼに対して過剰の発色基質を添加することによって残留活性を特定した。時間に対する残留プロテアーゼ活性のプロットは実測速度定数 k_{obs} を与えた。二次速度定数 k_2 は、 k_{obs} 対セルピン濃度のプロットの傾きである(線形回帰モデルを使用して適合された)。比較のためWT及びP2K P1' Kを示す。速度定数を表5に示す。示される誤差は傾きの標準誤差である。

10

【0199】

ランダム変異導入アッセイから選択された変異体のうちの幾つかの予備的な特性評価は、選択された変異体がP2K P1' K PCIに対して少なくとも機能的に同等であり、幾つかはわずかに改善されたAPC阻害の速度を有したことを見た(表5)。これらの実験は、P2K P1' KがAPC特異的セルピンを生成するために利用可能であった唯一の組成物ではないことを強く示唆する。

20

【0200】

表1及び表3に示される速度定数による $\text{AT}_{1,1}$ に基づく主な有力化合物は、FL $\text{AT}_{1,1}$ Pitts C232S P2K P1' Kであった。この変異体はトロンビンを阻害することは示されておらず、fXaを徐々に阻害するに過ぎなかったが、APC阻害を保持した(表1及び表3)。

【0201】

より複雑な血漿系におけるこの変異体の特性を調査し、凝血原プロテアーゼに対するいかなる悪影響も排除するため、プロトロンビン時間アッセイ(PT)を行った。このアッセイは、外因系経路により凝固が開始された後の凝固塊形成までの時間を測定する。予測したように、抗凝固剤 $\text{AT}_{1,1}$ Pittsは、そのトロンビン及びfXaの阻害に起因して、凝固時間の増加を示した(図4)。対照的に、 $\text{AT}_{1,1}$ PittsのP2K P1' K変異体は凝固時間の増加を示さず、したがってこのアッセイにおける正常な凝固を干渉しなかった。

30

【0202】

上記データは、今のところ、 $\text{AT}_{1,1}$ PittsのP2K P1' K変異体が外因系(組織因子)経路又は凝固の一般的経路のいずれにおいても凝血原プロテアーゼを干渉しなかったことを示した。さらに、本発明者らはFL $\text{AT}_{1,1}$ Pitts C232S P2K P1' Kが内因系(接触活性)経路に影響を及ぼすかどうかを判定したいと考えた。プロテアーゼよりも過剰のセルピンを使用する擬一次条件の下、FL $\text{AT}_{1,1}$ Pitts C232S及びP2K P1' KのバリアントによるfXIaの阻害の二次速度定数を測定した。セルピン及びプロテアーゼを変動する時間に亘って共にインキュベートし、プロテアーゼに対する過剰な発色基質(S2366)の添加によって残留活性を特定した。時間に対する残留プロテアーゼ活性のプロットは、実測速度定数 k_{obs} を与えた。二次速度定数 k_2 は、 k_{obs} 対セルピン濃度のプロットの傾きである(線形回帰モデルを使用して適合された)。傾きの標準誤差を示す。

40

【0203】

fXIは接触活性化経路の間に活性化され、fIXを活性化することによって凝固の一

50

一般的な経路へと入る。さらに、f X I はトロンビンによって一旦凝固が開始されると活性化される。f X I a は F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S によってかなりの程度阻害されたが、この阻害は F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K について大きく減少された（表 6）。

【 0 2 0 4 】

₁ A T P i t t s の P 2 K P 1 ' K 変異体による f X I a の阻害がわずかに検出されたことから、f X I I a に対するあらゆる可能性のある悪影響を特定するため、本発明者らは a P T T アッセイを更に行つた。このアッセイは、凝固の内因系経路によって開始された凝固を測定する以外は P T アッセイに類似する。それにより a P T T を使用して、f X I a 及び凝固の接触活性化経路に対するあらゆる悪影響を検出することができた。このアッセイでは、F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S と共にインキュベートした血漿は、0 . 6 7 μM のセルピンを用いた 1 つの反応以外は上記アッセイの時間内に凝固しなかった（図 5 A）。F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K は、凝固時間のわずかな増加を示したが、用量依存性の増加はなかった（図 5 B）。これは、F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K の f X I a 阻害活性は非常に遅い可能性が高いため、接触活性化経路に顕著に影響を及ぼさないことを示す。さらに、接触活性化経路は f I X a の活性化によって凝固カスケードを活性化する。血友病患者は f I X 又はその必須の補因子である f V I I I のいずれかを欠くことから、血友病患者における接触活性化経路のわずかな阻害の役割は最小である可能性が高い。

【 0 2 0 5 】

₁ A T P i t t s の P 2 K P 1 ' K 変異体が血漿系において A P C を阻害することができたかどうかを調べるために、本発明者らは改良したトロンビン生成アッセイ（T G A）を使用した。組換え可溶性トロンボモデュリン（T M）の存在下及び不在下において、ヒトのプールした正常血漿（N P）中におけるトロンビン生成を測定した。この T M は H E K - E B N A 発現系から発現され精製され、可溶性細胞外ドメインを含む。T M は、生理学的には膜貫通タンパク質であることから通常は T G A に存在せず、内皮膜上に存在し、血漿にはほとんど存在しない。したがって、P T アッセイ及び a P T T アッセイ等の通常の T G A 又は血漿を利用する他の凝固アッセイにおける P C 経路の活性化はない。上記アッセイに T M を添加することは P C 活性化を可能とし、それによって in vivo におけるトロンビン生成の更なる現実感を与える可能性がある。図 6 及び図 7 に示されるアッセイを、George King Biomedical 製のプールした正常なヒト血漿（N P）において行った。外因系経路による凝固を活性化するため、C a C l ₂ 及び T F / リン脂質（Technoclone 製の R B l o w T F 及び リン脂質試薬）の添加により凝固を開始した。蛍光発生基質（Z - G l y - G l y - A r g - A M C）の開裂によりトロンビン生成を測定した。Technothrombin 較正キット（Technoclone）を使用して、既知濃度のトロンビンに対して蛍光単位を較正することにより、蛍光単位をトロンビン濃度に変換した。

【 0 2 0 6 】

プールした正常な血漿への T M の添加は、濃度依存的な方式でトロンビン生成を減少した。この実験より、本発明者らは、中間レベル（1 . 2 5 n M の T M 最終アッセイ濃度）又は低レベル（1 0 n M の T M 最終アッセイ濃度）のいずれかまでトロンビン生成をノックダウンするため 2 つの T M の濃度を選択した。F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K の血漿において A P C を阻害する能力を評価するため、後のアッセイにおいてこれらの濃度を使用した。

【 0 2 0 7 】

正常ヒト血漿（N P）への F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S の添加は、使用した全ての濃度においてトロンビン生成を減少し、これはトロンビン及び f X a の阻害による可能性が高い（図 6）。対照的には、F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K は T M の不在下では N P に対して何らの影響も有しなかった（図 7 A）。しかしながら、T M の存在下では、F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K は用量依存的にトロンビン生成を補助した（図 7 B ~ 図 7 D）。この効果は、F L

10

20

30

40

50

₁ A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K による A P C の特異的阻害の結果である。

【 0 2 0 8 】

f V I I I 欠乏又は f I X 欠乏の血漿において同じ実験を行うため、ベースライン条件 (R B 誘発のみ) では因子欠乏血漿においてトロンビン生成を検出することができないことから、上記アッセイを開始するために使用される組織因子 (T F) の量を増加する必要があった。トロンビン生成に対する T F における増加の影響を実証するため、ベースライン条件において上記アッセイを誘発するため使用される R B 試薬に加えて T F 試薬の種々の希釈液 (Siemens 製の D a d e I n n o v i n) を用いて反応をスパイクした。In 10 n o v i n 試薬における T F の濃度は製造業者によって開示されていないが、以前の測定からおよそ 7 . 3 6 n M であることが分かっている (Duckers et al, 2010)。T F 誘発を増大することは遅延時間を短縮し、ヒト N P 、 f V I I I 欠乏 (H A) 及び f I X 欠乏 (H B) の血漿におけるピーカトロンビン及び内因性トロンビン活性 (E T P) の両方を増大した。これらの実験より、本発明者らは、トロンビン生成を開始するため最終反応において 1 : 4 0 0 0 の In n o v i n 希釈率を選択した。上記アッセイにリン脂質を添加する必要があるため、リン脂質及び T F の両方を含有する R B 試薬を添加した。

【 0 2 0 9 】

因子欠乏血漿の使用はアッセイパラメーターの修正を必要とするため、本発明者らは、1 : 4 0 0 0 の In n o v i n の添加によるヒト H A 血漿におけるヒトの正常なプールされた血漿に対して T M 滴定実験を繰り返した。上記アッセイを George King Biomedical 製のヒト f V I I I 欠乏血漿 (f V I I I 活性 1 % 未満) において行った。外因系経路による凝固を活性化するため 1 : 4 0 0 0 の最終希釈率の D a d e I n n o v i n (Siemens) を含む C a C l₂ 及び / 又は T F / リン脂質 (Technoclone 製の R B l o w T F 及びリン脂質試薬) の添加により凝固を開始した。蛍光発生基質 (Z - G l y - G l y - A r g - A M C) の開裂によりトロンビン生成を測定した。T e c h n o t h r o m b i n 較正キット (Technoclone) を使用して、既知濃度のトロンビンに対して蛍光単位を較正することにより、蛍光単位をトロンビン濃度に変換した。トロンボモデュリン (T M) は、f V I I I 欠乏血漿 (H A) におけるトロンビン生成アッセイ (T G A) でトロンビン生成を減少することが分かった。

【 0 2 1 0 】

この実験より、1 . 2 5 n M 及び 5 n M の T M を後の実験のため選択した。主に使用した上記アッセイ条件における H A 血漿中での総トロンビン生成がより低かったため、使用した高い T M 濃度は N P に対するよりも低かった。

【 0 2 1 1 】

H A 及び H B の血漿に対する F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S 及び F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K の両方の効果は、プールした N P による結果に匹敵した。F L ₁ A T P i t t s は、H A 血漿 (f V I I I 欠乏) 及び H B 血漿 (f I X 欠乏) の両方における T M の存在下及び不在下でのトロンビン生成を阻害した (図 8)。F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K は、f V I I I 欠乏及び f I X 欠乏の血漿の両方におけるトロンビン生成に対する T M の効果を補助することができ、T M の不在下で何らの影響も有しなかった (図 9 及び図 1 0)。これは、F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K が A P C を阻害することができ、因子欠乏血漿における凝血促進効果を有することを示す。これは、F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K が凝固塊形成を促進する可能性があり、血友病患者における出血を軽減し得ることを意味する。この凝血促進効果の大きさは、in vivo におけるトロンビン生成の減少に対するプロテイン C 系の相対的な寄与によって特定される。本明細書に示されるこの in vitro 実験を使用して、この変異体の in vivo のおおよその有効性を予測することができないが、複雑な血漿系において、F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K が A P C を阻害することができ、凝血促進経路に干渉しないこと、またこれらの効果が f I X 及び f V I I I の存在又は不

10

20

30

40

50

在と独立していることを確かに示している。

【0212】

本発明者らは、本発明者らの *in vitro* データを検証するため、*in vivo* の血友病のマウスモデルを使用したいと考えた。しかしながら、ヒト₁AT のマウス血漿に対する効果がヒト血漿において見られる効果に匹敵し得ることを検証するため、本発明者らはマウス血漿において最初に TGA を行った。これを修正した TGA プロトコルを使用して行った (Bunce et al, 2011; Ivanciu et al, 2011)。標準的な条件下で TGA アッセイを妨げるマウス血漿中の阻害タンパク質の濃度の増加のため、これらの改変が必要であった (Tchakovsky et al, 2007; Bunce et al, 2011; Ivanciu et al, 2011)。ヒトの系と同様に、アッセイのベースライン条件の下で HB マウス血漿におけるトロンビン生成はなかった。したがって、本発明者らは異なる濃度の Innovin における滴定スパイク (titration spiking) を行った。後のアッセイのため 1 : 12000 の Innovin の濃度を選択した。
10

【0213】

ネズミ科動物の TM を入手することができなかっただけ、本発明者らは、マウス TGA アッセイにおいて APC 形成を促進するためヒト血漿 TGA において使用した可溶性ヒト TM を使用した。HB マウス血漿中のヒト TM のあらゆる影響を見るために必要な濃度は、ヒト血漿で見られるよりも約 100 倍高かった。これは、ヒト TM ノックインマウスがネズミ科動物 PC を活性化する能力の減少を示すという観察によって説明され得る (Raife et al, 2011)。これは、ヒト TM がネズミ科動物 TM よりもネズミ科動物 PC 活性化を促進する作用が弱いことを示す。750 nM の濃度のヒト TM を後の実験で使用した。
20

【0214】

その後、種々の濃度の FL₁AT Pitts C232S 及び FL₁AT Pitts C232S P2KP1'K の両方を、これらの変異体のマウス血漿における効果を先のヒト血漿における TGA の結果と比較するため、TM の不在下及び存在下の両方において、マウス HB 血漿で規定された条件に対して添加した。

【0215】

FL₁AT Pitts C232S は、ヒト血漿で見られるように、TM の不在下でマウス HB 血漿においてトロンビン生成を減少した (図 11A)。しかしながら、TM の存在下では、最も低濃度の FL₁AT において、トロンビン生成の部分的な補助があった (図 11B)。これは、ヒトにおいて見られる速度と比較して、生成された APC がトロンビン阻害に先立って阻害されるように、FL₁AT Pitts によるネズミ科動物トロンビン及びネズミ科動物 APC に対する阻害の相対的速度の差に起因する可能性がある。FL₁AT Pitts C232S の濃度が、全ての APC が阻害されたレベルまで増大されると、トロンビンも阻害される。これは、図 11B に見られる結果を説明し得るが、更に調査をしなかった。FL₁AT Pitts C232S P2KP1'K は、ヒト血漿で行ったように、HB マウス血漿において TM 添加によってトロンビン生成ノックダウンを補助した (図 11D)。しかしながら、TM の不在下で FL₁AT Pitts C232S P2KP1'K を HB マウス血漿に添加した場合、トロンビン生成の増大も観察された (図 11C)。この効果は、これらの実験で採用された採血方法に関連する可能性がある。血漿を採取するため、尾部を切断し、クエン酸中に血液を採取した。その後、これを遠心沈殿させて血漿を除去し、凍結した。採血のため負わせた傷害は凝固系の活性化をもたらし、実験に先立って血漿中に APC の生成を引き起こす場合がある。さらに、マウスは血漿中に PCI を有さず (Zechmeister-Machhart et al, 1996)、これは APC の循環半減期を増加する可能性があり、そのため PCI は TGA アッセイに先立って不活性化されない。現時点で排除することができない代替的な説明は、マウス血漿におけるオフターゲット凝血促進効果であろう。しかしながら、この効果はヒト血漿中では見られないことから、マウス特異的抗凝固性プロテアーゼの阻害に関与し得る。
30
40

【0216】

F L 1 A T Pitts C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K の可能性のある *in vivo* 効果を調べるために、また血友病の予防剤又は治療のいずれかとして有用な可能性があるかどうかを判定するため、本発明者らは 2 つの *in vivo* マウスアッセイ、すなわちテールクリップ及び精巣挙筋細動脈レーザー傷害モデルを使用した。使用したマウスは、BALB/c バックグラウンドの雄性 FIX ノックアウトマウスであった (Lin et al, 1997; Ivanciu et al, 2011)。

【0217】

テールクリップアッセイでは、尾静脈を通してタンパク質又はバッファーを注射し、5 分間のインキュベーション期間の後、尾部を直径 3 mm で切断し、37 °C の水浴中の 14 mL の 37 °C 生理食塩水溶液に入れた。10 分間に亘って血液を採取し、得られた失血を 575 nm で吸光度を測定することによる赤血球溶解後の総ヘモグロビンを測定することによって定量した (Ivanciu et al, 2011)。尾部切断により採取された既知容量の血液をテールクリップ試料と類似の方式で加工し、標準曲線を作成することによって失血容量を計算した。赤血球溶解の後、575 nm での吸光度を特定し、失血容量に対してプロットして標準曲線を作成した。テールクリップアッセイは、F L 1 A T Pitts C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K の強力な凝血促進効果を示した (図 12)。15 mg / kg の用量において、HB マウスの失血を、PBS を注射した WT マウスのレベルまで回復した (図 12)。より低用量の F L 1 A T Pitts C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K もまた、HB マウスに関して出血の減少傾向を示したが、これは統計学的には有意ではなかった。F L 1 A T Pitts C 2 3 2 S は、7.5 mg / kg で失血に対して有意な効果を示さなかった。

【0218】

凝血促進剤を評価するため使用した別の *in vivo* モデルは、生体内精巣挙筋細動脈レーザー傷害モデル (Falati et al, 2002) である。この系では、マウス頸静脈にカニユーレを挿入して治療用タンパク質、またフィブリン及び血小板に対する蛍光タグ付抗体の注入を可能とする。その後、精巣挙筋を画像化のため広げる。細動脈に対するレーザーによる傷害誘導後の凝固塊形成を画像化し、蛍光顕微鏡を使用して定量する。

【0219】

全体的な質的判断のため、傷害を 3 つのカテゴリー、すなわち、凝固塊なし (蛍光が検出されなかった)、血小板凝固塊 (血小板のみが見える、これらの凝固塊は一般的には不安定であり一連の画像化の間に溶解した)、及び血小板 + フィブリン (血小板及びフィブリンの両方の蛍光が見え、一連の画像化の間凝固塊は安定なままであった) に選別した。これは、F L 1 A T Pitts C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K の増大する濃度に伴って、安定な血小板及びフィブリンの凝固塊形成において用量依存的な増加があったことを示した (図 13)。全ての画像を血小板及びフィブリンの蛍光について定量した。各時間点に対する中央値を計算し、結果を図 14 にプロットした。これらのデータは、図 13 に対して割り当てられたカテゴリーに関わらず、全て画像からの定量を含んだ。中央値のプロットは、対照又は F L 1 A T Pitts C 2 3 2 S を注入されたマウスは凝固塊形成を呈しなかったのに対し、高用量及び低用量のいずれの F L 1 A T Pitts C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K も傷害部位における血小板の凝集及びフィブリンの堆積を示したことを示す。血小板凝集に関して 2 つの用量の間で差は検出することができなかった。フィブリンについて、F L 1 A T Pitts C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K に対するフィブリン堆積、及び対照又は F L 1 A T Pitts C 2 3 2 S のいずれかを注入されたマウスに対するフィブリンがないことについて用量依存的な増加があった (図 14)。

【0220】

まとめると、これらの結果は、F L 1 A T Pitts C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K が *in vitro* アッセイ及び血友病の *in vivo* モデルの両方において凝血促進効果を有することを示す。*in vivo* 実験は全て、血友病 B のマウスモデルにおいて行ったが、ヒト血漿における TGA の結果 (図 9 及び図 10)、及び F L 1 A T

P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1 ' K の提案された作用機序は、その凝血促進効果は f I X 又は f V I I I の欠乏と無関係のはずであることから、血友病 A 及び B の両方において使用され得ることを示す。 i n v i v o で見られた凝血促進効果は、 W T マウスについて見られたものと同じレベルまで出血を減少するのに十分であり（図 12）、 A P C を阻害するセルピンを、予防として、又は既存の治療に対するアジュバントとしてのみならず出血障害の治療に使用可能であることを示す。

【 0 2 2 1 】

また、₁ A T スカフォールドに対する可能性のある更なる A P C 特異的変異体を探索するため、₁ A T スカフォールドに対して標的化ランダム変異導入の戦略を採用した。

【 0 2 2 2 】

F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S バックグラウンドに対して 3 つの異なる ₁ A T バリアントライブリ、すなわち P 2 においてランダム化されたもの、 P 1 ' でランダム化されたもの、及び P 2 と P 1 ' との両方においてランダム化された第 3 のライブリを作製した。得られたプラスミドライブリを R o s e t t a 2 (D E 3) p L y s S 発現株に形質転換し、 9 6 ウエルプレートでタンパク質を発現させた。細菌を溶解し、溶解物をトロンビン及び A P C の阻害についてアッセイした。

【 0 2 2 3 】

シングルバリアントのライブリに対して、 1 つのライブリ当たり 8 8 のコロニーをアッセイした。ダブル（ P 2 P 1 ' ）バリアントライブリに対して、 4 6 0 のコロニーをアッセイした。 F L ₁ A T P i t t s 及び F L ₁ A T P i t t s P 2 K P 1 ' K (有力な A P C 特異的バリアント) を参照として全てのアッセイプレートで発現させた。 P 2 K P 1 ' K ₁ A T と比較して、より高い又は同等の A P C 阻害活性（より低い又は同等の残留 A P C 活性）を有し、より低い又は同等のトロンビン阻害活性（より高い又は同等の残留トロンビン活性）を有するバリアントを、トロンビンよりも A P C に対して特異的なバリアントの候補と考えた。候補バリアントのサブセットを選別し、同じ設定で再度アッセイして第 1 のスクリーンによる結果を検証した。その後、両方のアッセイで同様の特性を示す変異体の配列決定を行った。得られた配列を表 9 に示す。トロンビンよりも A P C に対して特異的であったバリアントを選び出すためのこのアッセイの能力を検証するため、表 9 で同定された 9 つのバリアントをより大きな規模で大腸菌において発現させ、精製した。その後、各変異体についてトロンビン及び A P C に関する阻害の二次速度定数を決定した。結果を表 10 に示す。これらの結果は、試験された全てのバリアントが、 F L ₁ A T P i t t s C 2 3 2 S バリアントは異なり、トロンビンに対するよりも A P C に対してより高い特異性を有したことを見出しました。

【 0 2 2 4 】

幾つかの種類の残基は、 P 2 位及び P 1 ' 位の両方で ₁ A T P i t t s スカフォールドにおいて有利であった（表 9 ）。特異性は、主に P 2 及び P 1 ' における大きな極性残基（ Q 、 N 、 Y ）、大きな疎水性残基（ W ）、又は正電荷を持つ残基（ R 、 H 、 K ）の存在によって与えられた。これらの位置に見られる他の残基として、 C 、 A 、 T 、 S 及び V が挙げられる。これらの中～小の残基は、他の位置に、特異性の交換に対してより大きな影響を有する可能性が高い、補完する大きな正電荷を持つ残基（ R 、 K ）、又はより大きな極性残基（ Y 、 N 、 Q ）をダブルバリアントライブリにおいて伴った。しかしながら、特に P 1 ' が R である場合に、これらの変異体の協同効果が存在することもあり得る。 P 1 ' R は、シングルバリアントライブリのスクリーンにおいて変化しやすい結果を示し、いくらかの残留トロンビン阻害活性を有する可能性がある。 P 2 P は基質のトロンビン開裂に重要であることが知られている（ Gallwitz et al , 2012 ）。 P 1 ' における特異性交換変異とつながるこの残基の単純な除去は、わずかな残留トロンビン阻害活性を有する A P C 特異的インヒビターの作製に十分な可能性がある。特に P 2 の T は、それ自体に対していくらかの効果を有し、 P 1 ' のパートナー残基（ Q 、 N 、 Y 、 R ）のうち、 R のみがそれ自体で特異性交換をもたらすのに十分であるとして单一残基 P 1 ' バリアントライブリにおいて同定された。

10

20

30

40

50

【0225】

興味深いことに、₁ A T P i t t s 対照の周りに集まった非特異的変異体は大半が₁ A T P i t t s であったことが示された。全て P 2 P を保持し、トロンビン阻害活性の維持におけるその重要性を示した。P 1' はより変動的であり、P 1' バリアントライブラリの変異体の分布と一致した。P 2 及び P 1' のライブラリにおけるバリアントの拡散を比較すると、トロンビンは P 2 変異よりも P 1' 変異に対してより寛容のようである。しかしながら、シングルバリアントライブラリに存在しなかった、ダブルバリアントライブラリにおける有利な残基の出現は特異性に対するこれらの残基の効果が協同的である可能性があり、特異性の増大において単一変異よりも二重変異の方がより効果的な可能性があることを示す。

10

【0226】

上に提示されるランダム変異導入の結果は、既に同定されたリジン変異以外のトロンビンよりも A P C に特異性を示す変異体の作製が可能であったことを示した。これまで、ランダム変異導入戦略が使用され、トロンビンに対する特異性が一旦得られれば、これらの変異体は他の凝固原プロテアーゼよりも A P C に対してある程度の特異性も示すであろうとみなされてきた。これを試験するため、表 10 のランダム変異体の P T 及び a P T T を試験した。これらの結果を表 11 に示す。F L 1 A T P i t t s C 2 3 2 S に対して先に示されたのと異なり、いずれの変異体も P T に対して顕著な効果を有しなかった（図 4）。これは、その変異体が凝固原プロテアーゼに対する阻害活性を大幅に喪失したという指標を提供する。しかしながら、a P T T はインヒビターの存在に対してより感受性である。したがって、a P T T の手段は、より小さな残留阻害のより正確な表示を与える。先の実験（図 5）は、F L 1 A T P i t t s C 2 3 2 S が a P T T アッセイにおいて血漿を凝固不可能（uncloitable）とすることを示した。対照的に、ここで 1 つの変異体のみがこの効果を示した（P 2 T P 1' N）。P 2 K P 1' H 及び P 2 K P 1' N 等の幾つかの変異体は、比較的小さい a P T T の延長を示したに過ぎず、したがって興味深い可能性があった。

20

【0227】

これらの結果より、本発明者らは 4 つの変異体、P 2 R、P 2 Q P 1' K、P 2 K P 1' H 及び P 2 K P 1' N を選択した（全て P i t t s、P 1 R バックグラウンドに対する）。これらの変異体は、トロンビンよりも A P C の高い阻害（表 10）、また幾つかについては a P T T (P 2 K P 1' H 及び P 2 K P 1' N) の短い延長のいずれかを示した。これらの変異体が P T を延長しなかったことから、変異体は T F : f V I I a を阻害することはなさそうである。a P T T の延長に対して最も可能性の高い候補は、f X I a 又は f X a の阻害であろう。これらのうち、f X a 阻害は、凝固の初期段階を最も阻害し得ることから、好結果のインヒビターに対するより顕著なバリアとみなした。したがって、これら 4 つの変異体による f X a の阻害に対する阻害定数は、上述のように決定された（表 12）。P 2 R は f X a の顕著な阻害を示し、これは a P T T の延長の理由である可能性がある。他の 3 つの変異体はより低い f X a 阻害を示したが、いずれの変異体も先に同定された P 2 K P 1' K 変異体ほど特異的ではなかった。それにもかかわらず、P 2 K P 1' N、P 2 Q P 1' K 及び P 2 K P 1' H は、トロンビン及び f X a よりも A P C に対して特異性を示すことから、更なる開発のための追加の有望な候補を代表する。さらに、それらの A P C の阻害は、先に記載される P 2 K P 1' K 変異体に関して、およそ 2 倍増大される。このより速い阻害は、わずかに減少した特異性を部分的に補償する可能性がある。

30

【0228】

しかしながら、これらの結果は、トロンビンよりも A P C に対する特異性について選択することが、f X a 及び他の凝固原プロテアーゼに対しても特異性を示すインヒビターを設計するために完全に十分ではないことを示した。したがって、ランダム変異導入の戦略を更に拡大した。低いトロンビン阻害及び A P C 阻害を維持しながら、減少した f X a 阻害を有する、トロンビンよりも A P C に対する特異性について先に選択された変異体を、

40

50

f X a 及び選択された変異体に対して再度スクリーンした。

【0229】

4つの更なる変異体をこの追加のスクリーンより同定した。これらは全てP1R変異を有し、更にP2RP1'A、P2RP1'Q、P2WP1'I又はP2WP1'Hのいずれかを有した。これらの変異体の特異性を検証するため、1つの濃度のセルピンのみを使用し、変異体のトロンビン及び*f X a*の阻害を試験する初期の実験を行った。変異体がトロンビン及び*f X a*の低阻害に基づいて選択されたことから、APC阻害はこの段階では考慮しなかった。セルピン及びプロテアーゼを種々の時間に亘ってインキュベートし、指定の時間点で過剰な発色基質の添加により反応を停止した。残留プロテアーゼ活性を初期プロテアーゼ活性で除し、この値の自然対数を時間に対してプロットした(図15)。セルピン濃度で除されたこの線の傾きは、阻害の二次速度定数の推定を与える。これらのアッセイは、最も速いインヒビターである二次速度定数約 $50.3\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ を有するP2WP1'Hによる(FL₁AT Pitts C232Sの阻害定数 $2.928 \times 10^5\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ と比較して)以外は、全ての変異体がほとんどトロンビンを阻害しないことを示した。しかしながら、P2RP1'A、P2WP1'I及びP2WP1'Hは、*f X a*に対しては顕著な阻害を示した。二次速度定数は、FL₁AT Pitts C232Sと比較してわずか約10倍減少されたに過ぎない(FL₁AT Pitts C232Sに対する $4.13 \times 10^4\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ と比較して、P2RP1'Aに対して $4070.1\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)。P2RP1'A、P2WP1'I及びP2WP1'Hは、互いに同様の*f X a*阻害を示した。10
20

【0230】

1つの変異体のみがトロンビン及び*f X a*の両方に対して特異的な選択性を示した。この変異体はPitts(P1R)変異に加えてP2RP1'Qを有した。その選択性のため、より徹底的な調査が興味深かった。ランダム及び合理的な変異導入の研究の両方による先の結果は、R残基及びK残基が合理的に同様に作用することを示した。したがって、本発明者らは、本明細書に示される結果から同様の特性を有すると予想される、P1Rバックグラウンドに対するP2KP1'Q変異体も作製した。両方の変異体に対する阻害定数の測定及びaPTT(前に記載される通り行われた実験)による結果を表13に示す。比較のためP2KP1'K変異体を示す。P2KP1'Q及びP2RP1'Qは、いずれもトロンビン及び*f X a*の非常に低い阻害を示した。さらに、aPTTにはほぼ何らの効果もなかった。APC阻害は、P2KP1'Kと比較してごくわずかに減少されたに過ぎず、顕著であった。したがって、これら2つの変異体は、P2KP1'Kと同様に作用すると期待され、更なる開発のための他の有望な可能性のある代替分子を代表する可能性がある。30

【0231】

本発明者らは、FL₁AT Pitts C232S P2KP1'Kによるネズミ科動物のトロンビン及びAPCの阻害を評価した。トロンビン及びAPCを組換え起源から得た。APCに対してはEGF2-プロテアーゼドメインのみ(G1a-ドメインレスAPC)、及びトロンビンに対してはプロテアーゼドメインを含めて、使用したプロテアーゼを血漿型に応じて切断する。したがって、本発明者らは、任意の差がコンストラクトの差よりも種の差に起因することを確実にするため、これらのプロテアーゼのヒト型も試験した。ヒト及びネズミ科動物のトロンビンは、SDS-PAGEによりFL₁AT Pitts C232S P2KP1'Kと全く反応性を示さないか、又は非常にわずかな反応性を示し、これに関して、モデル系による結果がヒト系に適切であろうことを示した。阻害の二次速度定数は、ヒト血漿APCに対する(14.88 ± 1.87) $\times 10^3\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ と比較して、ヒトG1a-ドメインレスAPCに対して(8.14 ± 0.58) $\times 10^3\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ であり、ネズミ科動物G1a-ドメインレスAPCに対して(3.80 ± 0.37) $\times 10^3\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ であった。これらの結果は、マウスマodelにおける変異の反応性がヒトにおけるよりも低い可能性がある、すなわち、同じ効果に対する相対的用量がより高くななければならない可能性があるものの、プロテアーゼ40
50

阻害に関する効果は同様である可能性が高いという指標を提供する。

【0232】

提示されるデータは、原理証明として、セルピンスカフォールドを、非常にわずかな変異を使用して特異的なA P C インヒビターを作製するため使用することが可能であることを示し、これらのインヒビターが *in vitro* と *in vivo* の両方で凝血促進活性を有することができ、それ自体が血友病等の出血性障害の治療及び予防に対する凝血促進剤として有望であることを示す。

【0233】

参考文献

- | | |
|--|----|
| Berntorp E (2009) <i>Haemophilia</i> 15: 3-10 | 10 |
| Bertina RM, et al (1994) <i>Nature</i> 369: 64-67 | |
| Bohn RL et al (2004) <i>Haemophilia</i> 10: 63-68 | |
| Bolton-Maggs PHB & Pasi KJ (2003) <i>Lancet</i> 361: 1801-1809 | |
| Brettler DB (1996) <i>Baillieres Clin. Haematol.</i> 9: 319-329 | |
| Brummel-Ziedins KE et al (2011) <i>J. Thromb. Haemost.</i> 9: 2262-2267 | |
| Bunce MW et al (2011). <i>Blood</i> 117: 290-298 | |
| Butenas S et al (2006) <i>J. Thromb. Haemost.</i> 4: 2411-2416 | |
| Carrell R et al (1985) <i>Trends in Biochemical Sciences</i> 10: 20-24 | |
| Chuansumrit A et al (2000) <i>Haemophilia</i> 6: 61-65 | |
| De Nanteuil G et al (2006) <i>J. Med. Chem.</i> 49: 5047-5050 | |
| Di Minno MND et al (2010) <i>Haemophilia</i> 16: e190-201 | |
| DiMichele D (2007) <i>J. Haematol.</i> 138: 305-315 | |
| Duckers C et al (2010) <i>Blood</i> 115: 879-886 | |
| Elisen MGLM et al (1998) <i>Blood</i> 91: 1542-1547 | 20 |
| Escobar MA (2010) <i>Haemophilia</i> 16 Suppl 3: 29-34 | |
| Escobar M & Sallah S et al (2013) <i>J. Thromb. Haemost.</i> 11, 1449-1453. | |
| Falati S et al (2002) <i>Nat. Med.</i> 8: 1175-1181 | |
| Fortenberry YM et al (2011) <i>J. Thromb. Haemost.</i> 9: 861-863 | |
| Franchini M & Lippi G (2010) <i>Thrombosis Research</i> 125: 119-123 | |
| Fukudome K et al (1996) <i>J. Biol. Chem.</i> 271: 17491-17498 | |
| Gallwitz et al (2012) <i>PLoS ONE</i> 7(2): e31756 | |
| Gettins PGW (2002) <i>Chem. Rev.</i> 102: 4751-4803 | |
| Gringeri A et al (2003) <i>Blood</i> 102: 2358-2363 | |
| Haya S et al (2007) <i>Haemophilia</i> 13 Suppl 5: 52-60 | |
| Heeb MJ & Griffin JH (1988) <i>J. Biol. Chem.</i> 263: 11613-11616 | |
| Heeb MJ et al (1990) <i>J. Biol. Chem.</i> 265: 2365-2369 | |
| Hopkins et al (1993) <i>Biochemistry</i> 32: 7650-7657 | |
| Hua B et al (2009) <i>Haematologica</i> 94: 881-884 | 30 |
| Huntington JA et al (2000) <i>Nature</i> 407: 923-926 | |
| Irving et al (2000) <i>Genome Res.</i> 10: 1845-1864 | |
| Ivanciu L et al (2011) <i>Nat. Biotechnol.</i> 29: 1028-1033 | |
| Kalsheker N (1989) <i>Biosci. Rep.</i> 9: 129-138 | |
| Laurell CB et al (1977) <i>Clin Sci Mol Med</i> 52: 457-461 | |
| Laurell M et al (1990) <i>Blood</i> 76: 2290-2295 | |
| Lee M et al (2006) <i>Haemophilia</i> 12 Suppl 3: 1-7 | |
| Li W & Huntington JA (2008) <i>J. Biol. Chem.</i> 283: 36039-36045 | |
| Li W et al (2008) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 105: 4661-4666 | |
| Lin HF et al (1997) <i>Blood</i> 90: 3962-3966 | |
| Lowe, G.D. & Ludlam, C.A. (2008) <i>J. Thromb. Haemost.</i> 6, 1982-1983. | |
| Lu D et al (1996) <i>Blood</i> 87: 4708-4717 | |
| Mannucci PM (2003) <i>J. Thromb. Haemost.</i> 1: 1349-1355 | |
| Mannucci PM (2008) <i>Haemophilia</i> 14 Suppl 3: 10-18 | 40 |
| Mather T et al (1996) <i>EMBO J</i> 15: 6822-6831 | |
| Meijers JC et al (1988) <i>Biochemistry</i> 27: 4231-4237 | |
| Mosnier LO et al (2001) <i>Thromb. Haemost.</i> 86: 1057-1064 | |
| Nagel K. et al (2011) <i>Haemophilia</i> , 17, 872-874. | |
| Negrier C et al (2006) <i>Haemophilia</i> 12 Suppl 6: 48-52- discussion 52-3 | |
| Owen MC et al (1983) <i>N. Engl. J. Med.</i> 309: 694-698 | |
| Pratt CW & Church FC (1992) <i>J. Biol. Chem.</i> 267: 8789-8794 | |
| Pratt CW et al (1992) <i>J. Biol. Chem.</i> 267: 8795-8801 | |
| Raife TJ et al (2011) <i>Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.</i> 31: 2509-2517 | |
| Schechter I et al (1967) <i>Biochem Biophys Res Comm</i> 27: 157-162 | |
| Stearns-Kurosawa DJ et al (1996) <i>PNAS. U.S.A.</i> 93: 10212-10216 | |
| Suzuki K et al (1983) <i>J. Biol. Chem.</i> 258: 163-168 | |

【0234】

50

【表 1】

阻害の二次速度定数 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			倍阻害 A P C / トロンビン
バリアント	トロンビン	A P C	
A 2 2 W T P C I	2 8 . 2 1 ± 1 . 5 1	0 . 6 8 ± 0 . 0 3 2	0 . 0 2
A 2 2 P 1' K P C I	0 . 0 2 2 ± 0 . 0 0 2 4	0 . 8 8 ± 0 . 0 7 4	4 0
A 2 2 P 2 K P 1' K P C I	約 0 . 0 3 *	0 . 2 8 ± 0 . 0 1 3	9 . 3
F L α_1 A T P i t t s C 2 3 2 S	2 9 2 . 7 6 ± 1 7 . 6 0	1 0 8 . 1 6 ± 7 . 0 8 6	0 . 4
F L α_1 A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K	0 . 0 5 1 ± 0 . 0 0 2 8	6 4 . 8 2 ± 7 . 1 4	1 2 7 1
F L α_1 A T P i t t s C 2 3 2 S P 1' K	0 . 1 7 ± 0 . 0 1 7	9 5 . 6 6 ± 1 3 . 7 0	5 6 3
F L α_1 A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1' K	4 時間後の阻 害なし	1 5 . 1 4 ± 1 . 6 8	トロンビン阻害なし

表 1

【0 2 3 5】

【表 2】

阻害の二次速度定数 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			倍阻害 A P C / トロンビン
バリアント	トロンビン+ヘ パリン	A P C +ヘパリ ン	
A 2 2 W T P C I	1 3 1 0 . 3 2 ± 2 1 8 . 7 2	5 6 4 . 4 7 ± 7 1 . 2 9	0 . 4
A 2 2 P 1' K P C I	0 . 0 1 7 ± 0 . 0 0 1 9	3 2 1 . 5 4 ± 3 1 . 9 4	1 8 9 1 4
A 2 2 P 2 K P 1' K P C I	0 . 1 1 ± 0 . 0 4 0 *	1 4 6 . 3 8 ± 1 8 . 8 5	1 3 3 1 . 7

表 2

【0 2 3 6】

【表 3】

阻害の二次速度定数 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			倍阻害 A P C / F X A
バリアント	F X A		
A 2 2 W T P C I	1 0 . 3 1 ± 0 . 7 3		0 . 0 7
A 2 2 P 1' K P C I	0 . 5 2 ± 0 . 0 7 9		1 . 7
A 2 2 P 2 K P 1' K P C I		検出阻害なし	F X A 阻害なし
F L α_1 A T P i t t s C 2 3 2 S	4 1 . 3 3 ± 2 . 3 6		2 . 6
F L α_1 A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K	3 . 9 3 ± 0 . 3 1		1 6 . 5
F L α_1 A T P i t t s C 2 3 2 S P 1' K	4 . 8 9 ± 0 . 1 6		1 9 . 6
F L α_1 A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1' K	0 . 1 2 ± 0 . 0 1 0		1 2 6 . 2

表 3

【0 2 3 7】

【表 4】

阻害の二次速度定数 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			A P C / F X I a の 阻害
バリアント	F X I a	A P C	
A 2 2 W T P C I	8 . 5 9 ± 0 . 4 3	0 . 6 8 ± 0 . 0 3 2	0 . 0 8
A 2 2 P 2 K P 1' K P C I	0 . 0 2 3 ± 0 . 0 0 5 2	0 . 2 8 ± 0 . 0 1 3	1 2 . 2

表 4

10

20

30

40

50

【0238】

【表5】

阻害の二次速度定数 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
バリアント	トロンビン	A P C	A P C／トロンビンの阻害
A 2 2 W T P C I	2 8. 2 1 ± 1. 5 1	0. 6 8 ± 0. 0 3 2	0. 0 2
A 2 2 P 2 K P 1' K P C I	約 0. 0 3 *	0. 2 8 ± 0. 0 1 3	9. 3
A 2 2 D 8 P C I (P 4 Q P 2 R P 1' N)	0. 0 8 4 ± 0. 0 0 1 6	1. 0 0 ± 0. 1 5	1 1. 9
A 2 2 4. H 1 1 P C I (P 4 K P 2 R P 1' H)	0. 0 2 1 ± 0. 0 0 1 2	0. 4 5 ± 0. 1 5	2 1. 4
A 2 2 2. B 1 0 P C I (P 4 S P 2 L P 1' K)	0. 0 1 6 ± 0. 0 0 0 9 0	0. 4 3 ± 0. 0 0 8 6	2 6. 9
A 2 2 5. E 1 2 P C I (P 4 H P 2 R P 1' V)	0. 0 2 3 ± 0. 0 0 2 1	0. 2 6 ± 0. 0 3 5	1 1. 3

表5

【0239】

【表6】

阻害の二次速度定数 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
バリアント	F X I a	A P C	A P C／F X I a の阻害
F L α_1 A T P i t t s C 2 3 2 S	3 9 8. 8 8 ± 1 3. 0 1 2	1 0 8. 1 6 ± 7. 0 8 6	0. 3
F L α_1 A T P i t t s C 2 3 2 S P 2 K P 1' K	0. 4 7 ± 0. 0 3 7	1 5. 1 4 ± 1 . 6 8	3 2. 2

表6

【0240】

【表7】

	P 6	P 5	P 4	P 3	P 2	P 1	P 1'	P 2'	P 3'	P 4'
W T	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L
P 2 K P 1' K	T	I	F	T	K	R	K	A	R	L
E 7	T	I	S	T	H	R	R	A	R	L
E 1 0	T	I	R	T	Q	R	V	A	R	L
E 1 1	T	I	T	T	L	R	Y	A	R	L
D 8	T	I	Q	T	R	R	N	A	R	L
H 1 1	T	I	A	T	Q	R	Y	A	R	L

表7

【0241】

10

20

30

【表 8】

	P 6	P 5	P 4	P 3	P 2	P 1	P 1'	P 2'	P 3'	P 4'
WT	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L
P 2 K P 1' K	T	I	F	T	K	R	K	A	R	L
2. B 1 0	T	I	S	T	L	R	K	A	R	L
3. B 1 1	T	I	F	T	F	R	R	A	R	L
3. C 3	T	I	V	T	R	R	I	A	R	L
3. E 8	T	I	F	T	R	R	K	A	R	L
3. G 1 0	T	I	C	T	L	R	K	A	R	L
3. G 1 1	T	I	W	T	W	R	N	A	R	L
3. H 1 1	T	I	W	T	W	R	N	A	R	L
4. E 4	T	I	K	T	D	R	M	A	R	L
4. F 7	T	I	F	T	V	R	K	A	R	L
4. F 1 0	T	I	R	T	R	R	I	A	R	L
4. H 7	T	I	G	T	I	R	R	A	R	L
4. H 1 1	T	I	K	T	R	R	H	A	R	L
5. D 2	T	I	T	T	R	R	V	A	R	L
5. E 7	T	I	L	T	R	R	I	A	R	L
5. E 1 2	T	I	H	T	R	R	V	A	R	L

表 8

【0 2 4 2】

【表9】

	P 6	P 5	P 4	P 3	P 2	P 1	P 1'	P 2'	P 3'	P 4'
α_1 AT WT	L	E	A	I	P	M	S	I	P	P
α_1 AT Pitts	L	E	A	I	P	R	S	I	P	P
P 2. G 1 1	L	E	A	I	K	R	S	I	P	P
P 2. F 1 0	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P 2. D 8	L	E	A	I	K	R	S	I	P	P
P 2. G 8	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P 2. E 7	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P 2. D 1 0	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P 2. G 4	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P 2. F 4	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P 1'. H 8	L	E	A	I	P	R	E	I	P	P
P 1'. A 1 1	L	E	A	I	P	R	R	I	P	P
P 1'. F 1 0	L	E	A	I	P	R	E	I	P	P
P 1'. F 9	L	E	A	I	P	R	K	I	P	P
P 1'. F 4	L	E	A	I	P	R	E	I	P	P
4. G 9	L	E	A	I	T	R	N	I	P	P
4. G 4	L	E	A	I	Q	R	K	I	P	P
3. E 5	L	E	A	I	R	R	A	I	P	P
3. B 6	L	E	A	I	S	R	R	I	P	P
3. B 2	L	E	A	I	K	R	N	I	P	P
3. A 1 0	L	E	A	I	T	R	Y	I	P	P
2. H 1	L	E	A	I	R	R	H	I	P	P
2. C 6	L	E	A	I	T	R	R	I	P	P
1. H 1 0	L	E	A	I	V	R	R	I	P	P
1. B 1 1	L	E	A	I	R	R	C	I	P	P
1. A 1 2	L	E	A	I	K	R	H	I	P	P
2. E 5	L	E	A	I	T	R	R	I	P	P
3. G 9	L	E	A	I	Y	R	R	I	P	P
3. F 4	L	E	A	I	A	R	R	I	P	P
3. C 9	L	E	A	I	C	R	K	I	P	P
2. H 5	L	E	A	I	K	R	N	I	P	P
2. E 7	L	E	A	I	W	R	N	I	P	P
1. B 2	L	E	A	I	S	R	R	I	P	P
5. C 1 2	L	E	A	I	H	R	N	I	P	P
5. A 6	L	E	A	I	R	R	N	I	P	P
4. E 1	L	E	A	I	P	R	K	I	P	P
4. C 1 2	L	E	A	I	N	R	N	I	P	P
3. F 8	L	E	A	I	T	R	M	I	P	P
3. C 1 0	L	E	A	I	T	R	H	I	P	P
2. E 8	L	E	A	I	K	R	S	I	P	P
1. H 9	L	E	A	I	T	R	Q	I	P	P

表9

【0243】

【表 10】

阻害の二次速度定数 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
バリアント	トロンビン	A P C	A P C／トロンビンの阻害
F L α_1 A T Pitts C 2 3 2 S	2 9 2. 7 6 \pm 1 7 . 6 0	1 0 8. 1 6 \pm 7. 0 8 6	0. 4
F L α_1 A T Pitts C 2 3 2 S P 2 K P 1' K	4 時間後の阻害なし	1 5. 1 4 \pm 1 . 6 8	トロンビン阻害 なし
F L α_1 A T Pitts C 2 3 2 S P 2 R	0. 0 4 2 \pm 0. 0 0 2 4	6 1. 1 2 \pm 6 . 2 6	1 4 5 5. 2
F L α_1 A T Pitts C 2 3 2 S P 1' R	0. 6 8 \pm 0. 0 6 8	1 3 1. 5 7 \pm 1 3. 3 2	1 9 3. 5
F L α_1 A T Pitts C 2 3 2 S P 1' E	0. 1 5 \pm 0. 0 1 5	2. 9 9 \pm 0. 2 9	1 9. 9
F L α_1 A T Pitts C 2 3 2 S P 2 T P 1' N	0. 2 7 \pm 0. 0 4 7	6 2. 3 7 \pm 2 . 4 6	2 3 1. 0
F L α_1 A T Pitts C 2 3 2 S P 2 T P 1' Y	0. 0 2 3 \pm 0. 0 0 1 4	5. 7 0 \pm 0. 8 3	2 4 7. 8
F L α_1 A T Pitts C 2 3 2 S P 2 Q P 1' K	0. 0 0 3 8 \pm 0. 0 0 1 3	3 3. 4 1 \pm 6 . 3 6	8 7 9 2. 1
F L α_1 A T Pitts C 2 3 2 S P 2 K P 1' H	2 時間後の阻害なし	2 8. 8 4 \pm 3 . 0 5	トロンビン阻害 なし
F L α_1 A T Pitts C 2 3 2 S P 2 K P 1' N	0. 0 1 5 \pm 0. 0 0 2 6	3 7. 8 0 \pm 2 . 4 8	2 5 2 0. 0
F L α_1 A T Pitts C 2 3 2 S P 2 R P 1' C	0. 0 3 4 \pm 0. 0 0 9 4	2 4. 5 5 \pm 2 . 1 5	7 2 2. 1

表 10

【0244】

【表 1 1】

バリアント	PT (s)	a PTT (s)
血漿	27. 2 ± 0. 8	60. 3
FL α_1 AT Pitts C232S P2K	27. 0 ± 0. 5	107. 2
FL α_1 AT Pitts C232S P1' K	27. 1 ± 0. 4	228. 1
FL α_1 AT Pitts C232S P2R	27. 8 ± 0. 4	111. 6
FL α_1 AT Pitts C232S P1' R	28. 1 ± 0. 5	287
FL α_1 AT Pitts C232S P1' E	27. 2 ± 0. 4	84
FL α_1 AT Pitts C232S P2TP1' N	29. 5 ± 0. 9	>300
FL α_1 AT Pitts C232S P2TP1' Y	28. 3 ± 0. 8	185. 4
FL α_1 AT Pitts C232S P2QP1' K	27. 9 ± 0. 3	111. 5
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' H	27. 4 ± 0. 9	77. 8
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' N	27. 8 ± 0. 3	81. 9
FL α_1 AT Pitts C232S P2RP1' C	28. 5 ± 0. 6	ND

表 1 1

【0245】

【表 1 2】

阻害の二次速度定数 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	f X a	APC / FXa の阻害
FL α_1 AT Pitts C232S	41. 33 ± 2. 36	2. 6
FL α_1 AT Pitts C232S P2K P1' K	0. 12 ± 0. 010	126. 2
FL α_1 AT Pitts C232S P2R	4. 79 ± 0. 58	12. 8
FL α_1 AT Pitts C232S P2Q P1' K	1. 082 ± 0. 15	30. 9
FL α_1 AT Pitts C232S P2K P1' H	0. 62 ± 0. 040	46. 5
FL α_1 AT Pitts C232S P2K P1' N	0. 91 ± 0. 13	41. 5

表 1 2

【0246】

【表 1 3】

阻害の二次速度定数 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	トロンビン	APC	f X a	a PTT (s)
FL α_1 AT Pitts C232S	292. 76 ± 1 7. 60	108. 16 ± 7. 086	41. 33 ± 2 . 36	>300 (55 . 0 ± 3. 8)
FL α_1 AT Pitts C232S P2K P1' K	4時間後の阻害なし	15. 14 ± 1. 87	0. 12 ± 0. 010	62. 1 ± 4. 2 (55. 0 ± 3. 8)
FL α_1 AT Pitts C232S P2R P1' Q	0. 0054 ± 0 . 0011	8. 30 ± 1 . 11	0. 13 ± 0. 0067	55. 1 ± 2. 8 (49. 3 ± 2. 5)
FL α_1 AT Pitts C232S P2K P1' Q	0. 0029 ± 0 . 0015	9. 00 ± 0 . 67	0. 17 ± 0. 010	53. 9 ± 3. 0 (49. 3 ± 2. 5)

表 1 3

【0247】

10

20

30

40

配列

```

1 mqlfl1lclv llspqgaslh rhhpremkkr vedlhvgatv apssrrdftf dlyralasaa
61 psqniffspv sisnslamls 1gagsstkmq ileglginlq kssekelhrg fqqlqelnq
121 prdgfqislg nalfdlvvd lqdtfvksamk tlyladftp nfrdsagamk qindyvakqt
181 kgkivd1kn ldsnavvimi yiffkakwe tsfnhkgtqe qdfyvtsetv vrvpmmsred
241 qyhylldrnl scrvvvgpyq gnatalfilp segkmqqven glsektlrkw 1kmfkkrqle
301 ly1pkfsieg syqlekvips lgisnvftsh adlsgisnhs niqvsemvhk avvevdesgt
361 raaaatgtif tfrsarlnsq rlvfnrpflm fivdnnilf1 gkvnrp

```

【 0 2 4 8 】

配列番号 1 プロテイン C インヒビター (P C I)

プロペプチドを含む成熟タンパク質は残基 20 ~ 406 に対応する。シグナル配列は残基 1 ~ 19 に対応する。プロペプチドは残基 20 ~ 25 に対応する。RCL の P4、P2、P1 及び P1' の残基を太字及び下線で示す。 10

【 0 2 4 9 】

```

1 mermlplll alilaagfcpa vlchpnspld eenltqenqd rgthvdlgla sanvdfafsl
61 ykqlvlkapd knvifspshi stalaf1slg ahnttltei kglkfni1tet seaeihqsfq
121 hllrltnqss delqlsmgna mfvkeqlsll drftedakrl ygseafatdf qdsaaakkli
181 ndyvkngtrg kitdlikdld sqtmvmvlvny iffkkakwemp fdpqdthqsr fylskkkwvm
241 vpmmalhhlt ipyfrdeels ctvvelkytg nasalfilp qdkmeeveam llpetlkwr
301 dsmslfreige lylpkfsisr dynlndillq lgieeaftsk adlsgitgar nlavsqvvhk
361 avldvfeegt easaatavki tl1salvetr tivrfnrfpl miivptdtqn iffmskvtnp
421 kqa

```

【 0 2 5 0 】

配列番号 2 アルファ - 1 - 抗キモトリプシン

成熟タンパク質は残基 26 ~ 423 に対応する。RCL の P4、P2、P1、及び P1' の残基を太字及び下線で示す。 20

【 0 2 5 1 】

```

1 masrlt1l1 llllagdra ssnpnatsss sqdpeslqdr gegkvattvi skmlfvepl
61 evss1pttns ttnsatkit1 n1tdepttqp ttepttqpti qptqpttqlp tdsptqpttg
121 sfcpgpv1lc sdleshstea vlgdalvdfs lklyhafsam kkvetnm afs pfsiasl1tq
181 vllgagentk tnlesilsyp kdftcvhqal kgfttkgvts vsqifhspdl airdtfvnas
241 rtlyssspv1 lsnnsdanle lintwvaknt nnkisrlids lpsdtr1vll naiylsakwk
301 ttfdpkxtrm epfhfknsvi kwpmmnskky pvahtidqtl kakvgqlqls hn1slv1lp
361 qnlkhrlledm equalpsvfk aimeklemek fqptl1lpr ikvttsqdml simekleffd
421 fsyd1nlcgl tedpd1lqvs1 mqhqtvlelt etgveaaaas aisvart llv fevqqpflfv
481 lwdqqhkf1v fmgrv1ydp1ra

```

30

【 0 2 5 2 】

配列番号 3 C 1 - エステラーゼインヒビター

成熟タンパク質は残基 23 ~ 500 に対応する。RCL の P4、P2、P1、及び P1' の残基を太字及び下線で示す。 20

【 0 2 5 3 】

```

1 mallwg1l1 swsclqgpc1 vfspvsamep lgrqltsgpn qeqvspl11 k1gnqepggq
61 talksp1gvc srdptpeqth rlarammaft adlfs1vaqt stcpnl1lsp lsvalalsh1
121 algagnht1q rlqqvhags gpc1ph1lsr lcqd1lgpaf rlaarmylqk gfpikedfle
181 qseq1fgakp vslt1gqedd laninqwvke ategk1qef1 sglpedtv11 linaihfqgf
241 wrnkfdps1t qrdsfhl1eq ftvpvemmqa rtyplrw1ll eqpeiqvahf pfknnmsfv
301 lvpthfewnv svqlan1swd tlh1pp1lw1er ptkvrlpkly 1khqmd1vat lsq1glqelf
361 qapdl1rg1ce qslvvsgvqh qst1lsevg veaaaatsiams rms1ssfs vn1rpfl1ff1f
421 edttg1p1fv gsvrnpnpsa pre1keqqds pg1nkdf1qls1 kgfprgd1klf gp1dk1lvppm
481 eedypqf1gsp k

```

40

【 0 2 5 4 】

配列番号 4 2 - 抗プラスミン

成熟タンパク質は残基 28 ~ 491 に対応する。キモトリプシンの阻害に対する RCL の P4、P2、P1 及び P1' の残基を太字、プラスミンの阻害に対する残基を下線で示す。 20

【 0 2 5 5 】

1 mysnvigtvt sgkrkvylls llligfwdcv tchgpvdic takprdipmn pmciyrspekk
 61 katedegseq kipeatnrrv welskansrf attfyqhlad skndnifl splsistafa
 121 mtkgacndt lqqmevfkf dtisektsdq ihfffaklnr rlyrkankss klvsanrlfg
 181 dksltfnety qdiselvyga klgpldfken aeinqraain wwsntegri tdvipseain
 241 eltvvlvnt iyfkglwskf fspentrkel fykadgescs asmmyqegkf ryrrvaegtq
 301 vlelpfkglit itmvilpkp ekslakveke ltpevlcwl deleemmlvv hmprfriedg
 361 fslkeqlqdm qlvdlfspek sklpqivaeg rddlyvsdraf hkaflevnee gseaaastav
 421 viagrslnpn rvtfkanrpf lvfirevpln tiifmgrrvan pcvk

【0256】

配列番号5 抗トロンビン(ATTII)

成熟タンパク質は残基33~464に対応する。RCLのP4、P2、P1、及びP1'の残基を太字及び下線で示す。

10

【0257】

1 mkhslnalli fliitsawgg skgpldglek ggetaqsdap qweqlnnknl smpllpadfh
 61 kentvndwi pegeedddyl dlekifsegg dyidivdsls vsptsdvsa gnilqlfhgk
 121 sriqrnliln akfafnlyrv lkdqvntfdm ifiapvgist amgmislgk getheqvhisi
 181 lhfkdfvnas skyeitihn lfrklthrlf rrrnfgytirs vndlyiqkqf pilldfktkv
 241 reyyfaeaqi adfsdpafis ktnnhimklt kglikdalen idpatqmmil nciyfkgsww
 301 nkfpvemth hnfrlnerev vkvsmmqtkg nflaandqel dcclqleyv ggismlivvp
 361 hkmmsgmkte aqltprrver wqksmtnrtr evllpkfkle knynlveslk lmgirmlfdk
 421 ngnmagisdq riaidlfkhq gititvneegt qattttvgf mplstqvrft vdrpflfliy
 481 ehrtsclfm grvanpsrs

【0258】

配列番号6 ヘパリンコファクターI

20

成熟タンパク質は残基20~499に対応する。RCLのP4、P2、P1、及びP1'の残基を太字及び下線で示す。

【0259】

1 mpssvswgil llaglcclvp vslaedpqgd aaqktdtshh dqdhptfnki tpnlaefafs
 61 lyrqlahqsn stniffspvs iatafamisl gtkadthdei leglnfnlte ipeaqihiegf
 121 qellrtlnqp dsqqltgn glflsegkl vdkfledvkk lyhseafvn fgdteeakkq
 181 indyvektq gkivdlnkel drdtvfalvn yiffkgkwer pfevkdtreee dfhvdqvttv
 241 kvpmkkrlgm fniqhckkls swvllmkylg nataiffld egklqhlene lthdiitkfl
 301 enedrrrasl hlpklsitgt ydlksvlgql gitkvfsnnga dlsgvteeap lklskavhka
 361 vltidekgte aagamflea ai pmsippevfkf nkpfvflmie qntksplfmg kvvnptqk

【0260】

配列番号7 1 - 抗トリプシン(1, ATT)

30

成熟タンパク質は残基25~418に対応する。RCLのP4、P2、P1、及びP1'の残基を太字及び下線で示す。

【0261】

1 mhldiyllll lvglalshg qlhvehdges csnsshqql etgegspslk iapanadfaf
 61 rfyliaset pgkniffspl sisayaml gacshsrq ileglgfnt elsesdvhrg
 121 fghllhtlnl pghgletrvg salflshnlk flakflndtm avyeaklfht nfydtvgtiq
 181 lindhvkket rgkivdlnse lkkdvmlvnyiyfkalwe kpffissrtt kdfyvdentt
 241 vrvpmmlqdq ehhwylhdry lpcsvlrmry kgdatvffil pnqgkmcireie evltpemlmr
 301 wnnllrkrnf ykklehlpk fsisgsyvld qilprlgftd lfskwadlsg itkqqkleas
 361 ksfhkatldv deagteaaaa tsfaikffsa qtnrhilrfn rpflvvifst stqsvlflgk
 421 vvdptkp

【0262】

40

配列番号8 カリスタチン

成熟タンパク質は残基21~427に対応する。RCLのP4、P2、P1、及びP1'の残基を太字及び下線で示す。

【0263】

1 mqmuspaltcl vlgalvfge gsavhhppsy vahlasdfgv rvfqvqaqas kdrnvffspv
 61 gvasvamlq lttggetqqq iqaaamgfkid dkgnmapalrh lykelmgpwn kdeisttdai
 121 fvqrdr1k1vq gfmphffrlf rstvkqvdfs everarfiin dwvkthtkgm isnllgkgav
 181 dqltrlvln alyfngqkwk pfpdsssthrr lfhsdgstv svpmmaqtak fnytefttd
 241 ghyydilep yhgdtlsmfi aappykevpl saltnilsaq lishwkgnmt rlprllvlpk
 301 fsletedvir kplengmtd mfrqfqadft slsdgeplhv agalqkvkie vnesgtvass
 361 staviysarm apeeiimdpr flfvvrhnpt gtvlfmqvm ep

【0264】

50

配列番号 9 プラスミノーゲン活性化因子インヒビター

成熟タンパク質は残基 24 ~ 402 に対応する。RCL の P4、P2、P1、及び P1' の残基を太字及び下線で示す。

【0265】

```

1 mkkvvpsllls vllaqvwlvp glapspgspe tpapqngtsr vvqapkeeee deqeaseeka
61 seeekawlma srqglakets nfgfsllrki smrhgdnmvf spfgmslamt glmlgatgpt
121 etqikrglhi qalkptkpgl lpslfkglre tlsrnlelgl tqggsfafihk dfdvketffn
181 lskryfdtec vpmnfrnasq akrlmnhyin ketrgkipkl fdeinptkl ilvdyilfkg
241 kwltpfdpvf tevdtfhldk yktikvpmmy gagkfastfd knfrchvlkl pyqgnatmlv
301 vlmekmgdhi aledytltdl vetwlrnmkt rnmevffpkf kldqkyemhe llrqmgirri
361 fspfadisel satgrnlqvs rvlqrtviev dergteavag ilseitaysm ppvikvdrpf
421 hfmieetsg mllflgrvvn ptll

```

10

【0266】

配列番号 10 プロテイン Z 依存性インヒビター

成熟タンパク質は残基 22 ~ 444 に対応する。RCL の P4、P2、P1、及び P1' の残基を太字及び下線で示す。

【0267】

```

1 mnwhlplifll asvtlpsics hfnplslleel gsntgiqvfn qivksrphdn ivisphgias
61 vlgmlqlgad grtkqglamv mrygvngvgk ilkkinkaiv skknkdivtv anavfvknas
121 eievpfvtrn kdvfqcevrn vnfedpasac dsinawvkne trdmidnlls pdlidgvltr
181 lllvnavyfk glwksrfqpe ntkkrtfvaa dgksyqvpml aqlsvfrcgs tsapndlwyn
241 fielpyges ismlialpte sstplsaiip histktidsw msimvpkrvq vilpkftava
301 qtdlkeplkv lgltdmfdss kanfakittg senlhvshil qkakievsed gtkasaatta
361 iliarssppw fivdrpflff irhnptgavl fmqqinkp

```

20

【0268】

配列番号 11 プロテアーゼネキシン 1

成熟タンパク質は残基 20 ~ 398 に対応する。RCL の P4、P2、P1、及び P1' の残基を太字及び下線で示す。

【0269】

```

1 mpssvswgil llaglcc1vp vslaedpqgd aaqktdtshh dddhptfnki tpnlaefafs
61 lyrqlahqsn stniffspvs iatafamlsl gtkadthdei leglnfnlte ipeaqihegf
121 qellrtlnqp dsqqllttgn glflseglkl vdkfledvkk lyhseaftvn fgdteekakq
181 indyvekgtq gkivdllvkel drdtvfalvn yiffkgkwer pfevkdteee dfhvdqvtv
241 kvpmmkrlgm fniqhckkls swvllmkylq nataifflpd egklqhlene lthdiitkfl
301 enedrrrasl hlpklsitgt yclksvlglql gitkvfsnga dlsgvteeap lklskavhka
361 vltidekgte aagamfleaai krklippevkf nkpfvflmie qntksplfmg kvvnptqk

```

30

【0270】

配列番号 12 ₁ A T スカフォールドにおける変性セルピン

成熟タンパク質は残基 25 ~ 418 に対応する。RCL の P4、P2、P1、及び P1' の残基を太字及び下線で示す。

【図1】

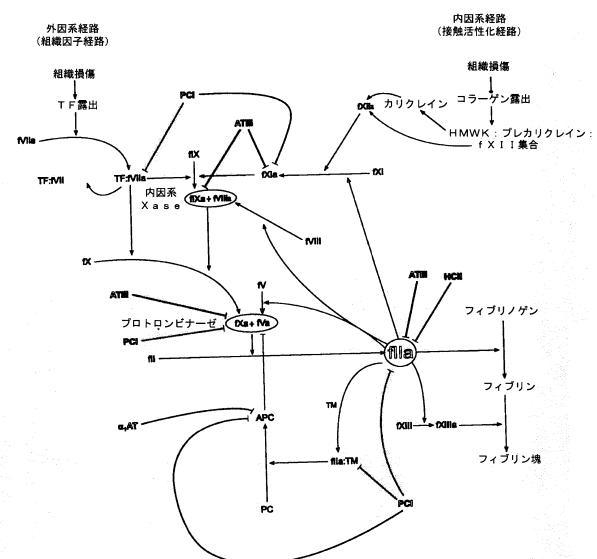


Figure 1

【図2】

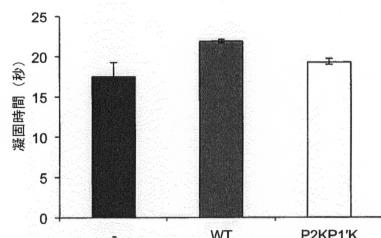
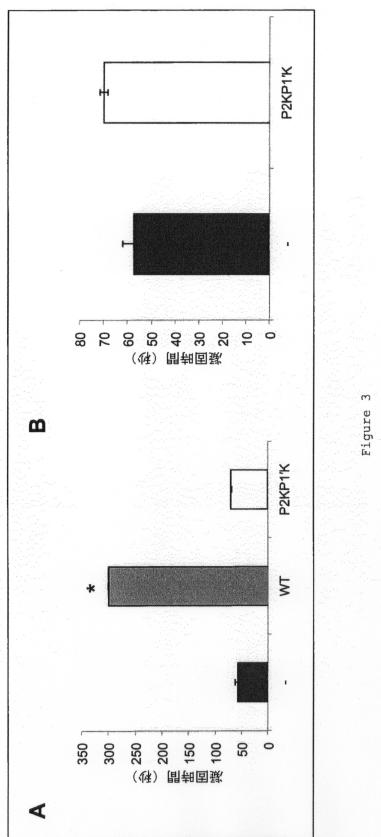


Figure 2

【図3】



【図4】

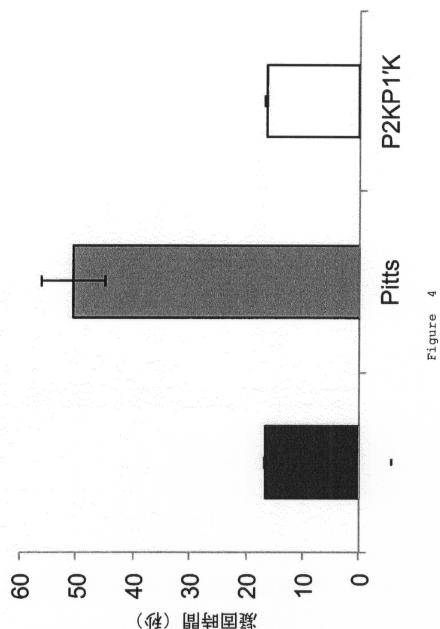


Figure 4

【図 5 A】

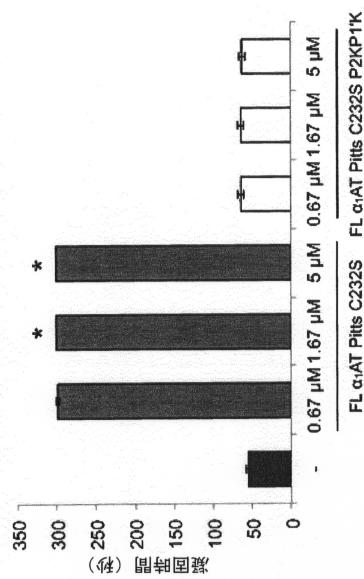


Figure 5A

【図 5 B】

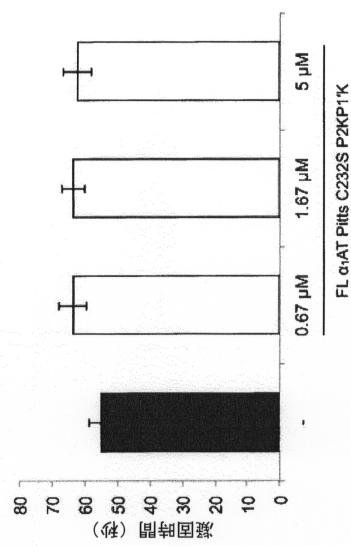


Figure 5B

【図 6 A】

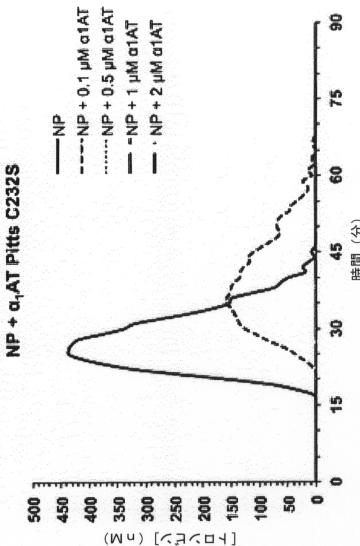


Figure 6A

【図 6 B】

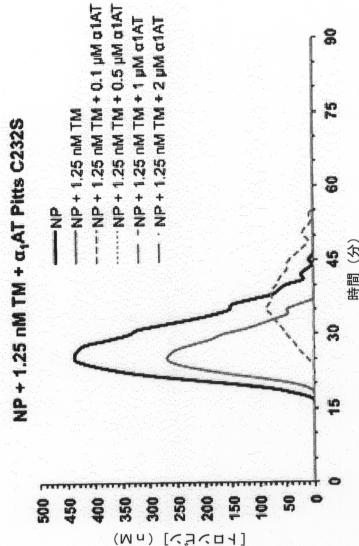


Figure 6B

【図 6 C】

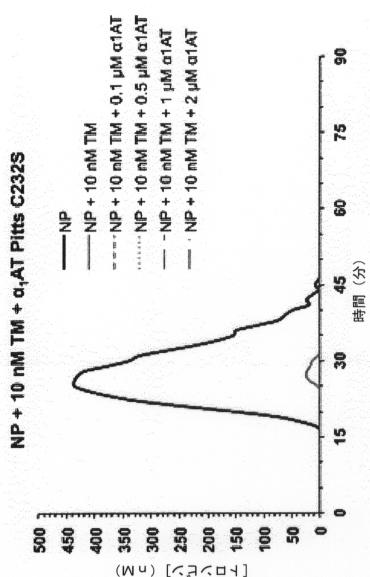


Figure 6C

【図 6 D】

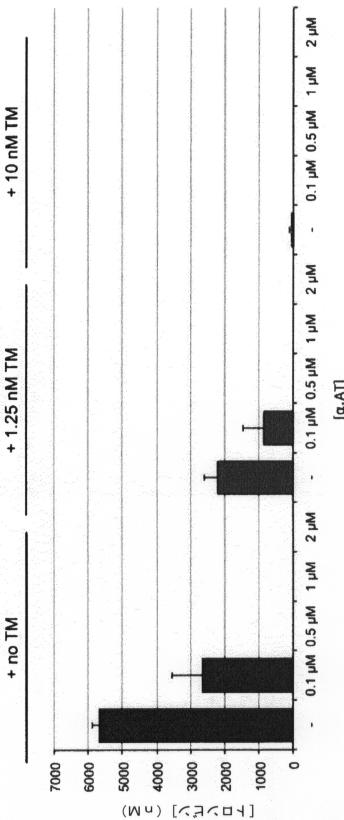


Figure 6D

【図 7 A】

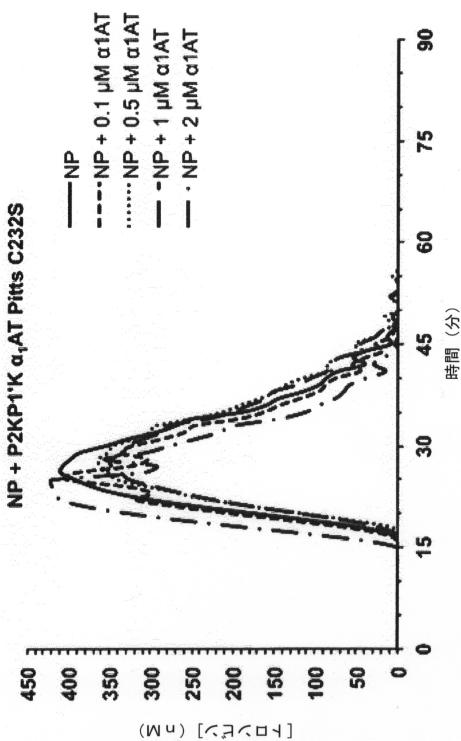


Figure 7A

【図 7 B】

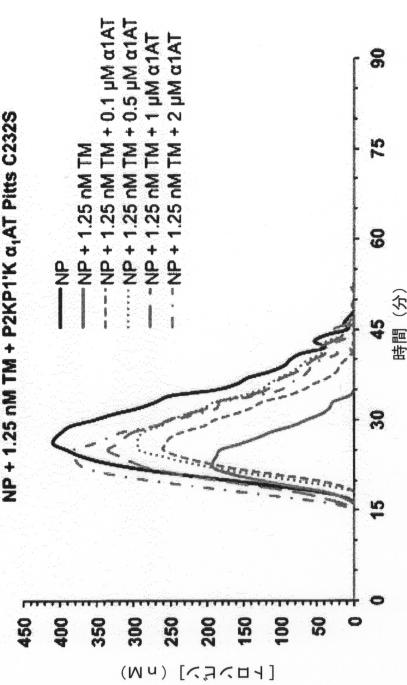


Figure 7B

【図7C】

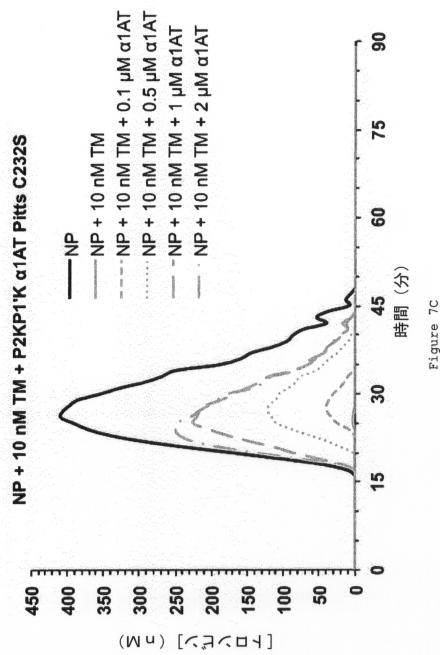


Figure 7C

【図7D】

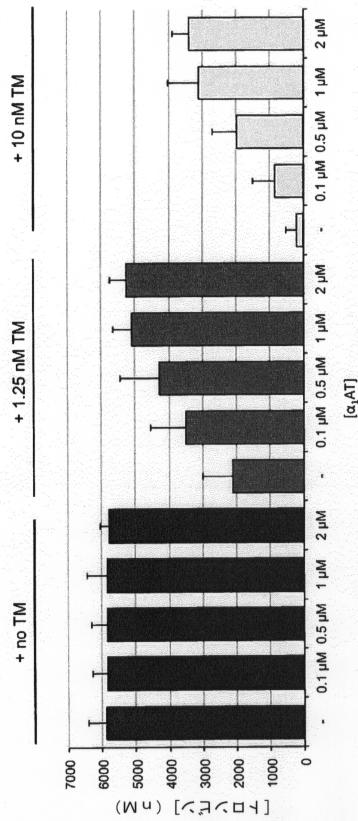


Figure 7D

【図8】

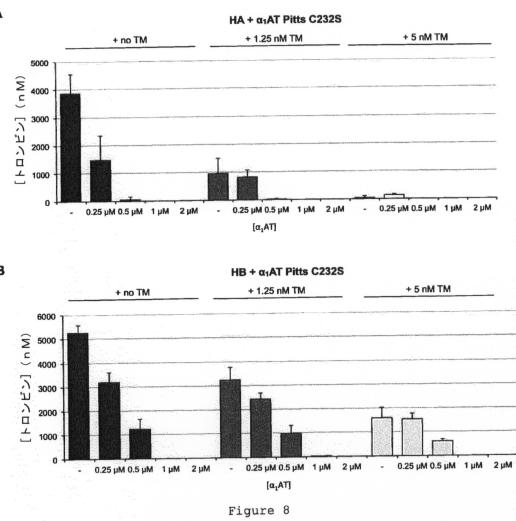


Figure 8

【図9A】

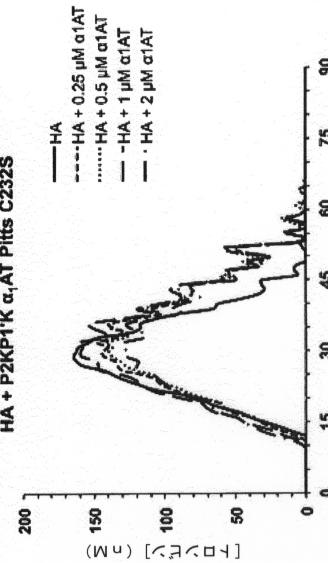


Figure 9A

【図 9 B】

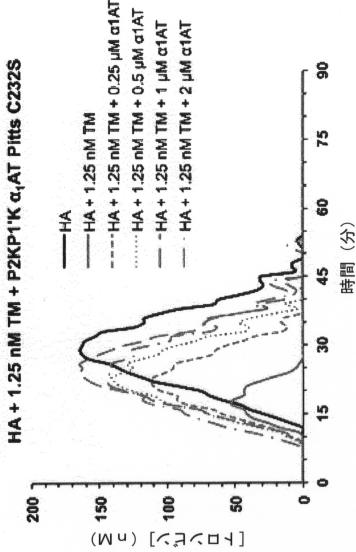


Figure 9B

【図 9 C】

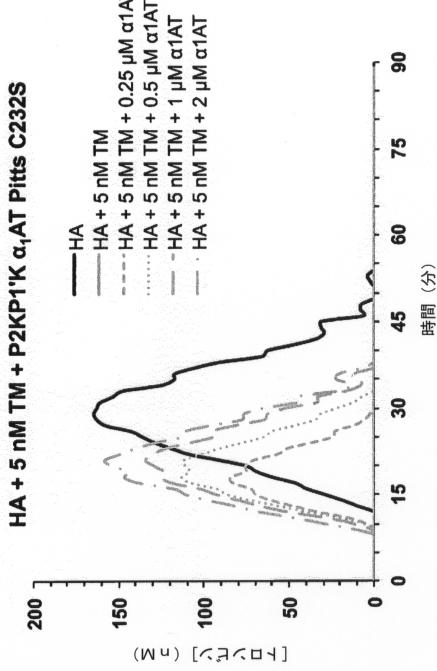


Figure 9C

【図 9 D】

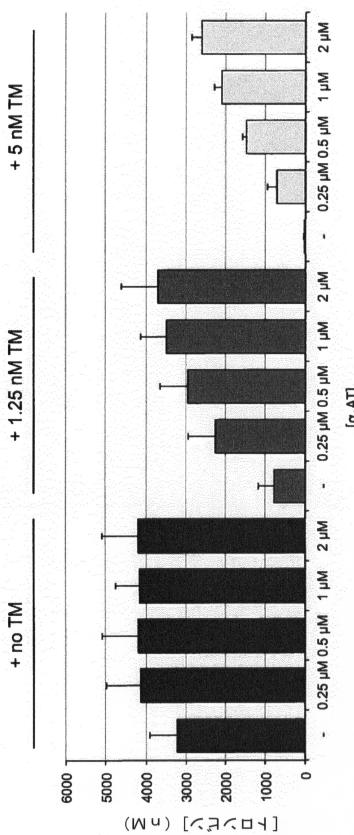


Figure 9D

【図 10 A】

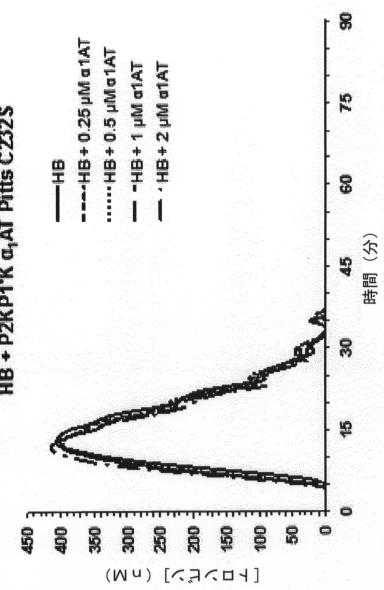


Figure 10A

【図10B】

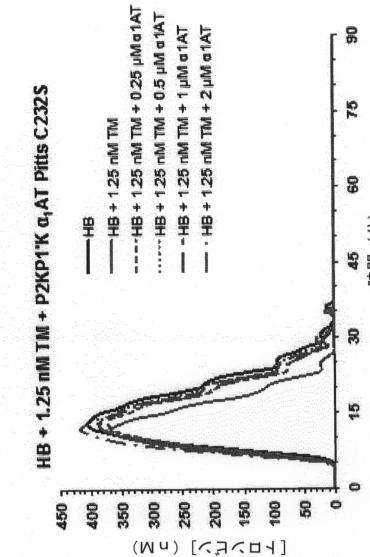


Figure 10B

【图10C】

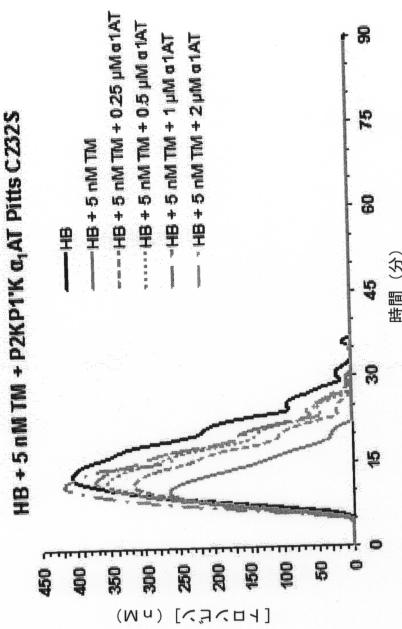


Figure 10C

【図10D】

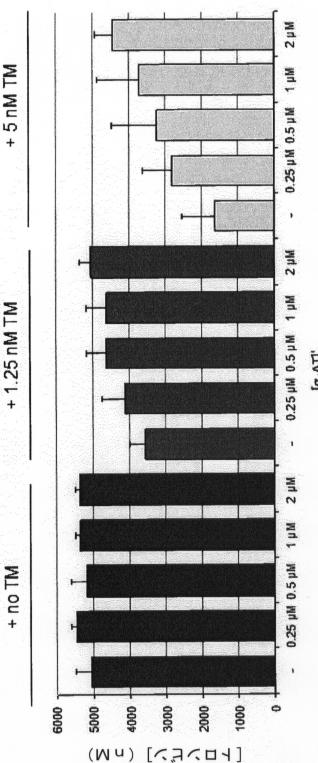


Figure 10D

【図11A】

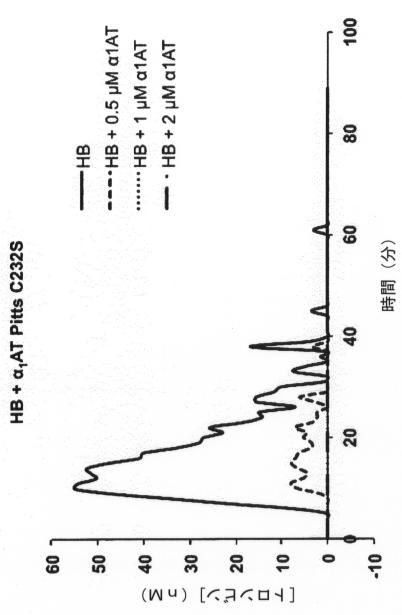
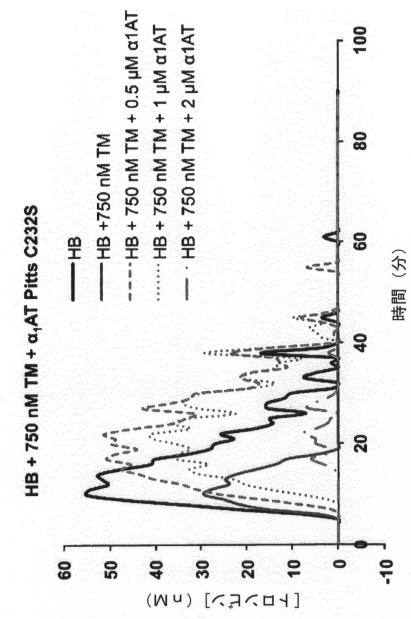


Figure 11A

【図 1 1 B】



【図 1 1 C】

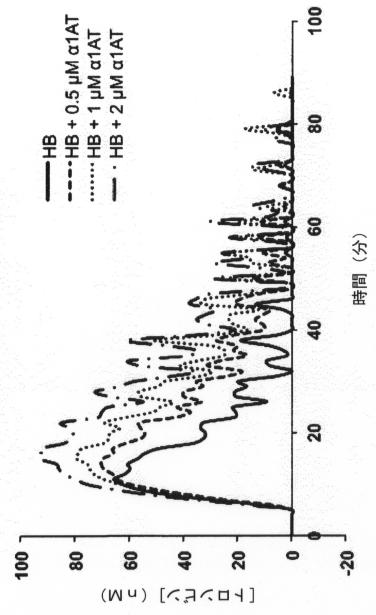


Figure 11C

【図 1 1 D】

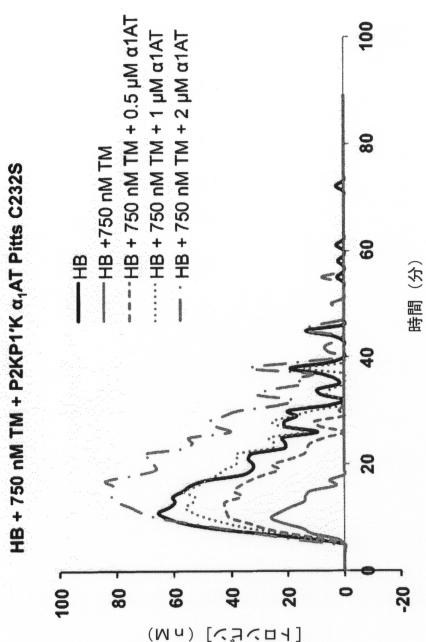


Figure 11D

【図 1 1 E】

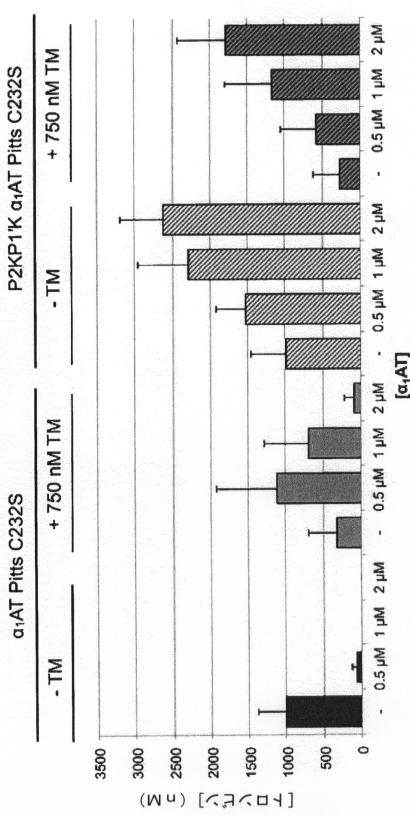


Figure 11E

【図12】

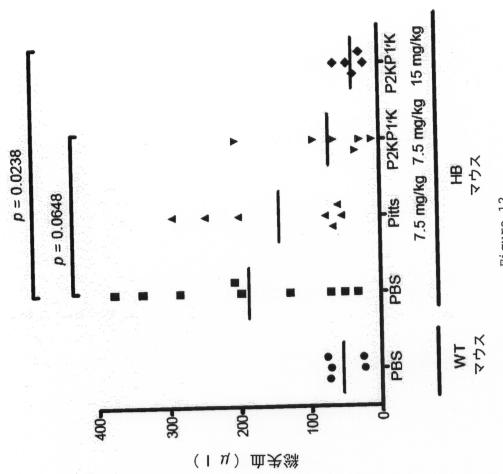


Figure 12

【図13】

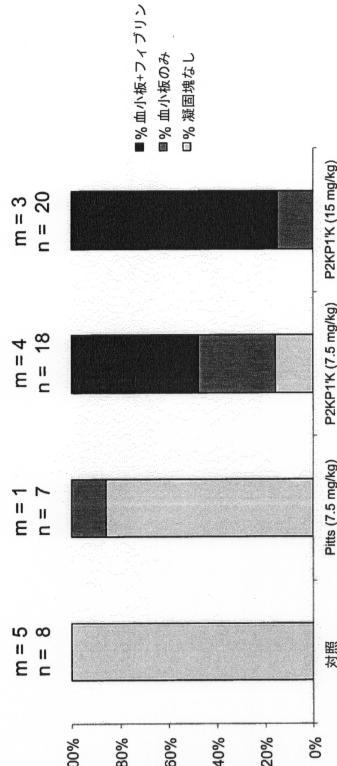


Figure 13

【図14】

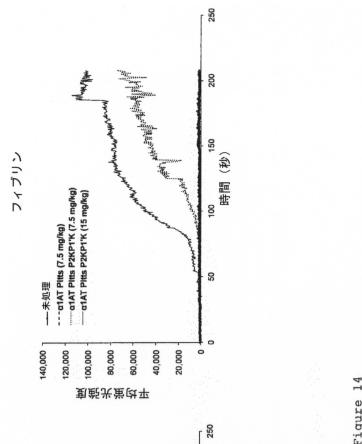


Figure 14

【図15】

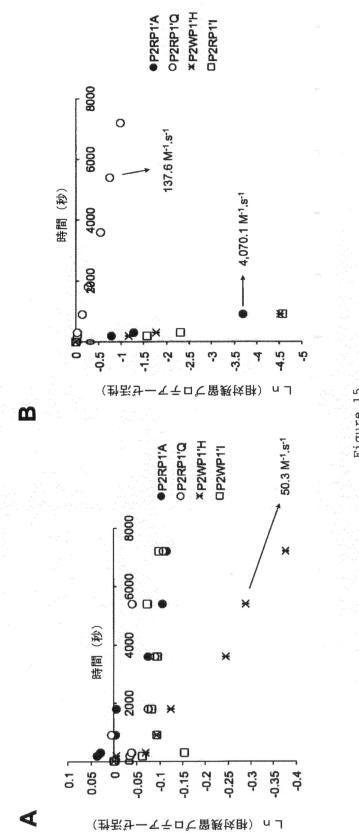


Figure 15

【配列表】

0006431541000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/10
A 61 P 7/04 (2006.01)	A 61 P 7/04
A 61 K 38/55 (2006.01)	A 61 K 38/55

- (72)発明者 ハンティントン ジェームズ アンドリュー
イギリス国 シーピー2 0エックスワイ ケンブリッジシャー ケンブリッジ ヒルズ ロード
ウェルカム トラスト/エムアールシー ビルディング ケンブリッジ インスティテュート
フォー メディカル リサーチ ユニバーシティー オブ ケンブリッジ デパートメント オブ
ヘマトロジー
- (72)発明者 ポルダーデイク ステファニー
イギリス国 シーピー2 0エックスワイ ケンブリッジシャー ケンブリッジ ヒルズ ロード
ウェルカム トラスト/エムアールシー ビルディング ケンブリッジ インスティテュート
フォー メディカル リサーチ ユニバーシティー オブ ケンブリッジ デパートメント オブ
ヘマトロジー
- (72)発明者 バグリン トレヴァー
イギリス国 シーピー2 0エックスワイ ケンブリッジシャー ケンブリッジ ヒルズ ロード
ウェルカム トラスト/エムアールシー ビルディング ケンブリッジ インスティテュート
フォー メディカル リサーチ ユニバーシティー オブ ケンブリッジ デパートメント オブ
ヘマトロジー

審査官 宮岡 真衣

- (56)参考文献 特表2009-542218 (JP, A)
国際公開第2006/090282 (WO, A1)
JIANG R. et al., J. Biol. Chem., Vol.284 No.51(2009), pp.35652-35658
THEUNISSEN H. et al., J. Biol. Chem., Vol.268, No.12(1993), pp.9035-9040
Patston P. et al., Thrombosis and Haemostasis, 72(2)(1994), p.166-179

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 07 K 14 / 81
C 12 N 15 / 15
A 61 K 38 / 55
A 61 P 7 / 04
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDream III)
PubMed
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPI/DS (STN)
UniProt / GeneSeq