

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-506945

(P2016-506945A)

(43) 公表日 平成28年3月7日(2016.3.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/745 (2006.01)	C 0 7 K 14/745 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-555777 (P2015-555777)	(71) 出願人	506129544
(86) (22) 出願日	平成26年2月3日 (2014.2.3)		ラボラトワール・フランセ・デュ・フラク
(85) 翻訳文提出日	平成27年8月28日 (2015.8.28)		シオンマン・エ・デ・ビotechnologie
(86) 国際出願番号	PCT/FR2014/050191		LABORATOIRE FRANCAIS
(87) 国際公開番号	W02014/118481		S DU FRACTIONNEMENT
(87) 国際公開日	平成26年8月7日 (2014.8.7)		ET DES BIOTECHNOLOGIES
(31) 優先権主張番号	1350930		フランス国、91940レ・ユリ、アブニ
(32) 優先日	平成25年2月4日 (2013.2.4)		ュー・デ・トロビク、3、ゾーン・ダクテ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		イビテ・ドゥ・クールタベ
		(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 第X因子変異体

(57) 【要約】

配列番号1の変異配列を含むタンパク質であって、前記配列番号1の変異配列は少なくとも1つの変異A、A'、B、C又はC'を含み、変異Aは、DFLAEGLTPR、KATN^{*}ATLSPR及びKATXATLSPRから選択される配列による配列番号1の配列のアミノ酸43～52の置換からなり、変異A'は、TSKLTR、FNDFTR、LSSMTR、PPSLTR及びLSCGQRから選択される配列による配列番号1の配列のアミノ酸47～52の置換からなり、変異Bは、配列番号1の配列のアミノ酸52と53との間へのDFLAEGLTPR、KATN^{*}ATLSPR、KATXATLSPR、TSKLTR、FNDFTR、LSSMTR、PPSLTR及びLSCGQRから選択される配列の挿入からなり、変異Cは、配列番号1の配列のアミノ酸52と53との間へのDFLAEGLTPR、KATN^{*}ATLSPR及びKATXATLSPRから選択される配列の挿入、並びに配列番号1の配列のアミノ酸4～13の欠失からなり、変異C'は、配列番号1の配列のアミノ酸52と53との間へのTSKLTR、FNDFTR、LSSMTR、PPSLTR及びLSCGQRから選択される配列の挿入、並びに配列番号1の配列のアミノ酸4～9の欠失からなる、タンパク質に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号1の変異配列を含むタンパク質であって、前記配列番号1の変異配列は少なくとも1つの変異A、A'、B、C又はC'を含み、変異Aは、DFLAEGLTTPR、KATN^{*}ATLSPR及びKATXATLSPRから選択される配列による配列番号1の配列のアミノ酸43～52の置換からなり、変異A'は、TSKLTR、FNDFTR、LSSMTR、PPSLTR及びLSCGQRから選択される配列による配列番号1の配列のアミノ酸47～52の置換からなり、変異Bは、配列番号1の配列のアミノ酸52と53との間へのDFLAEGLTTPR、KATN^{*}ATLSPR、KATXATLSPR、TSKLTR、FNDFTR、LSSMTR、PPSLTR及びLSCGQRから選択される配列の挿入からなり、
変異Cは、配列番号1の配列のアミノ酸52と53との間へのDFLAEGLTTPR、KATN^{*}ATLSPR及びKATXATLSPRから選択される配列の挿入、並びに配列番号1の配列のアミノ酸4～13の欠失からなり、
変異C'は、配列番号1の配列のアミノ酸52と53との間へのTSKLTR、FNDFTR、LSSMTR、PPSLTR及びLSCGQRから選択される配列の挿入、並びに配列番号1の配列のアミノ酸4～9の欠失からなり、
N^{*}は任意選択にグリコシル化アスパラギンである、タンパク質。

10

【請求項 2】

少なくとも1つの変異A、A'、B、C又はC'を有する配列番号7の配列を含む、好ましくはそれらからなることを特徴とする、請求項1に記載のタンパク質。

20

【請求項 3】

配列番号9～16、18～25、27～34、105～112、114～121及び123～130から選択される配列を含むことを特徴とする、請求項1又は2に記載のタンパク質。

【請求項 4】

請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質、及び配列番号2の配列の少なくとも1つのタンパク質を含み、前記タンパク質がジスルフィド結合によって互いに連結されている、タンパク質複合体。

【請求項 5】

請求項1～4のいずれか一項に記載のタンパク質をコードすることを特徴とする核酸。

【請求項 6】

配列番号77～84、86～93、95～102、133～140、142～149及び151～158の配列から選択されることを特徴とする、請求項5に記載の核酸。

30

【請求項 7】

請求項5又は6に記載の核酸を含む、発現カセット。

【請求項 8】

請求項7に記載の発現カセットを含むことを特徴とする、発現ベクター。

【請求項 9】

請求項5又は6に記載の核酸を含む組換え細胞であって、前記核酸が、好ましくは請求項8に記載のベクター内に含まれる、組換え細胞。

40

【請求項 10】

医薬として使用するための請求項1～4のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 11】

出血性障害の治療に使用するための請求項1～4のいずれか一項に記載のタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、第X因子変異体及び血液凝固障害の治療におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

第X因子は血中に存在するタンパク質である。このタンパク質は凝固カスケードにおい

50

て重要な役割を果たす。血液凝固は、損傷した血管を通る血液の流れを阻止できるようにする複雑なプロセスである。血管が破壊するとすぐに、凝固の役割を担う要素が互いに相互作用して、血管が破壊した部位に止血栓である栓を形成する。適所に止血栓を保持し、凝固を安定化させるために、凝固因子が必要とされる。

【0003】

正常な凝固の形成は4つの段階で発生する：

段階1 血管が損傷する。

段階2 損傷した領域への血液供給を制限するように血管が収縮する。

段階3 血小板が、血管損傷の際に露出した内皮細胞下腔に付着し、更に刺激された血管壁にも付着する。血小板は広がり、これは「血小板粘着」と称されるものである。これらの広がった血小板は他の隣接する血小板を活性化し、それによってそれらは止血栓を形成するために損傷の中心で凝集する。これは「血小板凝集」と称されるものである。

段階4 このように活性化した血小板の表面は、血液凝固が起こりうる表面を構成する。血中に循環する凝固タンパク質(第X因子を含む)は、血小板の表面で活性化され、フィブリン塊を形成する。

【0004】

これらの凝固タンパク質(すなわち、第I因子、第II因子、第V因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子及び第XIII因子、加えてヴォン・ヴィレブランド因子)は、連鎖反応、すなわち凝固カスケードにおいて作用する。

【0005】

活性化形態(Xa)の第X因子は、特に、プロトロンビナーゼ複合体を形成するように、活性化した第V補因子と複合体を形成する場合、より特には、プロトロンビン(第II因子)からトロンビン(第IIa因子)の活性化に関与する。この因子は凝固カスケードにおいて必須要素である。

【0006】

この因子が欠失している場合、鼻出血(鼻血)、関節血症(関節腔内への血液の浸出)又は消化管出血等の出血が起こる。第X因子欠損は極めて稀である。その遺伝は常染色体劣性であり、その有病率は1/1000000である。

【0007】

FX活性化は、

- 微量のトロンビンの形成が生じる比較的効果的が低い反応において、第VIIa因子/組織因子複合体による凝固カスケード開始段階の間の極めて早期か、
- 又は第VIII因子及び第IX因子の活性化をもたらす、微量のトロンビンによって生じる正のフィードバックに起因する凝固カスケード増幅段階の間のいずれかに発生する。

【0008】

後者の2つの因子は血友病A及び血友病Bを患っている個体では欠損しているため、治療しなければ致命的になりうる出血性障害を引き起こす。これらの因子の不在は、出血を停止させるのに十分な量の活性化した第X因子を生成できないことを意味する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、凝固の開始の間に生成された微量のトロンビンの直接使用により、トロンビンによって活性化でき、第VIII因子及び/又は第IX因子の不在下で効果的に凝固することができる改変された第X因子についての必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、トロンビンによって効果的に活性化され、それ故、第VIII因子、第IX因子及び更に第X因子の不在下で凝固を修復できる、特定の第X因子変異体(第X因子バリアン

10

20

30

40

50

トとも呼ばれる)を同定した。実際に、実施例において実証されているように、これらの第X因子変異体はトロンビンによって活性化でき、内因性第VIII因子及び/又は第IX因子及び/又は第X因子の不在下でさえも効果的な凝固を可能にする。

【0011】

これらの第X因子バリエーションにおいて生成される活性化ペプチド切断部位もまた、第VIIa因子、第IXa因子、第Xa因子、第XIa因子、第XIIa因子又はカリクレイン等の他の凝固プロテアーゼの標的になりうる。

【0012】

更に、第X因子の活性化ペプチドの改変により、トロンビンによる唯一の認識以外に、その薬理学的特性の更なる改変が生じうる。この改変は第X因子バリエーションに特異的活性、安定性若しくはプロテアーゼ耐性の向上又は更に薬物動態の増加を与えうる。加えて、野生型分子と比較して、更なるグリコシル化及びリン酸化の存在又は反対にこれらの改変の不在は、活性化ペプチドに導入される改変によって引き起こされうる。

【0013】

したがって、本発明は、配列番号1の変異配列を含むタンパク質であって、前記配列番号1の変異配列は少なくとも1つの変異A、A'、B、C又はC'を含み、
変異Aは、DFLAEGLTPT、KATN^{*}ATLSPR及びKATXATLSPRから選択される配列による配列番号1の配列のアミノ酸43～52の置換からなり、
変異A'は、TSKLTR、FNDFTR、LSSMTR、PPSLTR及びLSCGQRから選択される配列による配列番号1の配列のアミノ酸47～52の置換からなり、
変異Bは、配列番号1の配列のアミノ酸52と53との間へのDFLAEGLTPT、KATN^{*}ATLSPR、KATXATLSPR、TSKLTR、FNDFTR、LSSMTR、PPSLTR及びLSCGQRから選択される配列の挿入からなり、
変異Cは、配列番号1の配列のアミノ酸52と53との間へのDFLAEGLTPT、KATN^{*}ATLSPR及びKATXATLSPRから選択される配列の挿入、並びに配列番号1の配列のアミノ酸4～13の欠失からなり、
変異C'は、配列番号1の配列のアミノ酸52と53との間へのTSKLTR、FNDFTR、LSSMTR、PPSLTR及びLSCGQRから選択される配列の挿入、並びに配列番号1の配列のアミノ酸4～9の欠失からなり、
N^{*}は任意選択にグリコシル化アスパラギンである、タンパク質に関する。

【0014】

本発明の別の主題は前記タンパク質をコードするポリヌクレオチドである。

【0015】

本発明の別の主題は前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターである。

【0016】

本発明の別の主題は前記発現ベクター又は前記ポリヌクレオチドを含む宿主細胞である。

【0017】

本発明の別の主題は医薬としての前記タンパク質の使用である。特に、前記タンパク質は、血液凝固障害、特に血友病A、B及びC(第XI因子欠損)、第X因子欠損等の出血性障害の治療又は更に第VIIa因子を代用するための緊急の凝固の必要性のために使用されてもよい。強力及び迅速な凝血促進反応が必要とされる場合、前記タンパク質は、第VIIa因子及び/若しくはフィブリノーゲン等の他の止血分子と組み合わせて又は更に治療の有効性を増強できる凝血促進化合物(血小板輸血、FEIBA、Kaskadil、Kanokad等の凝血促進混合物)と組み合わせて使用されてもよい。

【0018】

本明細書に使用される場合、「タンパク質」及び「ポリペプチド」という用語は、交換可能に使用され、100より多いアミノ酸を有するアミノ酸配列を指す。本明細書に使用される場合、「タンパク質」という用語は、100から1000の間のアミノ酸、好ましくは120から500の間のアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む。

【0019】

本発明は、配列番号1の変異配列を含むタンパク質であって、前記配列番号1の変異配列は少なくとも1つの変異A、A'、B、C又はC'を含み、
変異Aは、DFLAEGLTTPR、KATN^{*}ATLSPR及びKATXATLSPRから選択される配列による配列番号1の配列のアミノ酸43～52の置換からなり、
変異A'は、TSKLTR、FNDFTR、LSSMTR、PPSLTR及びLSCGQRから選択される配列による配列番号1の配列のアミノ酸47～52の置換からなり、
変異Bは、配列番号1の配列のアミノ酸52と53との間へのDFLAEGLTTPR、KATN^{*}ATLSPR、KATXATLSPR、TSKLTR、FNDFTR、LSSMTR、PPSLTR及びLSCGQRから選択される配列の挿入からなり、
変異Cは、配列番号1の配列のアミノ酸52と53との間へのDFLAEGLTTPR、KATN^{*}ATLSPR及びKATXATLSPRから選択される配列の挿入、並びに配列番号1の配列のアミノ酸4～13の欠失からなり、
変異C'は、配列番号1の配列のアミノ酸52と53との間へのTSKLTR、FNDFTR、LSSMTR、PPSLTR及びLSCGQRから選択される配列の挿入、並びに配列番号1の配列のアミノ酸4～9の欠失からなり、
N^{*}は任意選択にグリコシル化アスパラギンである、タンパク質に関する。

10

【0020】

好ましくは、前記タンパク質は、上記の少なくとも1つの変異A、A'、B、C又はC'を有する配列番号7の配列を含む、好ましくはそれらからなる。

20

【0021】

配列番号7の配列(500アミノ酸)は配列番号1の全ての配列(306アミノ酸)を含む。より特には、配列番号7の配列は、N末端からC末端方向において、シグナルペプチド及びプロペプチド(合計40アミノ酸)、配列番号5の配列、配列番号1の配列、次いで(489～500位置、すなわち12アミノ酸の長さにおいてアミノ酸の)タグ、すなわちHPC4タグを含む。配列番号103の配列はシグナルペプチドを有さず、プロペプチドを有さない配列番号7の配列に対応する。

【0022】

本発明に係る前記タンパク質は凝固障害の治療に効果的である変異第X因子である。

【0023】

第X因子は、スチュワート・プロワー因子とも呼ばれており、F10遺伝子によってコードされ、セリンプロテアーゼEC3.4.21.6を指す。第X因子は306アミノ酸の重鎖及び139アミノ酸の軽鎖から構成される。

30

【0024】

第X因子は、シグナルペプチド、プロペプチド、並びに軽鎖及び重鎖からなる、488アミノ酸のタンパク質である。

【0025】

ヒト第X因子はUniProtKBで受託番号P00742として見出されうる。図1に、その天然構造を例示する。

【0026】

タンパク質はプレプロペプチド形態で翻訳される。シグナルペプチドの切断後、プロペプチドは最終的に切断され、軽鎖及び重鎖(それぞれ142及び306アミノ酸)(チモーゲン)が生じる。凝固の誘発後、重鎖は、254アミノ酸のみ(最初の52アミノ酸は処理の間に切断される)を含有するように活性化ペプチドの切断によって最終的に活性化される:これは第Xa因子の重鎖(配列番号6)である。

40

【0027】

ヒト第X因子のプレプロペプチドは配列番号4に対応する。重鎖は配列番号1に対応し、軽鎖は配列番号5に対応する。重鎖の活性化ペプチドは配列番号3に対応し、52アミノ酸を含む。

【0028】

50

配列番号2は配列番号4のアミノ酸1～182と同一である。

【0029】

配列番号1は配列番号4のアミノ酸183～488と同一である。

【0030】

第Xa因子の重鎖(配列番号6)は、配列番号3のペプチドが切断されている配列番号1に対応する。

【0031】

本発明に係るタンパク質は、構築物に応じて、

- 最大幅で残基42から52の間に含まれる同じ部位における同一の数の残基の置換によって改変されているか、又は

- 残基52と53との間への残基の挿入を受けているか、又は

- 最大幅で残基4から13の間における同一の数の残基の欠失と共に、最大幅で残基52と53との間への残基の挿入を受けている

活性化ペプチドを含む変異第X因子タンパク質を、チモーゲン形態で含む。

【0032】

本発明に係るタンパク質は配列番号1の変異配列を含むタンパク質であって、前記配列番号1の変異配列は少なくとも1つの変異Aを含み、変異Aは、DFLAEGLTPT、KATN⁺ATLSPT及びKATXATLSPTから選択される配列による配列番号1の配列のアミノ酸43～52の置換からなり、N⁺は任意選択にグリコシル化アスパラギンである、タンパク質であってもよい。好ましくは、タンパク質は少なくとも1つの変異Aを有する配列番号7の配列を含む。

【0033】

この場合、更に好ましくは、変異タンパク質は配列番号9、配列番号10及び配列番号11から選択される配列を含む。

【0034】

本発明に係るタンパク質は配列番号1の変異配列を含むタンパク質であって、前記配列番号1の変異配列は少なくとも1つの変異A'を含み、変異A'は、TSKLTR、FNDFTR、LSSMTR、PPSLTR及びLSCGQRから選択される配列による配列番号1の配列のアミノ酸47～52の置換からなる、タンパク質であってもよい。好ましくは、タンパク質は少なくとも1つの変異A'を有する配列番号7の配列を含む。

【0035】

この場合、更に好ましくは、変異タンパク質は、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15及び配列番号16から選択される配列を含む。

【0036】

本発明に係るタンパク質は配列番号1の変異配列を含むタンパク質であって、前記配列番号1の変異配列は少なくとも1つの変異Bを含み、変異Bは、配列番号1の配列のアミノ酸52と53との間へのDFLAEGLTPT、KATN⁺ATLSPT、KATXATLSPT、TSKLTR、FNDFTR、LSSMTR、PPSLTR及びLSCGQRから選択される配列の挿入からなり、N⁺は任意選択にグリコシル化アスパラギンである、タンパク質であってもよい。好ましくは、タンパク質は少なくとも1つの変異Bを有する配列番号7の配列を含む。

【0037】

この場合、更に好ましくは、変異タンパク質は、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24及び配列番号25から選択される配列を含む。

【0038】

本発明に係るタンパク質は、配列番号1の変異配列を含むタンパク質であって、前記配列番号1の変異配列は少なくとも1つの変異Cを含み、変異Cは、配列番号1の配列のアミノ酸52と53との間へのDFLAEGLTPT、KATN⁺ATLSPT及びKATXATLSPTから選択される配列の挿入、並びに配列番号1の配列のアミノ酸4～13の欠失からなり、N⁺は任意選択にグリコシル化アスパラギンである、タンパク質であってもよい。好ましくは、タンパク質は少なくとも1つの変異Cを有する配列番号7の配列を含む。

【 0 0 3 9 】

この場合、更に好ましくは、変異タンパク質は配列番号27、配列番号28及び配列番号29から選択される配列を含む。

【 0 0 4 0 】

本発明に係るタンパク質は、配列番号1の変異配列を含むタンパク質であって、前記配列番号1の変異配列は少なくとも1つの変異C'を含み、変異C'、配列番号1の配列のアミノ酸52と53との間へのTSKLTR、FNDFTR、LSSMTR、PPSLTR及びLSCGQRから選択される配列の挿入、並びに配列番号1の配列のアミノ酸4～9の欠失からなる、タンパク質であってもよい。好ましくは、タンパク質は少なくとも1つの変異C'を有する配列番号7の配列を含む。

【 0 0 4 1 】

この場合、更に好ましくは、変異タンパク質は、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33及び配列番号34から選択される配列を含む。

【 0 0 4 2 】

好ましくは、本発明に係るタンパク質は、配列番号9～16、18～25、27～34、105～112、114～121及び123～130から選択される配列を含む、好ましくはそれらからなる。

【 0 0 4 3 】

本出願に記載されている配列は以下のようにまとめることができる：

【 0 0 4 4 】

【表 1 A】

配列番号	タンパク質	
1	活性化ペプチドを含むヒト第 X 因子重鎖(306 アミノ酸)	
2	ヒト第 X 因子シグナルペプチド、プロペプチド及び軽鎖 (182 アミノ酸)	
3	重鎖活性化ペプチド(52 アミノ酸)	10
4	ヒト第 X 因子プレプロペプチド(488 アミノ酸)	
5	ヒト第 X 因子軽鎖(142 アミノ酸)	
6	活性化ヒト第 X 因子(FXa)重鎖(254 アミノ酸)	
7	FX-WT(ヌクレオチド配列が最適化されたヒト FX に対応)	
8	FX-対照+(フィブリノーゲン上のトロンビン認識部位に対応する配列による 10 アミノ酸の置換を含む配列番号 7 の変異体=フィブリノペプチド A)(比較)	20
9	FX-IIa(変異 A を含む配列番号 7 の変異体: トロンビン切断コンセンサス部位の挿入)	
10	FX-PAR1(変異 A を含む配列番号 7 の変異体: PAR1 受容体上の改変トロンビン切断部位の挿入)	
11	FX-PAR1M(変異 A を含む配列番号 7 の変異体: グリコシル化部位を有さない PAR1 受容体上の改変トロンビン切断部位の挿入)	30
12	FX-FXIa1(変異 A' を含む配列番号 7 の変異体: FIX 上の FXIa 切断部位 1 の挿入)	
13	FX-FXIa2(変異 A' を含む配列番号 7 の変異体: FIX 上の FXIa 切断部位 2 の挿入)	
14	FX-Kal1(変異 A' を含む配列番号 7 の変異体: FXII 上のカリクレイン切断部位 1 の挿入)	40
15	FX-Kal2(変異 A' を含む配列番号 7 の変異体: FXII 上のカリクレイン切断部位 2 の挿入)	
16	FX-Kal3(変異 A' を含む配列番号 7 の変異体: FXII 上のカリクレイン切断部位 3 の挿入)	

【表 1 B】

17	FX-対照+(フィブリノーゲン上のトロンビン認識部位に対応する配列の挿入を含む配列番号 7 の変異体=フィブリノペプチド A)(比較)	
18	FX-IIa(変異 B を含む配列番号 7 の変異体:トロンビン切断コンセンサス部位の挿入)	
19	FX-PAR1(変異 B を含む配列番号 7 の変異体:PAR1 受容体上の改変トロンビン切断部位の挿入)	10
20	FX-PAR1M(変異 B を含む配列番号 7 の変異体:グリコシル化部位を有さない PAR1 受容体上の改変トロンビン切断部位の挿入)	
21	FX-FXIIa1(変異 B を含む配列番号 7 の変異体:FIX 上の FXIIa 切断部位 1 の挿入)	20
22	FX-FXIIa2(変異 B を含む配列番号 7 の変異体:FIX 上の FXIIa 切断部位 2 の挿入)	
23	FX-Kal1(変異 B を含む配列番号 7 の変異体:FXII 上のカリクレイン切断部位 1 の挿入)	
24	FX-Kal2(変異 B を含む配列番号 7 の変異体:FXII 上のカリクレイン切断部位 2 の挿入)	
25	FX-Kal3(変異 B を含む配列番号 7 の変異体:FXII 上のカリクレイン切断部位 3 の挿入)	30
26	FX-対照+(フィブリノーゲン上のトロンビン認識部位に対応する配列の挿入を含む配列番号 7 の変異体=フィブリノペプチド A、及び 10 アミノ酸の欠失)(比較)	
27	FX-IIa(変異 C を含む配列番号 7 の変異体:トロンビン切断コンセンサス部位の挿入)	
28	FX-PAR1(変異 C を含む配列番号 7 の変異体:PAR1 受容体上の改変トロンビン切断部位の挿入)	40
29	FX-PAR1M(変異 C を含む配列番号 7 の変異体:グリコシル化部位を有さない PAR1 受容体上の改変トロンビン切断部位の挿入)	

【表 1 C】

30	FX-FXla1(変異 C'を含む配列番号 7 の変異体:FIX 上の FXla 切断部位 1 の挿入)	
31	FX-FXla2(変異 C'を含む配列番号 7 の変異体:FIX 上の FXla 切断部位 2 の挿入)	
32	FX-Kal1(変異 C'を含む配列番号 7 の変異体:FXII 上のカリク レイン切断部位 1 の挿入)	10
33	FX-Kal2(変異 C'を含む配列番号 7 の変異体:FXII 上のカリク レイン切断部位 2 の挿入)	
34	FX-Kal3(変異 C'を含む配列番号 7 の変異体:FXII 上のカリク レイン切断部位 3 の挿入)	
35	FX-WT(配列番号 7)をコードする核酸配列	
36~75	プライマー	20
76~102	配列番号 8~34 のタンパク質をそれぞれコードする核酸配 列	
103~130	シグナルペプチドを有さず、プロペプチドを有さない配列 番号 7~34 のタンパク質にそれぞれ対応するタンパク質配 列	
131~158	配列番号 103~130 のタンパク質のそれぞれをコードする核 酸配列	30

【0047】

本発明の主題はまた、

- 本発明に係る配列番号1の変異配列を含むタンパク質、及び
- 配列番号2の配列の少なくとも1つのタンパク質

を含み、前記タンパク質はジスルフィド結合によって互いに連結されている、タンパク質複合体である。

【0048】

本発明の別の主題は前記タンパク質をコードする核酸(ポリヌクレオチド)である。好ましくは、核酸は、配列番号77~84、86~93、95~102、133~140、142~149及び151~158の配列から選択される。

【0049】

本発明の別の主題は、前記タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、又は前記ポリヌクレオチドを含む発現カセットである。本発明によれば、本発明に係る使用に適した発現ベクターは、核酸配列に機能的に連結される少なくとも1つの発現制御エレメントを含むことができる。発現制御エレメントはベクター内に挿入され、核酸配列の発現を調節することが可能となる。発現制御エレメントの発現は、特にlac系、ラムダファージプロモーター、酵母プロモーター又はウイルスプロモーターを含む。リーダー配列、停止コドン、ポリアデニル化シグナル並びに宿主系における核酸配列の後の転

10

20

30

40

50

写及び翻訳に必要な配列等の他の機能的エレメントが組み込まれてもよい。発現制御エレメントの正確な組合せは選択される宿主系に依存することは、当業者であれば理解しているものと予想される。また、発現ベクターは、宿主系内及び宿主系中に核酸配列を含有する発現ベクターの後の転移及び複製に必要な追加のエレメントを含有しなければならないことも理解しているものと予想される。

【 0 0 5 0 】

このようなベクターは従来の方法又は商業的に利用可能な方法を使用して容易に構築される。

【 0 0 5 1 】

本発明の別の主題は、上記の発現ベクター、又は上記のポリヌクレオチドを含む組換え細胞である。本発明によれば、使用されうる宿主細胞の例は、動物、植物、昆虫及び酵母細胞等の真核細胞;並びに大腸菌(E.coli)等の原核細胞である。遺伝子を保持するベクターを細胞内に導入することができる手段は、特に、DEAE-デキストラン、リポフェクション、リン酸カルシウムによるマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、形質導入若しくはトランスフェクション又は当業者に公知の他の手段を含む。1つの好ましい実施形態において、真核細胞において機能する真核生物発現ベクターが使用される。このようなベクターの例には、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、天然痘ウイルス、ポリオウイルス若しくはレンチウイルス等のウイルスベクター、細菌発現ベクター又はpcDNA5等のプラスミドが含まれる。好ましい真核細胞株には、COS細胞、CHO細胞、HEK細胞、BHK細胞、PerC6細胞、ヒーラ細胞、NIH/3T3 293細胞(ATCC#CRL1573)、T2細胞、樹状細胞又は単球が含まれる。

【 0 0 5 2 】

本発明に係るタンパク質はトランスジェニック動物の乳中で産生されうる。

【 0 0 5 3 】

この場合、第1の態様によれば、本発明に係るタンパク質をコードする遺伝子を含有するDNA配列の発現は、哺乳動物カゼインプロモーター又は哺乳動物ホエープロモーターによって制御され、前記プロモーターは、生来、前記遺伝子の転写を制御せず、DNA配列はまた、タンパク質を分泌するための配列を含有する。分泌配列は遺伝子とプロモーターとの間に介在する分泌シグナルを含む。

【 0 0 5 4 】

使用されるトランスジェニック動物は、所望のタンパク質を産生できるだけでなく、この能力をその子孫に伝えることもできる。乳内へのタンパク質の分泌は精製を容易にし、血液製剤の使用を回避する。このように動物は、ヤギ、雌ウサギ、雌ヒツジ又は雌ウシから選択されうる。

【 0 0 5 5 】

本発明に係るタンパク質は医薬として使用されうる。したがって、本発明に係るタンパク質は医薬組成物内に導入されうる。特に、本発明に係るタンパク質は、凝固障害、特に出血性障害の治療に使用されうる。

【 0 0 5 6 】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容可能な賦形剤と、任意選択に、治療組成物を形成するために生分解性ポリマー等の持続放出マトリクスとを組み合わせてもよい。

【 0 0 5 7 】

本発明の医薬組成物は、経口、舌下、皮下、筋肉内、静脈内、動脈内、髄腔内、眼内、大脳内、経皮、局所又は直腸内に投与されてもよい。次いで、単独で又は別の有効成分と組み合わせて、有効成分は、従来の薬学的担体との混合物として単位投与形態で投与されてもよい。単位投与形態は、錠剤、ゲルカプセル、粉剤、顆粒剤及び経口服液剤又は懸濁剤等の経口形態、舌下及び口腔投与形態、エアロゾル、皮下インプラント、経皮、局所、腹腔内、筋肉内、静脈内、皮下及びくも膜下投与形態、鼻腔内投与形態及び直腸投与形態を含む。

【 0 0 5 8 】

10

20

30

40

50

好ましくは、医薬組成物は、注入されうる製剤のための薬学的に許容可能なビヒクルを含有する。これは、特に、無菌等張製剤、食塩水(リン酸ナトリウム若しくはリン酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム若しくは塩化マグネシウム等又はこのような塩の混合物を含む)、又は必要に応じて、滅菌水若しくは生理食塩水が加えられる場合、注射可能な溶質の構成を可能にする、凍結乾燥組成物を含んでもよい。

【0059】

注射用途に適した薬剤形態は、無菌水溶液又は分散体、ゴマ油及びピーナッツ油を含む油性製剤、並びに無菌注射溶液又は分散体の即時調製のための無菌粉剤を含む。いずれにしても、この形態は注射器を使用して注射されなければならないので、無菌でなければならない、流体でなければならない。それは製造及び貯蔵条件下で安定でなければならない、細菌及び真菌等の微生物の汚染作用から保護されていなければならない。

10

【0060】

本発明に係る分散体は、グリセロール、脂質ポリエチレングリコール若しくはそれらの混合物中、又は油中で調製されうる。貯蔵及び使用の正常な条件下で、これらの製剤は微生物増殖を阻止するための防腐剤を含有する。

【0061】

薬学的に許容可能なビヒクルは、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等)、これらの適切な混合物、及び/又は植物油を含有する、溶媒又は分散媒であってもよい。好適な流動性は、例えば、レシチン等の界面活性剤の使用により維持されうる。微生物の作用の阻止は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸又はその他にチメロサルによってもたらされうる。多くの場合、等張剤、例えば糖又は塩化ナトリウムを含むことが好適である。注射組成物の持続的吸収は、組成物中の吸収遅延剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム又はゼラチンの使用によってもたらされうる。

20

【0062】

無菌注射溶液は、上に挙げた他の成分のいくつかと共に、適切な溶媒内に必要とされる量で有効物質を組み込むことによって調製され、必要に応じて後で濾過滅菌が行われる。一般に、分散体は、基礎分散媒及び上に挙げたものの中で必要とされる他の成分を含有する無菌ビヒクル内に種々の滅菌された有効成分を組み込むことによって調製される。無菌注射溶液を調製するための無菌粉剤の場合、好ましい調製プロセスは真空及び凍結乾燥下での乾燥である。上記溶液は、処方中、投薬レジメン処方と適合するように治療有効量で投与される。製剤は上記の注射溶液等の種々の薬剤形態で容易に投与されるが、薬物放出カプセル等も使用できる。例えば水溶液の非経口投与に関して、上記溶液は、適切に緩衝化されていなければならない、液体希釈剤は、十分な量の食塩水又はグルコースで等張になっていなければならない。これらの特定の水溶液は、特に、静脈内、筋肉内、皮下及び腹腔内投与に適している。これに関して、使用されうる滅菌水媒体は当業者周知である。例えば、用量は1mlの等張NaCl溶液中に溶解されてもよく、次いで1000mlの適切な液体に加えられてもよく、又は提案された注入部位に注射されてもよい。治療される対象の状態に応じて、特定の投薬レジメンの変更が必要になると予想される。

30

【0063】

本発明の医薬組成物は、用量当たり約0.0001~1.0ミリグラム、又は約0.001~0.1ミリグラム、又は約0.1~1.0ミリグラム、又は更に約10ミリグラム又はそれ以上を含む治療混合物中で製剤化されうる。複数回用量もまた、投与されてもよい。特定の患者に特有の治療有効量のレベルは、治療される障害及び疾患の重症度、使用される特定の化合物の活性、使用される特定の組成物、患者の年齢、体重、全体的な健康、性別及び食事、投与時間、投与経路、使用される特定の化合物の排泄率、治療期間、又はその他に並行して使用される医薬を含む、種々の要因に依存する。

40

【0064】

以下の例は、本発明の種々の実施形態を例示する目的のために記載される。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 6 5 】

【図 1】天然ヒト第X因子の構造である。

【図 2】変異体の開発戦略である。ファミリー1は変異A又はA'を含む変異体を含む。ファミリー2は変異Bを含む変異体を一緒にグループ化している。ファミリー3は変異C又はC'を含む変異体を一緒にグループ化している。

【図 3】CHO中で産生されたバリエーション因子の発現のレベルである。3つのFXファミリーがCHO中でのトランスフェクション後に発現した。7日目の上清を、Zymutest FXキット(Hyphen社)を用いて3連で分析した。濃度($\mu\text{g/ml}$)をy軸に沿って示す。標準偏差をヒストグラムの上に示す。ファミリー1、灰色のバー;ファミリー2、黒色のバー;ファミリー3、白色のバー。

10

【図 4】HEK中で産生された第X因子及びバリエーション因子の発現のレベルである。3つのFXファミリーがHEK293S中でのトランスフェクション後に発現した。7日目の上清を、Zymutest FXキット(Hyphen社)を用いて3連で分析した。濃度($\mu\text{g/ml}$)をy軸に沿って示す。標準偏差をヒストグラムの上に示す。ファミリー1、灰色のバー;ファミリー2、黒色のバー;ファミリー3、白色のバー。

【図 5】第X因子欠損血漿中のCHO中で産生された第X因子及びバリエーション因子の時間測定による(chronometric)活性である。3つのFXファミリーがCHO-S中でのトランスフェクションの後に発現した。7日目の上清を、Star自動装置(Stago社)でTP試験によって少なくとも2連で分析した。凝固時間は比活性 $\{s/(\mu\text{g/ml})\}$ を算出することを可能にし、次いで野生型組換え第X因子活性の百分率に変換した。これらの値をy軸に沿って与える。標準偏差をヒストグラムの上に示す。ファミリー1、灰色のバー;ファミリー2、黒色のバー;ファミリー3、白色のバー。*FX-Ka12ファミリー3は行わず。

20

【図 6】RVV-X画分による活性化後、CHO中で産生したファミリー1の第X因子バリエーション因子の活性である。ファミリー1のFXバリエーション因子がCHO-S中でのトランスフェクション後に発現した。7日目に上清を、ラッセルクサリヘビ蛇毒のRVV-X画分の存在下で2つのFX濃度(少なくとも2連)にてインキュベートした。405nmにてpNAPEP 1025基質の加水分解をモニターすることによってFXaの出現を測定した。初期変換速度(mODU/分/nM)を、100%に固定したFX-WTのものと比較した。2つの濃度における値の平均を確立し、y軸に与える。標準偏差をヒストグラムの上に示す。

【図 7】組織因子(1pM)による活性化後、第VIII因子欠損血漿のプールへのファミリー2のFX又はそのバリエーション因子の添加から得たトロンビノグラム(thrombinogram)である。x軸に沿って:時間(分)- y軸に沿って:観察されたトロンビンの最大濃度(nM) 正常な血漿プール試料は黒色の曲線()で表し、第FVIII因子欠損血漿プール試料は(O)で表す。1U/ml又は0.1U/mlのFVIIIでオーバーロードした欠損血漿に対応する曲線はそれぞれ、記号 及び で表す。野生型FX及びバリエーション因子を表す記号は以下の通りである:FX-WT(), FX-対照+(), FX-IIIa(), FX-PAR1(), FX-PAR1M(実線におけるx), FX-FIXa1(*), FX-FIXa2(破線を有するx), FX-Ka1(

30

【数 1】

ト

40

), FX-Ka12(

【数 2】

○

)及びFX-Ka13(記号を有さない実線)。技術的理由のためにFX-Ka12及び3はそれぞれ3.5及び1.65 $\mu\text{g/ml}$ にて使用したことを除いて、第X因子又はそのバリエーション因子は5 $\mu\text{g/ml}$ にて使用した。

【図 8】セファリンによる活性化後、第VIII因子欠損血漿のプールへのファミリー2のFX

50

又はそのバリエーションの添加から得たトロンビノグラムである。- x軸に沿って:時間(分)- y軸に沿って:観察されたトロンビンの最大濃度(nM)正常な血漿プール試料は黒色の曲線()で表し、第FVIII因子欠損血漿プール試料は(○)で表す。1U/ml又は0.1U/mlのFVIIIでオーバーロードした欠損血漿に対応する曲線はそれぞれ、記号 及び で表す。野生型FX及びバリエーションを表す記号は以下の通りである:FX-WT(), FX-対照+(), FX-IIIa(), FX-PAR1(), FX-PAR1M(実線における x)、FX-FIXa1(*)、FX-FIXa2(破線を有する x)、FX-Kal1(

【数 3】

ト

10

), FX-Kal2(

【数 4】

○

)及びFX-Kal3(記号を有さない実線)。技術的理由のためにFX-Kal2及び3はそれぞれ3.5及び1.65 µg/mlにて使用したことを除いて、第X因子又はそのバリエーションは5 µg/mlにて使用した。

【図 9】組織因子又はセファリンによる活性化後、第VIII因子欠損血漿のプールへのファミリー2のFX又はそのバリエーションの添加から得たトロンボグラムの速度である。図7及び図8から得られた速度の値(生成したトロンビンのnM/分)を提示する。他のFX及びバリエーションについて5 µg/mlの代わりに、FX-Kal2及び3(*)はそれぞれ3.5及び1.65 µg/mlにて使用したことに留意すべきである。白いバー、組織因子(1pM)による活性化によって得られた値; 黒いバー、セファリンによる活性化によって得られた値。

20

【図 10】組織因子(1pM)による活性化後、第IX因子欠損血漿のプールへのファミリー2のFX又はそのバリエーションの添加から得たトロンビノグラムである。- x軸に沿って:時間(分)- y軸に沿って:観察されたトロンビンの最大濃度(nM)正常な血漿プール試料は黒色の曲線()で表し、第FVIII因子欠損血漿プール試料は(○)で表す。1U/ml又は0.1U/mlのFVIIIでオーバーロードした欠損血漿に対応する曲線はそれぞれ、記号 及び で表す。野生型FX及びバリエーションを表す記号は以下の通りである:FX-WT(), FX-対照+(), FX-IIIa(), FX-PAR1(), FX-PAR1M(実線における x)、FX-FIXa1(*)、FX-FIXa2(破線を有する x)、FX-Kal1(

30

【数 5】

ト

), FX-Kal2(

【数 6】

○

40

)及びFX-Kal3(記号を有さない実線)。技術的理由のためにFX-Kal2及び3はそれぞれ3.5及び1.65 µg/mlにて使用したことを除いて、第X因子又はそのバリエーションは5 µg/mlにて使用した。

【図 11】セファリンによる活性化後、第IX因子欠損血漿のプールへのファミリー2のFX又はそのバリエーションの添加から得たトロンビノグラムである。- x軸に沿って:時間(分)- y軸に沿って:観察されたトロンビンの最大濃度(nM)正常な血漿プール試料は黒色の曲線()で表し、第FVIII因子欠損血漿プール試料は(○)で表す。1U/ml又は0.1U/mlのFVIIIでオーバーロードした欠損血漿に対応する曲線はそれぞれ、記号 及び で表す。野生型FX

50

及びバリエーションを表す記号は以下の通りである:FX-WT(), FX-対照+(), FX-IIIa(), FX-PAR1(), FX-PAR1M(実線における x), FX-FIXa1(*), FX-FIXa2(破線を有する x), FX-Ka11(

【数 7】

ト

), FX-Ka12(

【数 8】

○

10

)及びFX-Ka13(記号を有さない実線)。技術的理由のためにFX-Ka12及び3はそれぞれ3.5及び1.65 µg/mlにて使用したことを除いて、第X因子又はそのバリエーションは5 µg/mlにて使用した。

【図 1 2】組織因子(1pM)又はセファリンによる活性化後、第IX因子欠損血漿のプールへのファミリー2のFX又はそのバリエーションの添加から得られたトロンボグラムの速度である。図10及び図11から得られた速度の値(生成したトロンビンのnM/分)を提示する。他のFX及びバリエーションについて5 µg/mlの代わりに、FX-Ka12及び3()はそれぞれ3.5及び1.65 µg/mlにて使用したことに留意すべきである。結果を対数目盛で提示する。より読みやすくするために、生成したトロンビンの1nM/分未満の値は表さない(+)。白いバー、組織因子(1pM)による活性化によって得られた値;黒いバー、セファリンによる活性化によって得られた値。

20

【図 1 3】ファミリー2のFX-WT及びバリエーションのトロンビン活性化である。ファミリー2のFX-WT及びその特定のバリエーションの活性化を、Pefachrome FXa 8595基質を含有するHepes緩衝液中でトロンビン(10nM)の存在下で実施した。生成したFXaによって放出したパラ-ニトロアニリドの出現を経時的に405nmにてモニターした。種々の濃度にて、活性化した第X因子を陽性対照として使用した。

【図 1 4】組織因子による活性化後、第VIII因子欠損血漿のプールへのファミリー1のFX又はそのバリエーションの添加から得られたトロンビノグラムである。- x軸に沿って:時間(分)- y軸に沿って:観察されたトロンビンの最大濃度(nM)正常な血漿プール試料は黒色の曲線()で表し、第FVIII因子欠損血漿プール試料は(○)で表す。1U/ml又は0.1U/mlのFVIIIでオーバーロードした欠損血漿に対応する曲線はそれぞれ、記号 及び で表す。野生型FX及びバリエーションを表す記号は以下の通りである:FX-WT(), FX-対照+(), FX-IIIa(), FX-PAR1(), FX-PAR1M(実線における x), FX-FIXa1(*), FX-FIXa2(破線を有する x), FX-Ka11(

30

【数 9】

ト

), FX-Ka12(

【数 1 0】

○

)及びFX-Ka13(記号を有さない実線)。技術的理由のためにFX-Ka13は1.65 µg/mlにて使用したことを除いて、第X因子又はそのバリエーションは7.5 µg/mlにて使用した。

【図 1 5】セファリンによる活性化後、第VIII因子欠損血漿のプールへのファミリー1のFX又はそのバリエーションの添加から得られたトロンビノグラムである。- x軸に沿って:時間(分)- y軸に沿って:観察されたトロンビンの最大濃度(nM)正常な血漿プール試料は黒色

40

50

の曲線()で表し、第FVIII因子欠損血漿プール試料は(○)で表す。1U/ml又は0.1U/mlのFVIIIでオーバーロードした欠損血漿に対応する曲線はそれぞれ、記号 及び で表す。野生型FX及びバリエーションを表す記号は以下の通りである:FX-WT(), FX-対照+(), FX-IIa(), FX-PAR1(), FX-PAR1M(実線における×)、FX-FIXa1(*), FX-FIXa2(破線を有する×)、FX-Ka11(

【数 1 1】

ト

), FX-Ka12(

【数 1 2】



)及びFX-Ka13(記号を有さない実線)。技術的理由のためにFX-Ka13は1.65 µg/mlにて使用したことを除いて、第X因子又はそのバリエーションは7.5 µg/mlにて使用した。

【図 1 6】組織因子(1pM)又はセファリンによる活性化後、第VIII因子欠損血漿のプールへのファミリー-1のFX又はそのバリエーションの添加から得られたトロンボグラムの速度である。図14及び図15から得られた速度の値(生成したトロンビンのnM/分)を提示する。他のFX及びバリエーションについて7.5 µg/mlの代わりに、FX-Ka13(*)は1.65 µg/mlにて使用したことに留意すべきである。FX-WTの値は2回の実験の平均である。より読みやすくするために、生成したトロンビンの1nM/分未満の値は表さない(+)。白いバー、組織因子(1pM)による活性化によって得られた値;黒いバー、セファリンによる活性化によって得られた値。

【図 1 7】組織因子による活性化後、第IX因子欠損血漿のプールへのファミリー-1のFX又はそのバリエーションの添加から得られたトロンボグラムである。- x軸に沿って:時間(分)- y軸に沿って:観察されたトロンビンの最大濃度(nM)正常な血漿プール試料は黒色の曲線()で表し、第FIX因子欠損血漿プール試料は(○)で表す。1U/ml又は0.1U/mlのFIXでオーバーロードした欠損血漿に対応する曲線はそれぞれ、記号 及び で表す。野生型FX及びバリエーションを表す記号は以下の通りである:FX-WT(), FX-対照+(), FX-IIa(), FX-PAR1(), FX-PAR1M(実線における×)、FX-FIXa1(*), FX-FIXa2(破線を有する×)、FX-Ka11(

【数 1 3】

ト

), FX-Ka12(

【数 1 4】



)及びFX-Ka13(記号を有さない実線)。技術的理由のためにFX-Ka13は1.65 µg/mlにて使用したことを除いて、第X因子又はそのバリエーションは7.5 µg/mlにて使用した。

【図 1 8】セファリンによる活性化後、第IX因子欠損血漿のプールへのファミリー-1のFX又はそのバリエーションの添加から得られたトロンボグラムである。- x軸に沿って:時間(分)- y軸に沿って:観察されたトロンビンの最大濃度(nM)正常な血漿プール試料は黒色の曲線()で表し、第FIX因子欠損血漿プール試料は(○)で表す。1U/ml又は0.1U/mlのFIXでオーバーロードした欠損血漿に対応する曲線はそれぞれ、記号 及び で表す。野生型FX及びバリエーションを表す記号は以下の通りである:FX-WT(), FX-対照+(), FX-IIa(), FX-PAR1(), FX-PAR1M(実線における×)、FX-FIXa1(*), FX-FIXa2(破線を有する×)、FX-Ka11(

10

20

30

40

50

【数 1 5】

ト

)、FX-Kal2(

【数 1 6】

○

)及びFX-Kal3(記号を有さない実線)。技術的理由のためにFX-Kal3は $1.65 \mu\text{g/ml}$ にて使用したことを除いて、第X因子又はそのバリエーションは $7.5 \mu\text{g/ml}$ にて使用した。

10

【図 1 9】組織因子(1pM)又はセファリンによる活性化後、第IX因子欠損血漿のプールへのファミリー-1のFX又はそのバリエーションの添加から得られたトロンボグラムの速度である。図17及び図18から得られた速度の値(生成したトロンビンのnM/分)を提示する。他のFX及びバリエーションについて $7.5 \mu\text{g/ml}$ の代わりに、FX-Kal3(〃)は $1.65 \mu\text{g/ml}$ にて使用したことに留意すべきである。FX-WTの値は2回の実験の平均である。より読みやすくするために、生成したトロンビンの1nM/分未満の値は表さない(+)。白いバー、組織因子(1pM)による活性化によって得られた値;黒いバー、セファリンによる活性化によって得られた値。

【図 2 0】組織因子による活性化後、第VIII因子欠損血漿のプールへのファミリー-3のFX又はそのバリエーションの添加から得られたトロンボグラムである。- x軸に沿って:時間(分)- y軸に沿って:観察されたトロンビンの最大濃度(nM)正常な血漿プール試料は黒色の曲線()で表し、第FVIII因子欠損血漿プール試料は(○)で表す。1U/ml又は0.1U/mlのFVIIIでオーバーロードした欠損血漿に対応する曲線はそれぞれ、記号 及び で表す。野生型FX及びバリエーションを表す記号は以下の通りである:FX-WT(及び---)、FX-対照+()、FX-IIa()、FX-PAR1()、FX-PAR1M(実線におけるx)、FX-FIXa1(*)、FX-FIXa2(破線を有するx)、FX-Kal1(

20

【数 1 7】

ト

)、FX-Kal2(

【数 1 8】

○

)及びFX-Kal3(記号を有さない実線)。技術的理由のためにFX-Kal3は $1.65 \mu\text{g/ml}$ にて使用したことを除いて、第X因子又はそのバリエーションは $7.5 \mu\text{g/ml}$ にて使用した。

30

【図 2 1】セファリンによる活性化後、第VIII因子欠損血漿のプールへのファミリー-3のFX又はそのバリエーションの添加から得られたトロンボグラムである。- x軸に沿って:時間(分)- y軸に沿って:観察されたトロンビンの最大濃度(nM)正常な血漿プール試料は黒色の曲線()で表し、第FVIII因子欠損血漿プール試料は(○)で表す。1U/ml又は0.1U/mlのFVIIIでオーバーロードした欠損血漿に対応する曲線はそれぞれ、記号 及び で表す。野生型FX及びバリエーションを表す記号は以下の通りである:FX-WT(及び---)、FX-対照+()、FX-IIa()、FX-PAR1()、FX-PAR1M(実線におけるx)、FX-FIXa1(*)、FX-FIXa2(破線を有するx)、FX-Kal1(

40

【数 1 9】

ト

)、FX-Kal2(

50

【数 2 0】



)及びFX-Ka13(記号を有さない実線)。技術的理由のためにFX-Ka13は1.65 $\mu\text{g/ml}$ にて使用したことを除いて、第X因子又はそのバリエーションは7.5 $\mu\text{g/ml}$ にて使用した。

【図 2 2】組織因子(1pM)又はセファリンによる活性化後、第VIII因子欠損血漿のプールへのファミリー3のFX又はそのバリエーションの添加から得られたトロンボグラムの速度である。図20及び図21から得られた速度の値(生成したトロンビンのnM/分)を提示する。他のFX及びバリエーションについて7.5 $\mu\text{g/ml}$ の代わりに、FX-Ka13(*)は1.65 $\mu\text{g/ml}$ にて使用したこと 10
に留意すべきである。FX-WTの値は2回の実験の平均である。白いバー、組織因子(1pM)による活性化によって得られた値;黒いバー、セファリンによる活性化によって得られた値。

【図 2 3】組織因子による活性化後、第IX因子欠損血漿のプールへのファミリー3のFX又はそのバリエーションの添加から得られたトロンボグラムである。- x軸に沿って:時間(分)- y軸に沿って:観察されたトロンビンの最大濃度(nM)正常な血漿プール試料は黒色の曲線()で表し、第FIX因子欠損血漿プール試料は(O)で表す。1U/ml又は0.1U/mlのFIXでオーバーロードした欠損血漿に対応する曲線はそれぞれ、記号 及び で表す。野生型FX及びバリエーションを表す記号は以下の通りである:FX-WT(), FX-対照+(), FX-IIa(), FX-PAR1(), FX-PAR1M(実線における x), FX-FIXa1(*), FX-FIXa2(破線を有する x), FX-Ka11(20

【数 2 1】

ト

), FX-Ka12(

【数 2 2】



)及びFX-Ka13(記号を有さない実線)。技術的理由のためにFX-Ka13は1.65 $\mu\text{g/ml}$ にて使用したことを除いて、第X因子又はそのバリエーションは7.5 $\mu\text{g/ml}$ にて使用した。

【図 2 4】セファリンによる活性化後、第IX因子欠損血漿のプールへのファミリー3のFX又はそのバリエーションの添加から得られたトロンボグラムである。- x軸に沿って:時間(分)- y軸に沿って:観察されたトロンビンの最大濃度(nM)正常な血漿プール試料は黒色の曲線()で表し、第FIX因子欠損血漿プール試料は(O)で表す。1U/ml又は0.1U/mlのFIXでオーバーロードした欠損血漿に対応する曲線はそれぞれ、記号 及び で表す。野生型FX及びバリエーションを表す記号は以下の通りである:FX-WT(), FX-対照+(), FX-IIa(), FX-PAR1(), FX-PAR1M(実線における x), FX-FIXa1(*), FX-FIXa2(破線を有する x), FX-Ka11(30
40

【数 2 3】

ト

), FX-Ka12(

【数 2 4】



)及びFX-Ka13(記号を有さない実線)。技術的理由のためにFX-Ka13は1.65 $\mu\text{g/ml}$ にて使用

50

したことを除いて、第X因子又はそのバリエーションは7.5 µg/mlにて使用した。

【図25】組織因子(1pM)又はセファリンによる活性化後、第IX因子欠損血漿のプールへのファミリー3のFX又はそのバリエーションの添加から得られたトロンボグラムの速度である。図23及び図24から得られた速度の値(生成したトロンビンのnM/分)を提示する。他のFX及びバリエーションについて7.5 µg/mlの代わりに、FX-Ka13(*)は1.65 µg/mlにて使用したことに留意すべきである。FX-WTの値は2回の実験の平均である。白いバー、組織因子(1pM)による活性化によって得られた値;黒いバー、セファリンによる活性化によって得られた値。

【発明を実施するための形態】

【0066】

10

実施例

(実施例1)

第X因子バリエーションの相補的DNAの生成

1-概説

種々の構築物のヌクレオチド及びタンパク質配列が配列表に記載され、表の説明にまとめられている。野生型FX分子はFX-WT(配列番号7)と呼ばれ、それはヒトFXに対応し、そのヌクレオチド配列は最適化されている。この分子は変異分子の3つのファミリーのための対照として使用される。

【0067】

変異分子は重鎖の上流に位置する切断部位に従って命名される。FX-対照+はフィブリノーゲン又はフィブリノペプチドA上のトロンビン認識部位に対応する。本発明に係る変異分子は、それぞれ、FX-IIa(トロンビン切断コンセンサス部位)、FX-PAR1(PAR1受容体上の改変トロンビン切断部位)、FX-PAR1M(グリコシル化部位を有さないPAR1受容体上の改変トロンビン切断部位)、FX-FXla1(FIX上のFXIa切断部位1)、FX-FXla2(FIX上のFXIa切断部位2)、FX-Ka11(FXII上のカリクレイン切断部位1)、FX-Ka12(FXII上のカリクレイン切断部位2)及びFX-Ka13(FXII上のカリクレイン切断部位3)と命名される。

20

【0068】

図2に示されるように、これらの部位の各々は異なる環境(ファミリー)、すなわち:

- 活性化ペプチド切断部位の上流の6又は10アミノ酸の置換からなるファミリー1(変異A又はA');
 - 又は活性化ペプチド切断部位の上流の同じ配列の挿入からなるファミリー2(変異B);
 - 又は活性化ペプチドの部分の欠失に連結される、活性化ペプチド切断部位の上流のこれらの配列の挿入からなるファミリー3(変異C又はC')
- のいずれかに存在する。

30

【0069】

このように、配列番号9~16の配列のタンパク質は、変異A又はA'が挿入されている配列番号7の配列に対応する。したがって、これらのタンパク質はファミリー1に属する。

【0070】

配列番号18~25の配列のタンパク質は、変異Bが挿入されている配列番号7の配列に対応する。したがって、これらのタンパク質はファミリー2に属する。

40

【0071】

最後に、配列番号27~34の配列のタンパク質は、変異C又はC'が挿入されている配列番号7の配列に対応する。したがって、これらのタンパク質はファミリー3に属する。

【0072】

配列番号8、17及び26の配列はFX-対照+に対応し、比較用である。

【0073】

2-実験プロトコル

ヌクレオチド配列が挿入及び/又は欠失されるように慎重に設計されたプライマーを使用して、各バリエーションに特異的な配列を、アセンブリ又はInfusion PCRによって、ホモサピエンス(Homo sapiens)における発現に最適化されたFXをコードする合成ヌクレオチド配

50

列(配列番号35)内に導入する。

【0074】

2.1. ヒトFXをコードするpCEP4-FXWT4HS-gsベクターの調製

ホモサピエンスにおける発現に最適化し、Genescriptによって調製した合成遺伝子を含むpUC57クローニングベクターを、BamHI及びHindIII酵素を用いて、pCEP4発現ベクター(Life Technologies社)のように消化する。FX遺伝子(FXWT4HSgs)及び消化したpCEP4ベクターに対応する挿入物を、T4リガーゼを使用して一緒にライゲートする前に、Nucleospin抽出物II(Clontech Laboratories社)を使用して精製する。ライゲーション産物を使用して、Top10細菌(Life Technologies社)を形質転換する。細菌コロニー内の挿入物の存在は、BamHI及びHindIII酵素を用いてプラスミドを消化し、1519bpのバンドをプラスミド内で検出するために消化産物をアガロースゲルに通すことによって判定される。CMVs1(5'-GGACTTTCCTACTTGGCAGT-3' 配列番号36)及びSV40-3'UTR(5'-TTCAGTGCATTCTAGTTGTGGT-3' 配列番号37)プライマーを使用して配列決定することによってcDNAを検証する。

10

【0075】

2.2- ヒトFXをコードするOptiCHO FXWT4HSベクターの調製

バリエーションの最適発現のために、バリエーション及びまた、野生型分子をOptiCHOベクター中で調製する。

【0076】

pCEP4-FXWT4HS-gsベクターを使用して、FXWT4HS配列のcDNAを、5'FXWT及び3'FX-SwaIプライマーを用いたPCR(カップHiFi; Biosystems社)によって増幅する。

20

【0077】

OptiCHOデステーションベクターと同様に、NheI及びSwaI酵素を用いて消化する前に、Nucleospin抽出物を使用して1551bpのPCR産物を精製する。それらを消化後にNucleospin抽出物で再び精製する。

【0078】

ライゲーション産物をコンピテントTop10細菌内に組み込む前に、挿入物及びベクターを、T4リガーゼを使用して一緒にライゲートする。アンピシリンの存在下での細菌増幅後、細菌コロニーをペトリ皿からサンプリングし、5'ef1a及び3FXプライマーを用いて296bpのアンプリコンを探すためにPCRによってスクリーニングし、前記アンプリコンはOptiCHOベクター中のFXをコードする挿入物の存在の証拠である。PCRスクリーニングを、アガロースゲル上で1538bpの断片を探すためにNheI及びSwaI酵素を用いた酵素消化による精製したベクターのスクリーニングによって補足する。OptiCHO-FXWT4HSベクターをプライマー:

30

- 5'ef1a: 5'-GTGGAGACTGAAGTTAGGCCAG-3' (配列番号38)
- 3FX: 5'-CTTCATTTCTCCAGGAAAGAGTTGGC-3' (配列番号39)
- 2BGHPA: 5'-CAGATGGCTGGCAACTAGAA-3' (配列番号40)

を用いて配列決定する。

【0079】

2.3. ファミリー1バリエーションの調製

ファミリー1バリエーションのcDNAをコードする挿入物の調製を、table 2(表3)に記載されているプライマーを使用して、アセンブリPCR及びライゲーションによって、又はInfusion技術によってtable 1(表2)に従って実施する。PCR1及び2に使用される鋳型はOptiCHO-FXWT4HSベクターである。親DNAを消化するためにDpnIを用いてPCR産物を処理する。Nucleospin抽出物を使用して対象のアンプリコンを精製する。

40

【0080】

OptiCHO-FX WTF1D、OptiCHO-FX WTF1G及びOptiCHO-FX WTF1I分子について、PCR1及び2から精製したアンプリコンを鋳型として使用し、table 1(表2)に従ってアセンブリPCRによって構築した。精製したPCR3アンプリコン並びにまた、NheI及びSwaIで消化したベクターを、T4リガーゼを用いたライゲーションによって構築する。

【0081】

50

【表 2】

Table 1

バリエーション	PCR1		PCR2		PCR1 及び 2 の消化後のアセンブリ PCR3	
	プライマー	アンプリコンサイズ	プライマー	アンプリコンサイズ	プライマー	アンプリコンサイズ
FXWT4HS F1D	5'FXWT+3'FX1d	720	5'FX1d+3'FX SwaI	842	5'FX WT+3'Fx SwaI	1551
FXWT4HS F1G	5'FXWT+3'FX1g	716	5'FX1g+3'FX SwaI	841	5'FX WT+3'Fx SwaI	1551
FXWT4HS F1I	5'FXWT+3'FX1i	716	5'FX1i+3'FX SwaI	838	5'FX WT+3'Fx SwaI	1551

10

【 0 0 8 2 】

【表 3 A】

Table 2

プライマ ー	配列番号	配列
3'FX1a	41	5'-TCCTTCTGCCAGGAAGTCCTGTGTCTGGTTGAAGTCCAGCAGGTCA-3'
3'FX1b	42	5'- TCAGGCCCTCGGCCAGGAAGTCCTGTGTCTGGTTGAAGTCCAGCAGGTCA-3'
3'FX1c	43	5'-TGGCGTTGGTGGCCTTCTGTGTCTGGTTGAAGTCCAGCAGGTCAA-3'
3'FX1d	44	5'- AGGGTGGCCTGGGTGGCCTTCTGTGTCTGGTTGAAGTCCAGCAGGTCA-3'
3'FX1e	45	5'-TGGTCAGCTTGCTGGTGCCTCTTTCAGGCTGTGTCTGGTTGA-3'
3'FX1f	46	5'-TGGTGAAGTCGTTGAAGCCTCTTTCAGGCTGTGTCTGGTTGAAG-3'
3'FX1g	47	5'-TGGTCATGCTGCTCAGGCCTCTTTCAGGCTGTGTCTGGTTGAAGT-3'
3'FX1h	48	5'-TGGTCAGGCTGGGAGGGCCTCTTTCAGGCTGTGTCTGGTTGAAG-3'
3'FX1i	49	5'-TCTGGCCGCAGGACAGGCCTCTTTCAGGCTGTGTCTGGTTGAAG-3'
3FX-2a	50	5'- CTCCTTCTGCCAGGAAGTCCCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC-3'
3FX-2b	51	5'- GTCAGGCCCTCGGCCAGGAAGTCCCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC-3'
3FX-2c	52	5'- AGGGTGGCGTTGGTGGCCTTCCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC-3'
3FX-2d	53	5'- AGGGTGGCCTGGGTGGCCTTCCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC-3'
3FX-2e	54	5'-TCAGCTTGCTGGTCCCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC-3'
3FX-2f	55	5'-GGTGAAGTCGTTGAACCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC-3'
3FX-2g	56	5'-ATGCTGCTCAGCCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC-3'
3FX-2h	57	5'-GTCAGGCTGGGAGGCCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC-3'
3FX-2i	58	5'-TCTGGCCGCAGGACAGCCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC-3'
5'FX1a	59	5'-GCAGAAGGAGGAGGAGTGAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCA-3'
5'FX1b	60	5'-AGGGCCTGACCCCTAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCAAGGA-3'
5'FX1cbis	61	5'- AGGCCACCAACGCCACCCTGTCCCCTAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCAAGGA-3'
5'FX1d	62	5'-CAGGCCACCCTGAGCCCTAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCAAG-3'
5'FX1e	63	5'-ACCAGCAAGCTGACCAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCAAGGA-3'
5'FX1f	64	5'-CAACGACTTCACCAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCAAGGA-3'
5'FX1g	65	5'-TGAGCAGCATGACCAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCAAGGA-3'
5'FX1h	66	5'-CCTCCCAGCCTGACCAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCAAGGA-3'
5'FX1i	67	5'-TGTCCTGCGGCCAGAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCAAGGA-3'

10

20

30

40

【表 3 B】

5'融合 FX	68	5'-TCTTCCATTTTCAGCTAGCAAGCTTGCCGCCAC-3'
3 融合 FX	69	5'-AGCTCTAGACAATTGATTAAATGGATCCTCACTTGCCGTC-3'
5'FXWT	70	5'-ACCAGCTGCTAGCAAGCTTGCCG-3'
3'FX- SwaI	71	5'-GAAACTATTTAAATGGATCCTCACTTGCCGTCAATCAGC-3'
3FXF3	72	5'-CCAGGTAATGCTATCAGCCACTGACCTTTTGCGCCTCTC-3'
5FXF3	73	5'-TCAGTGGCTGATAGCATTACCTGGAAACCTTATGACGC-3'
3FXF3bis	74	5'-GCTAGTTGCCTGAGCCACTGACCTTTTG-3'
5FXF3bis	75	5'-GCTCAGGCAACTAGCGATAGCATTACCTGGAAACCTTATGACGC-3'
5'efla	38	5'-GTGGAGACTGAAGTTAGGCCAG-3'
3FX	39	5'-CTTCATTTCCCTCCAGGAAAGAGTTGGC-3'
2BGHPA	40	5'-CAGATGGCTGGCAACTAGAA-3'

10

【 0 0 8 4 】

OptiCHO-FX WTF1a、OptiCHO-FX WTF1b、OptiCHO-FX WTF1c、OptiCHO-FX WTF1e、OptiCHO-FX WTF1f及びOptiCHO-FX WTF1h分子について、PCR1及び2から精製したアンプリコンをtable 3(表4)の条件に従ってPCRによって生成した。PCR1及び2の精製したアンプリコンを、NheI及びSwaIで前消化したベクターを用いてInfusionによって構築し、Nucleospin抽出物を使用して精製する。

20

【 0 0 8 5 】

【表 4】

Table 3:

バリエ アント	PCR1		PCR2	
	プライマー	アンプ リコン サイズ	プライマー	アンプ リコン サイズ
FX4hsF1a	5'融合 FX + 3'FX1a	718	5'FX1A + 3 融合 FX	842
FX4hsF1b	5'融合 FX3'F + X1b	722	5'FX1b + 3 融合 FX	838
FX4hsF1c	5'融合 FX + 3'FX1c	718	5'FX1cbis + 3 融合 FX	859
FX4hsF1e	5'融合 FX + 3'FX1e	714	5'FX1e + 3 融合 FX	839
FX4hsF1f	5'融合 FX + 3'FX1f	716	5'FX1f + 3 融合 FX	814
FX4hsF1h	5'融合 FX + 3'FX1h	716	5'FX1h + 3 融合 FX	839

30

40

【 0 0 8 6 】

各バリエーションについて、最終ベクターを細菌形質転換によってTop10細菌内に挿入する。アンプリコンの存在下での細菌増幅後、細菌コロニーをペトリ皿からサンプリングし、5'efla及び3FXプライマーを用いて296bpのアンプリコンを探すためにPCRによってスクリーニングする。

50

ーニングし、前記アンプリコンは、OptiCHOベクター中のFXをコードする挿入物の存在の証拠である。OptiCHO-FX WTF1aからOptiCHO-FX WTF1iベクターを、プライマー：

- 5'efla
- 2BGHPA

を用いて配列決定する。

【 0 0 8 7 】

2.4- ファミリー2バリエーションの調製

ファミリー2バリエーションのcDNAをコードする挿入物の調製を、table 2(表3)に記載されているプライマーを使用して、PCRの技術及びInfusionによるアセンブリによってtable 4(表5)に従って実施する。PCR1及び2のために使用される鋳型はOptiCHO-FXWT4HSベクターである。親DNAを消化するためにDpnIを用いてPCR産物を処理する。Nucleospin抽出物を使用してアンプリコンを精製する。PCR1及び2の精製したアンプリコンを、NheI及びSwaIで前消化したOptiCHOベクターを用いたInfusionによって構築し、Nucleospin抽出物を使用して精製する。

【 0 0 8 8 】

【表 5】

Table 4:

	PCR1			PCR 2		
	5'プライマー	3'プライマー	アンプリコンサイズ	5'プライマー	3'プライマー	アンプリコンサイズ
Fx-a	5'融合 FX	3FX-2a	781	5'FX-1a	3 融合 FX	851
Fx-b	5'融合 FX	3FX-2b	758	5'FX-1b	3 融合 FX	847
Fx-c	5'融合 FX	3FX-2c	755	5'FX-1c	3 融合 FX	850
Fx-d	5'融合 FX	3FX-2d	755	5'FX-1d	3 融合 FX	851
Fx-e	5'融合 FX	3FX-2 e	748	5'FX-1e	3 融合 FX	848
Fx-f	5'融合 FX	3FX-2f	750	5'FX-1f	3 融合 FX	846
Fx-g	5'融合 FX	3FX-2g	746	5'FX-1g	3 融合 FX	847
Fx-h	5'融合 FX	3FX-2h	749	5'FX-1h	3 融合 FX	848
Fx-i	5'融合 FX	3FX-2i	751	5'FX-1i	3 融合 FX	847

10

20

30

【0089】

各バリエーションについて、最終ベクターを細菌形質転換によってTop10細菌内に挿入する。アンプリコンの存在下での細菌増幅後、細菌コロニーをペトリ皿からサンプリングし、5'efla及び3FXプライマーを用いて296bpのアンプリコンを探すためにPCRによってスクリーニングし、前記アンプリコンは、OptiCHOベクター中のFXをコードする挿入物の存在の証拠である。OptiCHO-FX WTF2aからOptiCHO-FX WTF2iベクターを、プライマー:

40

- 5'efla
- 2BGHPA

を用いて配列決定する。

【0090】

2.5.-ファミリー3バリエーションの調製

ファミリー3は、酵素切断部位をその中に挿入する前に、調製するのに必要である活

50

性化ペプチド中に欠失を含有する。これに関して、2つの中間ベクター、ファミリー3バリエーションF3aからF3dについてOptiCHO FXWT F3AD、及びファミリー3バリエーションF3eからF3iについてOptiCHO FXWT F3EIを調製する。

【0091】

中間ベクターの挿入物を、鋳型としてOptiCHO FXWT4HS-gsベクター、並びにtable 2(表3)に記載されている5'FXWT、3'FX-SwaI、3FXF3、5FXF3、3FXF3bis及び5FXF3bisプライマーを使用してtable 5(表6)に従ってアセンブリPCRによって構築する。

【0092】

【表6】

Table 5:

中間ベクター	PCR1		PCR2		PCR1 及び 2 の消化後のアセンブリ PCR3	
	プライマー	アンプリコンサイズ	プライマー	アンプリコンサイズ	プライマー	アンプリコンサイズ
OptiCHO FXWT F3AD	5'FXWT + 3FXF3	598	3FX-SwaI + 5FXF3	947	5'FXWT + 3FX-SwaI	1521
OptiCHO FXWT F3EI	5'FXWT + 3FXF3bis	595	3FX-SwaI + 5FXF3bis	953	5'FXWT + 3FX-SwaI	1533

【0093】

OptiCHOデスチネーションベクターと同様に、NheI及びSwaI酵素で消化する前に、Nucleospin抽出物を使用してアセンブリPCR産物を精製する。消化後、それらをNucleospin抽出物で再び精製する。

【0094】

ライゲーション産物をコンピテントTop10細菌内に組み込む前に、挿入物及びベクターを、T4リガーゼを使用して一緒にライゲートする。アンピシリンの存在下での細菌増幅後、細菌コロニーをペトリ皿からサンプリングし、5'efla及び3FXプライマーを用いて296bpのアンプリコンを探すためにPCRによってスクリーニングし、前記アンプリコンはOptiCHOベクター中のFXバリエーションをコードする挿入物の存在の証拠である。

【0095】

OptiCHO FXWT F3AD及びOptiCHO FXWT F3EI中間ベクターを、プライマー:

- 5'efla
- 3FX
- 2BGHPA

を用いて配列決定する。

【0096】

OptiCHO FXWT F3A分子を除いて、連続した3つのバリエーションのcDNAをコードする挿入物の調製を、table 2(表3)に記載されているプライマーを使用してアセンブリPCRによってtable 6(表7)に従って実施する。PCR1及び2のために使用される鋳型は、ファミリー3バリエーションF3aからF3dについてOptiCHO FXWT F3ADベクター、及びファミリー3バリエーションF3eからF3iについてOptiCHO FXWT F3EIである。Nucleospin抽出物を使用してアンプリコンを精製する。PCR1及び2の精製したアンプリコンを、NheI及びSwaIで前消化したOptiCHOベクターを用いてアセンブリPCRによって構築し、Nucleospin抽出物を使用して精製する。

【0097】

【表 7】

Table 6:

	PCR1		PCR2		PCR1 及び 2 の消化後のアセンブリ PCR3	
	プライマー	アンプリコンサイズ	プライマー	アンプリコンサイズ	プライマー	アンプリコンサイズ
Fx-b	5'FXWT + 3FX-2b	723	5FX-1b + 3'FX-SwaI	838	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551
Fx-c	5'FXWT + 3FX-2c	720	5FX-1c + 3'FX-SwaI	841	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551
Fx-d	5'FXWT + 3FX-2d	720	5FX-1d + 3'FX-SwaI	842	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551
Fx-e	5'FXWT + 3FX-2e	713	5FX-1 ^e + 3'FX-SwaI	725	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551
Fx-f	5'FXWT + 3FX-2f	715	5FX-1f + 3'FX-SwaI	727	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551
Fx-g	5'FXWT + 3FX-2g	711	5FX-1g + 3'FX-SwaI	723	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551
Fx-h	5'FXWT + 3FX-2h	714	5FX-1h + 3'FX-SwaI	726	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551
Fx-i	5'FXWT + 3FX-2i	716	5FX-1i + 3'FX-SwaI	728	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551

10

20

【 0 0 9 8 】

OptiCHOデステーションベクターと同様に、NheI及びSwaI酵素で消化する前に、Nucleospin抽出物を使用してアセンブリPCR産物を精製する。消化後、それらをNucleospin抽出物で再び精製する。

30

【 0 0 9 9 】

ライゲーション産物をコンピテントTop10細菌内に挿入する前に、挿入物及びベクターを、T4リガーゼを使用して一緒にライゲートする。アンピシリンの存在下での細菌増幅後、細菌コロニーをペトリ皿からサンプリングし、5'efla及び3FXプライマーを用いて296bpのアンプリコンを探すためにPCRによってスクリーニングし、前記アンプリコンはOptiCHOベクター中のFXバリエーションをコードする挿入物の存在の証拠である。

【 0 1 0 0 】

最終的なファミリー3ベクターを、プライマー：

- 5'efla
- 2BGHPA

を用いて配列決定する。

40

【 0 1 0 1 】

(実施例2)

組換え第X因子の産生

1-実験プロトコル

1.1-試薬

ProCHO4(Lonza社)及びFreestyle(商標)F17(Gibco社)培養培地。

L-グルタミン(Gibco社)。

CHO-S細胞トランスフェクション培地:Opti-Pro SFM(Gibco社)。

HEK細胞トランスフェクション培地:Opti-MEM(Gibco社)。

ビタミンK1(Sigma社)。

50

【 0 1 0 2 】

1.2-プロトコル

野生型第X因子及びそのバリエーションを、一過性発現においてCHO-S又はHEK-293-Freestyle真核細胞(Invitrogen社)中で産生する。

【 0 1 0 3 】

CHO-S細胞をProCHO4培地及びHEK 293F細胞をF17培地中で培養し、それぞれの培地は4mM及び8mMのL-グルタミンを補足した。2つの細胞株を、37℃の制御雰囲気(8%CO₂)中で135rpmにて振盪する条件下で培養する。トランスフェクションの前日に、細胞を7×10⁵細胞/mlの密度にて播種する。

【 0 1 0 4 】

トランスフェクションの日に、DNA(20～30 µg)及び30 µgのトランスフェクション剤(TA)を、CHO-SについてOpti-Pro培地及びHEK 293FについてOpti-MEM中で別々に5分間プレインキュベートし、次いで混合し、DNA/TA複合体の形成を可能にするために20分間インキュベートする。全て30mlの体積で1×10⁶細胞/mlの細胞調製物に加える。

【 0 1 0 5 】

天然ビタミンKエポキシドレダクターゼ(VKOR)とのFXの共トランスフェクションの場合、全量20～30 µgのDNAを得るために2つのベクターを種々の割合で加える。VKOR酵素は、ガンマ-カルボキシル化を最適化しながら、HEK中で活性FXの産生を可能にする。トランスフェクションの直後、ビタミンK1(5 µg/ml)を培地に加える。トランスフェクションの次の日に、GFP(緑色蛍光タンパク質)を発現する対照プラスミドを使用してトランスフェクションレベルを評価する。産生は7日間「バッチ」様式で実施する。産生の終わりに、細胞及び上清を遠心分離によって分離する。細胞を除去し、上清を濾過し、次いで凍結する。

【 0 1 0 6 】

(実施例3)

第X因子濃度の測定

1-実験プロトコル

第X因子濃度を、製造業者の推奨に従って市販のELISA Zymutest第X因子(Hyphen BioMed社)によって測定する。アッセイの検出の線形領域に位置する抗原価を使用して濃度を三連で測定する。導入された変異が濃度の測定を妨害しないことを確実にするために、FXを同一の量で沈殿させ、ELISAを使用したもの{抗ヒトFXポリクローナル抗体(Cryoep社カタログ番号PAHFX-S)}と異なるポリクローナル抗体を用いた免疫プロットティングによって、又はSDS-PAGE(データは示さず)後の染色によって明らかにする。

【 0 1 0 7 】

2-結果

2.1-CHO中で一過性発現した第X因子バリエーションの発現

ファミリー1～3をコードするcDNAでトランスフェクトしたCHO-S細胞の上清に存在する第X因子(FX)バリエーションの濃度を、市販のELISA Zymutest第X因子を使用することによって測定した(図3)。

【 0 1 0 8 】

予想される通り、トランスフェクトしていない(対照)CHO細胞の上清はFXを含有しない。種々のFXをコードするベクターでのトランスフェクションにより、0.5～3.06 µg/mlの範囲のレベルを得ることが可能となる。種々のファミリーのFXの発現の大きな相違は存在しない。多くても、ファミリー3のFX-IIaは、ファミリー1のFX-IIa(1.26 µg/ml)より2.1X高く発現した(2.64 µg/ml)。いくつかの構築物は野生型第X因子より高濃度で第X因子を得ることが可能となり:それらはFX-IIa(ファミリー3)及びFX-PAR1(ファミリー1及び3)構築物である。FX-Kal3はFX産生を減少させるようである。

【 0 1 0 9 】

2.2-HEK中で一過性発現した第X因子バリエーションの発現

ファミリー1～3をコードするcDNAでトランスフェクトしたHEK293S細胞の上清に存在す

10

20

30

40

50

る第X因子バリエーションの濃度を、市販のELISA Zymutest第X因子を使用して測定した(図4)。予想される通り、トランスフェクトしていない(対照)HEK293S細胞の上清はFXを含有しない。ファミリー1分子をFX-WTのレベル($0.14 \sim 1.64 \mu\text{g/ml}$)に近いレベルで産生した。FX-PAR1分子のみをより高いレベルで産生する。FX-Kal3分子は少なくとも産生した分子のままである。ファミリー2を全ての構築物について同様の方法で産生し、より低いレベルで産生したFX-Kal3構築物($0.66 \mu\text{g/ml}$)を除いて $1.79 \sim 2.54 \mu\text{g/ml}$ の発現値を有する。ファミリー3を $0.2 \sim 1.2 \mu\text{g/ml}$ のより低いレベルで産生した。

【0110】

結論として、特定の第X因子バリエーション構築物はFX-WTより高いレベルでFXを産生することが可能となる:

- それらは、CHO細胞において、FX-IIa(ファミリー3)及びFX-PAR1(ファミリー1及び3)構築物であり、
- HEK細胞において、ファミリー1のFX-PAR1である。

【0111】

(実施例4)

CHO-S中で産生した第X因子バリエーションの凝固活性の測定

1-実験プロトコル

CHO-S細胞により産生したFXバリエーションの時間測定による活性を、FX欠損血漿の存在下でStar自動装置(Stago社)を使用して測定した。FX欠損血漿、ネオプラスチン及びOwren-Koller緩衝液はStago社(Asnieres、フランス)から得た。

【0112】

濃縮した培養上清を、FX欠損血漿に加える前に、Owren-Koller緩衝液中で1/10に希釈する。混合物を37℃にて240秒の間、インキュベートし、次いでプロトロンビン時間(PT)を、 $100 \mu\text{l}$ のネオプラスチンを加えることによって開始する。凝固時間(秒)をFXの比活性に変換する。

【0113】

2-結果

CHO中の種々のトランスフェクションから得た濃縮した上清を、第X因子欠損を補償するそれらの能力について評価した。上清をFX欠損血漿中でインキュベートし、PT試験を実施した。凝固時間(秒)を比活性(SA; $1 \mu\text{g}$ のタンパク質当たりの秒)に変換し、次いで野生型FXと比較した比活性の百分率を算出した(図5)。結果は種々のファミリー間で一貫している。この結果により、挙動の相違は主に切断部位に由来し、それらがクローニングされる方法に由来していないことが示される。

【0114】

構築物は3つのカテゴリーに分類できる:そのSAがFX-WTのSAと同様である、第1のカテゴリー(FX-対照+を含有する)、そのSAが対照のSAと比較して減少している、第2のカテゴリー(FX-IIa、FX-PAR1、FX-PAR1M及びFX-Kal3を含有する)、及びFXの不在下でその活性がFX-WTの活性より多い、第3のカテゴリー(FX-FXIIa1及び2、FX-Kal1及び2を含有する)。FX-Kal12ファミリー3構築物は技術的理由のために分析できなかったことは留意すべきである(グラフ上の*)。

【0115】

これらの結果により、導入されてファミリー3(FX-FXIIa1及び2、FX-Kal1及び2)を形成する改変は、第X因子分子に、内因性第X因子の不在下で野生型第X因子より凝固する効果的な能力を与えることが示される。

【0116】

(実施例5)

RVV-X毒画分によってCHO-S中で産生した第X因子バリエーションの活性化の測定

1-実験プロトコル

CHO-S細胞によって産生したFXバリエーションの活性化を、ラッセルクサリヘビ蛇毒抗第X因子画分(RVV-X)の存在下で培養上清のインキュベーション後に測定した。対照の活性化第X

10

20

30

40

50

因子、毒画分X(RVV-X)及びpNAPEP 1025基質はHaematologic Technologies社(Cryopep社、Montpellier、フランス)から得た。

【0117】

活性化を以下の緩衝液中で37℃にて研究した:25mM HEPES、pH7.4、0.175M NaCl、5mM CaCl₂及び5mg/ml BSA。0~100nMの濃度のFXについて、200mU/mlの濃度のRVV-Xを使用した。5分間のインキュベーション後、反応を、50mM Tris緩衝液、pH8.8、0.475M NaCl、9mM EDTA中で停止させる。生成したFXaの量を、405nmにてpNAPEP 1025基質(250 µM)の加水分解速度を測定することによってモニターする。

【0118】

2-結果

ファミリー1バリエーションを発見するCHOの上清をRVV-Xとインキュベートした。FXaの生成を、種々の濃度のFXを使用したこの処理の後に測定した。FXaの存在を溶液中のpNAPEP 1025の産生物の出現速度(mODU/分)によって定量する。この生成は、RVV-XによるFXの認識及び切断、及びまた、FX基質を認識するために生成したFXaの能力を反映する。出現速度の平均をFXの種々の開始濃度について算出し、この値はFX-WTの値の百分率に関連している。

【0119】

ファミリー1の分析は、特にFX-対照+、FX-11a、FX-Ka11、FX-Ka12及びFX-Ka13について、PTによって得た結果と同様である結果を部分的に示す(図6)。FX-X1a1及び2分子は活性を示すが、この時間はFX-WTより長くない。他方で、FX-PAR1及びFX-PAR1M分子はPTによって観察された活性より大きい有意な活性を実証する。

【0120】

これらの結果は、ファミリー1のFX-PAR1M及びFX-Ka12が、FX-WTよりRVV-Xによって効果的に活性化することを示す。

【0121】

(実施例6)

トロンビン生成時間(TGT)に関して、ファミリー2の第X因子バリエーションの凝血促進能力: FVIII欠損血漿中の外因性凝固経路(TF 1pM/PL 4 µM)の活性化の測定

1-実験プロトコル

1.1-試薬

トロンビン標準物である、PPP試薬である低反応性のCK-Prest、Fkuca Kit(Fluo-緩衝液+Fluo-基質)、PNP及びFIX欠損血漿はStago社(Asnieres、フランス)から得た。FX欠損血漿はCryopep社(Montpellier、フランス)から得た。FVIII欠損血漿はSiemens Healthcare社(Marburg、ドイツ)から得た。ヒトFX(カタログ番号HCX-0050)及びヒトFXa(カタログ番号HCXA-0060)はHaematologic Technologies Inc.社(Burlington、Vt、USA)から得た。対照の組換えヒト第VIII因子はBaxter社{リコンビネート(Recombinate)}(Maurepas、フランス)から得た。

【0122】

1.2-プロトコル

1単位のFX(1U/ml)=血漿中の10 µg/mlとみなされ、血漿中の100%FXレベルに対応する。

【0123】

トロンビン生成試験は、組織因子及びリン脂質の混合物(外因経路の活性化)によって、又はセファリン(内因経路の活性化)によってのいずれかで、エキソビボで凝固を活性化すること、及び次いで経時的に生成したトロンビンの濃度を測定することからなる。

【0124】

トロンビン生成試験を、最終濃度1pMの組織因子(TF)及び4 µMのリン脂質(PL)を含有する20 µlのPPP試薬(Stago社)の存在下で、任意選択に細胞上清又は対照を含有する、血漿の80 µlのプールで実施する。正常、第X因子欠損、第VIII因子欠損又は第IX因子欠損である、種々の血漿を使用できる。

【0125】

10

20

30

40

50

トロンビンの出現の測定の開始を構成する20 μ lのFlucaキット(基質+CaCl₂)を加えることによって反応を開始する。蛍光の出現を、390nmの励起波長及び460nmの発光波長にてFluoroskan Ascent蛍光光度計(ThermoLabsystems社)で測定する。次いでトロンビノグラム(時間の関数として蛍光強度を表す曲線)を、比較計算によって蛍光値をトロンビンのnMに変換するThrombinoscope(商標)ソフトウェアによって分析する。

【0126】

2-結果

上清を、所望の濃度が得られるまで、少なくとも1時間、2500gにてSartorius VivaSpin 20~30kDaで約20倍に濃縮した。ユニキャリプレート(Unicalibrator)血漿及びまた、0、0.1又は1U/mlで再構成したFVIII欠損血漿を対照として使用する。

10

【0127】

予想される通り、組織因子による凝固の活性化後、FVIII欠損血漿は実験のバックグラウンドノイズに対応する最も弱い信号を与える。ユニキャリプレート血漿はFVIII濃度(0.1又は1U/ml)で再構成したFVIII欠損血漿より弱い信号を与える。他方で、FX-WTによるFVIII欠損血漿の再構成は十分な量のトロンビンを生成することを可能にしない。この再構成は欠損血漿単独よりわずかに多い{図7、table 7(表8)}。

【0128】

【表 8】

製品名	ユニキャリアブ レータ	FVIII 欠損	FVIII Def + 1U/ml rFVIII	FVIII Def + 0.1U/ml rFVIII	FVIII Def + FX-WT (5µg/ml)	FVIII Def + FX-対照+ (5µg/ml)	FVIII Def + FX-IIa (5µg/ml)
ラグタイム	7.36	8.19	6.19	8.03	7.86	7.36	7.19
ETP	1271	314	1850.5	1415	1278	1539.5	1618
ピーク	135.8	11.89	329.1	154.3	75.96	153.28	184.11
ttピーク	11.87	20.88	8.19	12.03	13.37	11.2	10.7
スタートテ イル	40	56	31	41.5	70.5	44	38.5
速度	30.11	0.94	164.55	38.58	13.79	39.92	52.45

製品名	FVIII Def + FX- PAR1 (5µg/ml)	FVIII Def + FX- PAR1M (5µg/ml)	FVIII Def + FX- FXIa1 (5µg/ml)	FVIII Def + FX- FXIa2 (5µg/ml)	FVIII Def + FX- FXIa3 (5µg/ml)	FVIII Def + FX-Kal1 (3.5µg/ml)	FVIII Def + FX- Kal2 (1.65µg/ml)
ラグタイム	6.86	7.36	6.69	7.69	7.19	7.36	7.69
ETP	1604	1534	1582	1467.5	1504	1408	1438
ピーク	201.35	169.82	190.67	151.76	167.8	118.53	162.52
ttピーク	10.03	10.87	10.03	11.37	10.53	11.87	11.03
スタートテ イル	36.5	41.5	38	45	42	52	41.5
速度	63.52	48.38	57.09	41.24	50.24	26.28	48.66

Table 7:組織因子(1pM)による活性化後、第 VIII 因子欠損血漿のプールへのファミリー2 の FX 又はそのバリエーションの添加から得たトロンビンogramによる動態パラメーター

図 7 のトロンビンogramの動態パラメーターを表に提示する。ラグタイム(分);ETP、生成した全トロンビン(nM);ピーク、トロンビンピークの高さ(nM);ttピーク、ピーク最大の時間(分);スタートテイル(StartTail)、速度開始時間(分);速度、トロンビン生成の最高速度(nM/分)。

【 0 1 2 9 】

全てのFXバリエーション分子はFX-WTより大きな信号を与え、FVIIIの不在下でトロンビンを

10

20

30

40

50

生成するそれらの能力がFX-WTと比較して有意に増加することを示唆している{table 7(表8)}。ファミリー2のFX変異体の速度はFX-WTの速度の2から4.5Xの間で振動する{図9、table 7(表8)}。2Xの速度は30%低いFX-Ka12の量(5 µg/mlの代わりに3.5 µg/ml)で得られることに留意すべきである。

【0130】

FVIIIの不在下で最も多くの量のトロニンピンを生成することが可能となる変異体は、順に、FX-PAR1、FX-FX1a1、FX-11a及びFX-Ka11である。

【0131】

(実施例7)

トロニンピン生成時間(TGT)に関して、第X因子バリエーション:FVIII欠損血漿中の内因性凝固経路(セファリン単独)の凝血促進能力の測定

10

1-実験プロトコル

試薬、自動装置及び実験プロトコルは実施例6に記載されているものと同一である。

【0132】

トロニンピン生成試験を、20 µlのセファリン(1mlの蒸留したH₂Oで再構成したCK-Prest)及び20 µlのfluca-キット(基質+CaCl₂)の存在下で任意選択に細胞上清及び対照を含有する正常な血漿の80 µlのプールで実施する。使用した血漿は正常な血漿及び第VIII因子欠損血漿である。

【0133】

2-結果

20

実施例6で使用した上清を、同じ対照を使用してセファリンによる活性化後にTGTによって分析した。

【0134】

対照は予想されるように作用し、FVIII欠損血漿は11aを全く生成することができず、FVIIIの用量を増加させた場合、有効性の勾配が見出される{table 8(表9)}。

【0135】

【表 9】

製品名	ユニキャリアブ レート	FVIII 欠損	FVIII Def + 1U/ml rFVIII	FVIII Def + 0.1U/ml rFVIII	FVIII Def + FX-WT (5µg/ml)	FVIII Def + FX-対照+ (5µg/ml)	FVIII Def + FX-IIa (5µg/ml)
ラグタイム	19.04	35.73	8.69	20.54	23.88	16.37	13.03
ETP	1149.5	0	1417.5	1089.5	589	1134.5	1284.5
ピーク	271.07	3.48	292.17	171.4	35.98	102.19	235.25
tt ピーク	21.04	70.46	10.53	24.05	34.4	24.05	16.04
スタートテ イル	36	0	29.5	41.5	67.5	47	33.5
速度	135.54	0.10	158.79	48.83	3.42	13.31	78.16

FVIII Def

製品名	FVIII Def + FX- PAR1 (5µg/ml)	FVIII Def + FX- PAR1M (5µg/ml)	FVIII Def + FX- FXIa1 (5µg/ml)	FVIII Def + FX- FXIa2 (5µg/ml)	FVIII Def + FX- FXIa3 (5µg/ml)	FVIII Def + FX-Kal1 (3.5µg/ml)	FVIII Def + FX- Kal2 (1.65µg/ml)
ラグタイム	15.53	17.54	16.37	19.54	18.37	20.71	19.88
ETP	950.5	892.5	968	805	869	844.5	814
ピーク	87.25	71.5	80.35	59.78	68.08	57.78	59.2
tt ピーク	22.88	25.72	24.05	28.22	26.39	30.23	28.89
スタートテ イル	46.5	51.5	49.5	57.5	54.5	61	58.5
速度	11.87	8.74	10.46	6.89	8.49	6.07	6.57

Table 8: セファリンによる活性化後、第 VIII 因子欠損血漿のブールへのファミリー2 の FX 又はそのバリエーションの添加から得たトロンビノグラムによる動態パラメーター

図 8 のトロンビノグラムの動態パラメーターを表に提示する。ラグタイム(分);ETP、生成した全トロンビン(nM);ピーク、トロンビンピークの高さ(nM);tt ピーク、ピーク最大の時間(分);スタートテイル、速度開始時間(分);速度、トロンビン生成の最高速度(nM/分)。

【 0 1 3 6 】

ファミリー2の分析は、予想されるように、野生型FXが、弱い残留活性(3.4nM/s)を示す

10

20

30

40

50

、少なくとも活性FX分子であることを示す。全ての他の分子は、トロンピンを生成する、より高い能力を示す{table 8(表9)}。FX-Ka1-1~3、FX-FXI-2及びFX-PAR1M分子は、FX-対照+、FX-PAR1及びFX-FXI-1構築物(10.5~13.3nM/s)未満であるが、少し強い活性(6.6~8.7nM/s)を示す。他方で、FX-IIa分子は、0.1及び1U/mlのFVIII(78.2nM/s)について得た値の間である信号を得ることが可能となり、FVIII欠損を非常に効果的に修復する。速度のこれらの相違は、変異体について、1.8X高い(3.5 µg/mlでのFX-Ka12変異体を除いて)~22.8X高い(FX-IIa変異体について)、トロンピン生成有効性を示す。

【0137】

結論として、いくつかのFX変異体は、組織因子及びセファリンによる血漿の活性化後にFVIIIの不在下で凝固を修復する能力を有する。

10

【0138】

(実施例8)

トロンピン生成時間(TGT)に関して、ファミリー2の第X因子バリエーションの凝血促進能力：FIX欠損血漿中の外因性凝固経路(TF 1pM/PL 4 µM)の活性化の測定

1-実験プロトコル

試薬、自動装置及び実験プロトコルは実施例6に記載されているものと同一である。

【0139】

トロンピン生成試験を、1pMの組織因子(TF)及び4 µMのリン脂質(PL)並びに20 µlのfluc a-キット(基質+CaCl₂)の存在下で任意選択に細胞上清及び対照を含有する正常な血漿の80 µlのプールで実施する。使用した血漿は正常又は第IX因子欠損のいずれかである。

20

【0140】

2-結果

実施例6で使用した上清を、対照として正常な血漿(ユニキャリプレート)又は0、0.1若しくは1U/mlの血漿FIXで再構成したFIX欠損血漿を使用して組織因子による活性化後にTGTによって分析した{図10、table 9(表10)}。

【0141】

FIX欠損血漿は陰性であり(それはIIaを全く生成できない)、FIXによるその再構成により、多量のトロンピンを生成できる。しかしながら、使用したFIXの2つの濃度の間に量的差異はなく、したがって、それらの両方は、最大量のIIaを形成することが可能となることを示唆している{table 9(表10)}。

30

【0142】

【表 10】

製品名	ユニキャリアブ レート	FIX 欠損	FIX Def + FIX 1U/ml	FIX Def + FIX 0.1U/ml	FIX Def + FX-WT (5µg/ml)	FIX Def + FX-対照+ (5µg/ml)	FIX Def + FX-IIa (5µg/ml)
ラグタイム	7.33	4.5	4.83	5	6.67	6.67	6.67
ETP	1216	295	1645	1623.5	1251	1533	1540.5
ピーク	97.46	9.74	292.04	283.36	59.18	112.48	138.17
tt ピーク	12.83	19	7.67	7.83	14	12.83	12.5
スタートテ イル	47	68	23.5	24.5	66	46.5	38
速度	17.72	0.67	102.83	100.13	8.07	18.26	23.70

製品名	FIX Def + FX- PAR1 (5µg/ml)	FIX Def + FX- PAR1M (5µg/ml)	FIX Def + FX- FXIa1 (5µg/ml)	FIX Def + FX- FXIa2 (5µg/ml)	FIX Def + FX-FXIa3 (5µg/ml)	FIX Def + FX-Kal1 (3.5µg/ml)	FIX Def + FX-Kal2 (1.65µg/ml)
ラグタイム	6.67	6.67	6.5	7	6.67	6.33	7
ETP	1483	1506	1580.5	1446	1457.5	1523.5	1483
ピーク	160.46	125.64	125.15	97.1	123.59	85.83	103.73
tt ピーク	11	11.83	11.83	12.67	11.67	13.33	12.83
スタートテ イル	35.5	43	43.5	54.5	43	61.5	60
速度	37.06	24.35	23.48	17.13	24.72	12.26	17.79

Table 9:組織因子(1pM)による活性化後、第 IX 因子欠損血漿のプールへのフアミリー2 の FX 又はそのバリエーションの添加から得たトロンビン生成の動態パラメーター

図 10 のトロンビン生成の動態パラメーターを表に提示する。ラグタイム(分);ETP、生成した全トロンビン(nM);ピーク、トロンビン生成の高さ(nM);tt ピーク、ピーク最大の時間(分);スタートテイル、速度開始時間(分);速度、トロンビン生成の最高速度(nM/分)。

【0143】

このアッセイにおいて、全ての変異体はFX-WTより多い量のIIaを生成することが可能と

10

20

30

40

50

なる。しかしながら、相違はFVIIIの不在下におけるよりかなり低く:それ故、速度は1.50X(3.5 µg/mlでのFX-Ka12について) ~ 4.60X(FX-PAR1について)の範囲である。この変異体に加えて、FX-IIIa、FX-PAR1M、FX-FXIIIa1及びFX-Ka11分子が最も効果的である{図12、table 9(表10)}。

【0144】

(実施例9)

トロンビン生成時間(TGT)に関して、ファミリー2の第X因子バリエーションの凝血促進能力: FIX欠損血漿中の内因性凝固経路(セファリン)の活性化の測定

1-実験プロトコル

試薬、自動装置及び実験プロトコルは実施例6に記載されているものと同一である。

10

【0145】

トロンビン生成試験を、セファリン(1mlの蒸留したH₂Oで再構成したCK-Prest)及び20 µlのfluca-キット(基質+CaCl₂)の存在下で任意選択に細胞上清及び対照を含有する正常な血漿の80 µlのプールで実施する。使用した血漿は正常又は第IX因子欠損のいずれかである。

【0146】

2-結果

実施例6で使用した上清を、対照として正常な血漿(ユニキャリプレート)及び0、0.1若しくは1U/mlの血漿FIXで再構成したFIX欠損血漿を使用してセファリンによる活性化後にTGTによって分析した{図11、table 10(表11)}。

20

【0147】

FIX欠損血漿は陰性であり(それはIIIaを全く生成できない)、FIXによるその再構成により、多量のトロンビンを生成できる。しかしながら、使用したFIXの2つの濃度の間に量的差異はなく、したがって、それらは最大量のIIIaを形成することを示唆している{table 10(表11)}。

【0148】

【表 1 1】

製品名	ユニキャリアブ レート	FIX 欠損	FIX Def + FIX 1U/ml	FIX Def + FIX 0.1U/ml	FIX Def + FX-WT (5µg/ml)	FIX Def + FX-対照+ (5µg/ml)	FIX Def + FX-IIa (5µg/ml)
ラグタイム	29.17	0	13	13.33	36.67	28	22.17
ETP	1209	0	1539.5	1521.5	0	734	1528.5
ピーク	252.9	0	378.46	370.94	12.79	62.02	240.9
tt ピーク	31.67	0	14.67	15	51.83	36.83	26.83
スタートテ イル	47	0	30	30.5	0	57	40
速度	101.16	0.00	226.62	222.12	0.84	7.02	51.70

製品名	FIX Def + FX- PAR1 (5µg/ml)	FIX Def + FX- PAR1M (5µg/ml)	FIX Def + FX- FXIa1 (5µg/ml)	FIX Def + FX- FXIa2 (5µg/ml)	FIX Def + FX- FXIa3 (5µg/ml)	FIX Def + FX-Kal1 (3.5µg/ml)	FIX Def + FX-Kal2 (1.65µg/ml)
ラグタイム	22.17	25.33	25.5	29.5	26.67	29.33	28.5
ETP	452.5	407	370.5	327.5	385	319.5	310.5
ピーク	31.86	25.82	22.34	17.99	22.39	17.05	17.53
tt ピーク	32.33	36.17	37	42	38	41.67	39.83
スタートテ イル	54.5	62.5	63	70	67.5	70	69.5
速度	3.14	2.38	1.94	1.44	1.98	1.38	1.55

Table 10:セファリンによる活性化後、第 IX 因子欠損血漿のプールへのファミリー2 の FX 又はそのバリエーションの添加から得たトロンビノグラムによる動態パラメーター

図 11 のトロンビノグラムの動態パラメーターを表に提示する。ラグタイム(分);ETP、生成した全トロンビン(nM);ピーク、トロンビンピークの高さ(nM);tt ピーク、ピーク最大の時間(分);スタートテイル、速度開始時間(分);速度、トロンビン生成の最高速度(nM/分)。

【0 1 4 9】

セファリンによる凝固の誘導後、3つの分子のみがFX-WTよりトロンビンを有意に生成す

10

20

30

40

50

ることが可能となり、それらはFX-IIa、FX-対照+及びFX-PAR1であり、その速度はそれぞれ、FX-WTの速度より61X、8.3X及び3.8X速い{図12、table 10(表11)}。しかしながら、他の変異体はFX-WTの速度より速い速度を有する。

【0150】

結論として、研究した全ての変異体は、誘導が使用されたものは全て、FIXの不在下でトロンبینを生成することが可能となる。FX-IIa、FX-対照+及びFX-PAR1が最も効果的である。

【0151】

(実施例10)

HEK中で産生したファミリー2の第X因子バリエーション及び野生型第X因子のトロンبین活性化

10

1-実験プロトコル

ビタミンKエポキシドレダクターゼ(VKOR)の存在下でHEK細胞によって産生したFXバリエーションの活性化を、トロンبینの存在下で、培養上清のインキュベーション後に測定した。対照の活性化第X因子、トロンبین及びPefachrome FXa8595基質は、Haematologic Technologies社(Cryoep社、Montpellier、フランス)から得た。

【0152】

リン脂質はDiagnostica Stago社から得た(Asnieres、フランス)。

【0153】

活性化を以下の緩衝液:25mM HEPES、pH7.4、0.175M NaCl、5mM CaCl₂及び5mg/ml BSA中で37℃にて研究した。42.5及び85nMのFXの濃度について、10nMの濃度のトロンبین及び4μMの濃度のリン脂質を使用した。37℃にて1時間のインキュベーション後、生成したFXaの量を、405nmにてPefachrome FXa8595基質(250μM)の加水分解速度を測定することによってモニターする。

20

【0154】

2-結果

トロンبینによって切断することを意図する部位が実際にこの酵素によって認識されることを検証するために、FX-WT、FX-対照+及びFX-IIaの濃縮した上清をトロンبینの存在下でインキュベートした。FXaの出現を基質分解産物の出現によって測定した(図13)。血漿FXaを陽性対照として使用した。変異体を有する産物の出現の動態はFXaの動態と直接比較できない。なぜならこれらの分子は、活性を放出する前に、活性化されることを必要とするからである。更に、トロンبینについての切断部位は複合であり、分子の活性化は必ずしも最適ではないからである。実際に、全ての分子は切断部位の下流の元の領域に保存され、上流部分のみが改変される。したがって、組換え分子によるFXa基質分解の動態はFXaによる動態と異なる。

30

【0155】

得られた結果により、予想される通り、血漿及びWT FXを用いてTGTによって得られたデータが陰性であることが確認される。なぜならそれらはトロンبین認識部位を有さないからである。他方で、FX-IIa及びFX-対照+は、トロンبینによって活性化でき、FXaを放出できる。TGT測定のように、FX-IIaはFX-対照+より効果的に活性化する。

40

【0156】

(実施例11)

トロンبین生成時間(TGT)に関して、ファミリー1の第X因子バリエーション:FVIII欠損血漿中の外因性凝固経路(TF 1pM/PL 4μM)の凝血促進能力の測定

1-実験プロトコル

トロンبین生成試験を、最終濃度1pMの組織因子(TF)及び4μMのリン脂質(PL)を含有する20μlのPPP試薬(Stago社)の存在下で任意選択に細胞上清及び対照を含有する血漿の80μlのプールで実施する。使用した種々の血漿は正常及び第VIII因子欠損である。

【0157】

反応は、トロンبینの出現の測定の開始を構成する20μlのFluca-キット(基質+CaCl₂)

50

を加えることによって開始する。蛍光の出現を、390nmの励起波長及び460nmの発光波長にてFluoroskan Ascent蛍光光度計(ThermoLabsystems社)で測定する。次いでトロンビンogram(時間の関数として蛍光強度を表す曲線)を、比較計算によって蛍光値をトロンビンのnMに変換するThrombinoscope(商標)ソフトウェアによって分析する。

【 0 1 5 8 】

2- 結果

VKORの存在下でHEK293F細胞のトランスフェクションから生じたファミリー1の上清を、既に記載した対照を使用して組織因子による活性化後にTGTにより分析した。対照(正常な血漿、組換えFVIIIで再構成した又は組換えFVIIIで再構成しなかったFVIII欠損血漿)は予想されるように作用する。他方で、FX-WTは中程度であるが、予想されるより大きい信号を与える{図14及び図16; table 11(表12)}。しかしながら、その平均速度(59nM/分)はいくつかの変異体、特にFX-FXIIa1/2、FX-Ka11/2及びFX-対照+及びFX-IIaの平均速度を下回り、それらは対照の少なくとも130%の速度を有する。

10

【 0 1 5 9 】

【表 1 2】

グループ名	ユニキャリブレ ータ	FVIII 欠損	FVIII Def + リ コンピネート 1U/ml	FVIII Def + リ コンピネート 0.1U/ml	FVIII Def + FX- WT 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- 対照+ 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- IIa 7.5µg/ml
ラグタイム	8	9.33	7.17	9.33	7.83	7	7.83
ETP	1325.5	0	1795	1334.5	1549.5	1619	1652
ピーク	136.55	12.25	291.64	125.53	175.6	230.11	240.61
tt ピーク	12.5	29.67	9.5	13.67	11.17	10	10.83
スタートテ イル	40	0	33	46.5	40	33	33.5
速度	30.34	0.60	125.17	28.92	52.57	76.70	80.20

グループ名	FVIII Def + FX- PAR1 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- PAR1M 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- FXIa1 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- FXIa2 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- Kal1 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- Kal2 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- Kal3 1.65µg/ml	FVIII Def + FX- WT 7.5µg/ml
ラグタイム	8.5	7.5	5.17	5.83	6.67	6	5.67	7.83
ETP	1337	1562	1704	1678.5	1628	1642.5	1667	1569.5
ピーク	112.83	196.08	310.73	308.24	252.3	274.07	289.45	199.2
tt ピーク	13	10.67	7.17	7.67	9.17	8.33	7.83	10.83
スタートテ イル	50	36.5	28.5	29	32	30.5	29	36.5
速度	25.07	61.85	155.37	167.52	100.92	117.63	134.00	66.40

Table 11:組織因子による活性化後、第 VIII 因子欠損血漿のプールへのファミリー1 の FX 又はそのバリエーションの添加から得たトロンビノグラムによる動態パラメーター

図 14 のトロンビノグラムの動態パラメーターを表に提示する。ラグタイム(分):ETP、生成した全トロンビン(nM);ピーク、トロンビンピークの高さ(nM);tt ピーク、ピーク最大の時間(分);スタートテイル、速度開始時間(分);速度、トロンビン生成の最高速度(nM/分)。

10

20

30

40

50

トロンビン生成時間(TGT)に関して、ファミリー1の第X因子バリエーション:FVIII欠損血漿中の内因性凝固経路(セファリン単独)の凝血促進能力の測定

1-実験プロトコル

試薬、自動装置及び実験プロトコルは実施例6に記載されているものと同一である。

【0161】

トロンビン生成試験を、20 µlのセファリン(1mlの蒸留したH₂Oで再構成したCK-Prest)及び20 µlのfluca-キット(基質+CaCl₂)の存在下で任意選択に細胞上清及び対照を含有する血漿の80 µlのプールで実施する。使用した血漿は正常な血漿及び第VIII因子欠損血漿である。

【0162】

2-結果

VKORの存在下でHEK293F細胞のトランスフェクションから生じたファミリー1の上清を、既に記載した対照を使用してセファリンによる活性化後にTGTにより分析した。

【0163】

対照は予想されるように作用し、FVIII欠損血漿は陰性であり(Iiaの生成がまったく起こらない)、FVIIIの用量を増加させた場合、有効性の勾配が見出される{図15; table 12(表13)}。このアッセイにおいて、FXによる補足(2つのアッセイを実施した)はトロンビンの有意な量を生成することができない(6.06及び7.65nM/分の速度)。他方で、ファミリー1のFX-Iia、FX-FXIa1及び2並びにFX-対照+変異体は、対照の少なくとも3.5Xのトロンビンの有意に多い量を生成することが可能となる{図15及び図16; table 12(表13)}。

【0164】

10

20

【表 1 3】

グループ名	ユニキャリブレ ータ	欠損 FVIII	FVIII Def + リ コンピネート 1U/ml	FVIII Def + リ コンピネート 0.1U/ml	FVIII Def + FX- WT 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- 対照+ 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- lla 7.5µg/ml
ラグタイム	19.33	15.5	7.67	18	28.67	18.17	13.83
ETP	1347.5	0	1803	1442.5	938	1359	1543.5
ピーク	304.16	0.48	336.48	278.12	56.51	167.22	295.77
tt ピーク	21.5	38.33	9.33	20.17	38	23.67	16.17
スタートテ イル	37	0	32	41.5	71	44	36.5
速度	140.17	0.02	202.70	128.17	6.06	30.40	126.40

グループ名	FVIII Def + FX- PAR1 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- PAR1M 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- FXIa1 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- FXIa2 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- Kal1 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- Kal2 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- Kal3 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- WT 7.5µg/ml
ラグタイム	30.83	25.5	14	15.17	21.33	18	16	26.17
ETP	853	1052.5	1359.5	1318.5	1144	1225	1227	1035
ピーク	50.44	76.26	161.43	145.34	89.5	106.56	115.43	67.55
tt ピーク	41.17	33.83	19	21	28.5	24.5	22.33	35
スタートテ イル	71	63	41.5	44	57.5	52	48	67
速度	4.88	9.15	32.29	24.93	12.48	16.39	18.24	7.65

Table 12: セファリンによる活性化後、第 VIII 因子欠損血漿のブールへのファミリー1 の FX 又はそのバリエーションの添加から得たトロンビノグラムのよる動態パラメーター

図 15 のトロンビノグラムの動態パラメーターを表に提示する。ラグタイム(分);ETP、生成した全トロンビン(nM);ピーク、トロンビンピークの高さ(nM);tt ピーク、ピーク最大の時間(分);スタートテイル、速度開始時間(分);速度、トロンビン生成の最高速度(nM/分)。

10

20

30

40

50

トロンビン生成時間(TGT)に関して、ファミリー1の第X因子バリエーション:FIX欠損血漿中の外因性凝固経路(TF 1pM/PL 4 μM)の凝血促進能力の測定

1-実験プロトコル

試薬、自動装置及び実験プロトコルは実施例6に記載されているものと同一である。

【0166】

トロンビン生成試験を、最終濃度1pMの組織因子(TF)及び4 μMのリン脂質(PL)を含有する20 μlのPPP試薬(Stago社)並びに20 μlのfluca-キット(基質+CaCl₂)の存在下で任意選択に細胞上清及び対照を含有する血漿の80 μlのプールで実施する。使用した血漿は正常な血漿及び第IX因子欠損血漿である。

【0167】

2-結果

VKORの存在下でHEK293F細胞のトランスフェクションから生じたファミリー1の上清を、既に記載した対照を使用して組織因子による活性化後にFIX欠損血漿中でTGTにより分析した。対照{正常な血漿、血漿FIX(10%又は100%にて)で再構成したFIX欠損血漿、血漿FIXで再構成しなかったFIX欠損血漿}は予想されるように作用する。他方で、FX-WTは、中程度であるが、予想されるより大きい信号を与える{図17; table 13(表14)}。しかしながら、その平均速度(23nM/分)はFX-PAR1を除く全ての変異体の平均速度を下回る。前記変異体は、特に、対照の少なくとも150%の速度を有する、FX-FX1a1/2、FX-Ka12/3及びFX-対照+及びFX-IIaである。

【0168】

10

20

【表 1 4】

グループ名	ユニキャリブ レータ	FIX 欠損	FIX Def + FIX 1U/ml	FIX Def + FIX 0.1U/ml	FIX Def + FX-WT 7.5µg/ml	FIX Def + FX-対 照+ 7.5µg/ml	FIX Def + FX-IIa 7.5µg/ml
ラグタイム	8.33	5.33	5.33	7.17	7.33	6.83	7.5
ETP	1345.5	238.5	1641	1063.5	1471	1550	1543
ピーク	134.27	7.23	266.66	82.84	110.99	173.16	197.8
tt ピーク	12.67	22.5	8.33	13.33	12.67	11.83	12.33
スタートテ イル	41	70	26	46	48.5	32.5	31
速度	30.94	0.42	88.89	13.45	20.78	34.63	40.95

グループ名	FIX Def + FX- PAR1 7.5µg/ml	FIX Def + FX- PAR1M 7.5µg/ml	FIX Def + FX- FXIa1 7.5µg/ml	FIX Def + FX- FXIa2 7.5µg/ml	FIX Def + FX- Kal1 7.5µg/ml	FIX Def + FX- Kal2 7.5µg/ml	FIX Def + FX- Kal3 1.6µg/ml	FIX Def + FX-WT 7.5µg/ml
ラグタイム	7.5	7.17	5.5	6.17	6.5	6.5	6	7.33
ETP	1366	1472.5	1589.5	1583	1543	1549	1594	1472
ピーク	67.56	133.76	267.69	257.72	179.29	220	242.54	126.29
tt ピーク	14.17	11.67	8.33	8.83	10.5	9.83	9	12.17
スタートテ イル	71	40.5	27	27.5	33	29.5	28.5	43
速度	10.13	29.72	94.59	96.89	44.82	66.07	80.85	26.09

Table 13:組織因子による活性化後、第 IX 因子欠損血漿のプールへのファミリー1 の FX 又はそのバリエーションの添加から得たトロンビノグラムによる動態パラメーター

図 17 のトロンビノグラムの動態パラメーターを表に提示する。ラグタイム(分);ETP、生成した全トロンビン(nM);ピーク、トロンビンピークの高さ(nM);tt ピーク、ピーク最大の時間(分);スタートテイル、速度開始時間(分);速度、トロンビン生成の最高速度(nM/分)。

10

20

30

40

50

トロンビン生成時間(TGT)に関して、ファミリー1の第X因子バリエーション:FIX欠損血漿中の内因性凝固経路(セファリン)の凝血促進能力の測定

1-実験プロトコル

試薬、自動装置及び実験プロトコルは実施例6に記載されているものと同一である。

【0170】

トロンビン生成試験を、20 µlのセファリン(1mlの蒸留したH₂Oで再構成したCK-Prest)及び20 µlのfluca-キット(基質+CaCl₂)の存在下で任意選択に細胞上清及び対照を含有する血漿の80 µlのプールで実施する。使用した血漿は正常な血漿及び第IX因子欠損血漿である。

【0171】

10

2-結果

VKORの存在下でHEK293F細胞のトランスフェクションから生じたファミリー1の上清を、既に記載した対照を使用してセファリンによる活性化後にTGTにより分析した。

【0172】

対照は予想されるように作用し、FIX欠損血漿は陰性であり(それはIIaを全く生成できず)、FIXの用量を増加させた場合、有効性の勾配が見出される{図18; table 14(表15)}。このアッセイにおいて、FXによる補足(2つのアッセイを実施した)はトロンビンの有意な量を生成することができない(1.24及び1.53nM/分の速度)。他方で、ファミリー1のFX-IIa、FX-FXIIa1及び2並びにFX-対照+変異体は、対照の少なくとも4.7X~55Xのトロンビンの有意に多い量を生成することが可能となる{図18及び図19; table 14(表15)}。

20

【0173】

【表 15】

グループ名	ユニキャリブ レータ	FIX 欠損	FIX Def + FIX 1U/ml	FIX Def + FIX 0.1U/ml	FIX Def + FX-WT 7.5µg/ml	FIX Def + FX-対 照+ 7.5µg/ml	FIX Def + FX-IIa 7.5µg/ml
ラグタイム	18.33	42.5	13.67	31.83	30.5	22.33	16.33
ETP	1383.5	0	1529	899.5	316.5	1147	1448.5
ピーク	311.19	0.49	369.87	107.53	16.16	120.28	279.02
tt ピーク	20.33	57.33	15.33	36.33	43.5	29	20
スタートテ イル	36.5	0	31	55	71	44.5	32.5
速度	155.60	0.03	222.81	23.90	1.24	18.03	76.03

グループ名	FIX Def + FX- PAR1 7.5µg/ml	FIX Def + FX- PAR1M 7.5µg/ml	FIX Def + FX- FXIa1 7.5µg/ml	FIX Def + FX- FXIa2 7.5µg/ml	FIX Def + FX- Kal1 7.5µg/ml	FIX Def + FX- Kal2 7.5µg/ml	FIX Def + FX- Kal3 1.6µg/ml	FIX Def + FX-WT 7.5µg/ml
ラグタイム	37.17	28.17	15.67	17	23	18.5	16	27.5
ETP	237	402.5	686	626.5	429.5	498.5	496	341
ピーク	12.51	24.06	59.45	53.54	28.73	36.12	38.66	18.68
tt ピーク	51.17	39.67	23.5	25.17	33	28.17	25.33	39.67
スタートテ イル	71	68.5	44.5	45.5	55	48.5	51	70
速度	0.89	2.09	7.59	6.55	2.87	3.74	4.14	1.53

Table 14:セファリンによる活性化後、第 IX 因子欠損血漿のプールへのファミリー1 の FX 又はそのバリアントの添加から得たトロンビノグラムによる動態パラメーター

図 18 のトロンビノグラムの動態パラメーターを表に提示する。ラグタイム(分);ETP、生成した全トロンビン(nM);ピーク、トロンビンピークの高さ(nM);tt ピーク、ピーク最大の時間(分);スタートテイル、速度開始時間(分);速度、トロンビン生成の最高速度(nM/分)。

10

20

30

40

50

トロンビン生成時間(TGT)に関して、ファミリー3の第X因子バリエーション:FVIII欠損血漿中の外因性凝固経路(TF 1pM/PL 4 μM)の凝血促進能力の測定

1-実験プロトコル

トロンビン生成試験を、最終濃度1pMの組織因子(TF)及び4 μMのリン脂質(PL)を含有する20 μlのPPP試薬(Stago社)の存在下で任意選択に細胞上清又は対照を含有する血漿の80 μlのプールで実施する。使用した種々の血漿は正常及び第VIII因子欠損である。

【0175】

トロンビンの出現の測定の開始を構成する20 μlのFluCa-キット(基質+CaCl₂)を加えることによって反応を開始する。蛍光の出現を、390nmの励起波長及び460nmの発光波長にてFluoroskan Ascent蛍光光度計(ThermoLabsystems社)で測定する。次いでトロンビノグラム(時間の関数として蛍光強度を表す曲線)を、比較計算によって蛍光値をトロンビンのnMに変換するThrombinoscope(商標)ソフトウェアによって分析する。

10

【0176】

2-結果

VKORの存在下でHEK293F細胞のトランスフェクションから生じたファミリー3の上清を、既に記載した対照を使用して組織因子による活性化後にTGTにより分析した。対照(正常な血漿、組換えFVIIIで再構成した又は組換えFVIIIで再構成しなかったFVIII欠損血漿)は予想されるように作用する。他方で、FX-WTは、中程度であるが、予想されるより大きい信号を与える{図20及び図21; table 15(表16)}。しかしながら、その平均速度(59nM/分)は、いくつかの変異体、特にFX-FXIIa1/2、FX-Ka12/3及びFX-対照+並びにFX-IIaの平均速度を下回り、それらの速度は78nM/分超である(すなわち対照の少なくとも130%)。

20

【0177】

【表 16】

グループ名	ユニキャリブレ ータ	FVIII 欠損	FVIII Def + リ コンピネート 1U/ml	FVIII Def + リ コンピネート 0.1U/ml	FVIII Def + FX- WT 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- 対照+ 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- IIa 7.5µg/ml
ラグタイム	8	9.33	7.17	9.33	7.83	7.17	7.5
ETP	1325.5	0	1795	1334.5	1549.5	1641	1683.5
ピーク	136.55	12.25	291.64	125.53	175.6	233.75	234.31
ttピーク	12.5	29.67	9.5	13.67	11.17	10.17	10.5
スタートテ イル	40	0	33	46.5	40	34.5	34.5
速度	30.34	0.60	125.17	28.92	52.57	77.92	78.10

グループ名	FVIII Def + FX- PAR1 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- PAR1M 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- FXIa1 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- FXIa2 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- Kal1 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- Kal2 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- Kal3 1.65µg/ml	FVIII Def + FX- WT 7.5µg/ml
ラグタイム	6.5	8.5	5.67	6.33	8.33	6	6.33	7.83
ETP	1665	1565	1724	1724	1560	1803	1715.5	1569.5
ピーク	225.48	189.25	301.86	281.98	213.57	303.58	270.6	199.2
ttピーク	9.5	11.83	7.67	8.5	11	8	9	10.83
スタートテ イル	35	39.5	31	31	37	31	32	36.5
速度	75.16	56.83	150.93	129.94	79.99	151.79	101.35	66.40

Table 15:組織因子による活性化後、第 VIII 因子欠損血漿のブールへのファミリー3 の FX 又はそのバリエーションの添加から得たトロンビノグラムによる動態パラメーター

図 20 のトロンビノグラムの動態パラメーターを表に提示する。ラグタイム(分);ETP、生成した全トロンビン(nM);ピーク、トロンビンピークの高さ(nM);tt ピーク、ピーク最大の時間(分);スタートテイル、速度開始時間(分);速度、トロンビン生成の最高速度(nM/分)。

10

20

30

40

トロンビン生成時間(TGT)に関して、ファミリー3の第X因子バリエーション:FVIII欠損血漿中の内因性凝固経路(セファリン単独)の凝血促進能力の測定

1-実験プロトコル

試薬、自動装置及び実験プロトコルは実施例6に記載されているものと同じである。トロンビン生成試験を、20 µlのセファリン(1mlの蒸留したH₂Oで再構成したCK-Prest)及び20 µlのfluca-キット(基質+CaCl₂)の存在下で任意選択に細胞上清及び対照を含有する血漿の80 µlのプールで実施する。使用した血漿は正常な血漿及び第VIII因子欠損血漿である。

【0179】

2-結果

VKORの存在下でHEK293F細胞のトランスフェクションから生じた上清のファミリー3を、既に記載した対照を使用してセファリンによる活性化後にTGTにより分析した。

【0180】

対照は予想されるように作用し、FVIII欠損血漿は陰性であり(それはIIaを全く生成できず)、FVIIIの用量を増加させた場合、有効性の勾配が見出される{図21; table 16(表17)}。FXによる補足(2つのアッセイを実施した)はトロンビンの有意な量を生成することができない(6.06及び7.65nM/分の速度)。他方で、ファミリー3のFX-IIa、FX-FXIIa1及び2並びにFX-対照+変異体は、26nMより速い、すなわちFX-WTより少なくとも3.8X速い速度で有意な量のトロンビンを生成することが可能となる{図23; table 16(表17)}。

【0181】

10

20

【表 17】

グループ名	ユニキャリブレ ータ	FVIII 欠損	FVIII Def + リ コンビネート 1U/ml	FVIII Def + リ コンビネート 0.1U/ml	FVIII Def + FX- WT 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- 対照+ 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- lla 7.5µg/ml
ラグタイム	19.33	15.5	7.67	18	28.67	18.67	14.67
ETP	1347.5	0	1803	1442.5	938	1491.5	1635.5
ピーク	304.16	0.48	336.48	278.12	56.51	167.62	288.52
tt ピーク	21.5	38.33	9.33	20.17	38	24.17	17
スタートテ イル	37	0	32	41.5	71	46	38
速度	140.17	00.2	202.70	128.17	6.06	30.48	123.83

グループ名	FVIII Def + FX- PAR1 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- PAR1M 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- FXIa1 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- FXIa2 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- Kal1 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- Kal2 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- Kal3 7.5µg/ml	FVIII Def + FX- WT 7.5µg/ml
ラグタイム	19.83	26.17	14.17	15.17	24.5	14.5	17.67	26.17
ETP	1335.5	1054	1396.5	1426.5	1033	1464	1365.5	1035
ピーク	113.21	74.28	160.63	149.07	69.4	163.57	119.67	67.55
tt ピーク	27.33	35	19.5	20.83	33	20	24.67	35
スタートテ イル	53.5	65	43.5	44.5	65.5	42.5	50.5	67
速度	15.09	8.41	30.14	26.34	8.16	29.74	17.10	7.65

Table 16:セプティンによる活性化後、第 VIII 因子欠損血漿のブールへのファミリー3 の FX 又はそのバリエーションの添加から得たトロンビノグラムによる動態パラメーター

図 23 のトロンビノグラムの動態パラメーターを表に提示する。ラグタイム(分);ETP、生成した全トロンビン(nM);ピーク、トロンビンピークの高さ(nM);tt ピーク、ピーク最大の時間(分);スタートテイル、速度開始時間(分);速度、トロンビン生成の最高速度(nM/分)。

10

20

30

40

50

トロンビン生成時間(TGT)に関して、ファミリー3の第X因子バリエーション:FIX欠損血漿中の外因性凝固経路(TF 1pM/PL 4 μM)の凝血促進能力の測定

1-実験プロトコル

試薬、自動装置及び実験プロトコルは実施例6に記載されているものと同一である。

【0183】

トロンビン生成試験を、最終濃度1pMの組織因子(TF)及び4 μMのリン脂質(PL)を含有する20 μlのPPP試薬(Stago社)並びに20 μlのfluca-キット(基質+CaCl₂)の存在下で任意選択に細胞上清及び対照を含有する血漿の80 μlのプールで実施する。使用した血漿は正常な血漿及び第IX因子欠損血漿である。

【0184】

2-結果

VKORの存在下でHEK293F細胞のトランスフェクションから生じたファミリー3の上清を、既に記載した対照を使用して組織因子による活性化後にTGTにより分析した。

【0185】

対照は予想されるように作用し、FIX欠損血漿は陰性であり(それはIIaを全く生成できず)、FIXの用量を増加させた場合、有効性の勾配が見出される{図23;table 17(表18)}。FXによる補足(2つのアッセイを実施した)はトロンビンの有意な量を生成することができない(23nM/分の平均速度)。他方で、FX-PAR1Mを除いて、ファミリー3の全ての変異体は、33 nMより速い、すなわちFX-WTより少なくとも140%速い速度で有意な量のトロンビンを生成することが可能となる{図23;table 17(表18)}。

【0186】

10

20

【表 18】

グループ名	ユニキャリアブ レータ	FIX 欠損	FIX Def + FIX 1U/ml	FIX Def + FIX 0.1U/ml	FIX Def + FX-WT 7.5µg/ml	FIX Def + FX-対 照+ 7.5µg/ml	FIX Def + FX-IIa 7.5µg/ml
ラグタイム	8.33	5.33	5.33	7.17	7.33	7.17	7.17
ETP	1345.5	238.5	1641	1063.5	1471	1632	1660.5
ピーク	134.27	7.23	266.66	82.84	110.99	185.83	190.32
tt ピーク	12.67	22.5	8.33	13.33	12.67	11.67	12.17
スタートテ イル	41	70	26	46	48.5	33.5	33
速度	30.94	0.42	88.89	13.45	20.78	41.30	38.06

グループ名	FIX Def + FX- PAR1 7.5µg/ml	FIX Def + FX- PAR1M 7.5µg/ml	FIX Def + FX- FXIa1 7.5µg/ml	FIX Def + FX- FXIa2 7.5µg/ml	FIX Def + FX- Kal1 7.5µg/ml	FIX Def + FX- Kal2 7.5µg/ml	FIX Def + FX- Kal3 1.6µg/ml	FIX Def + FX-WT 7.5µg/ml
ラグタイム	6.33	8	6	6.67	8.5	6	6.5	7.33
ETP	1606	1451	1599	1646	1428.5	1740	1679	1472
ピーク	173.4	126.89	250.41	240.75	143.97	260.48	223.11	126.29
tt ピーク	11.5	12.67	9	10	12.5	9	10.17	12.17
スタートテ イル	34	43.5	28	30	41	28	30	43
速度	33.54	27.17	83.47	72.30	35.99	86.83	60.79	26.09

Table 17:組織因子による活性化後、第 IX 因子欠損血漿のプールへのファミリー3 の FX 又はそのバリエーションの添加から得たトロンビノグラムによる動態パラメーター

図 23 のトロンビノグラムの動態パラメーターを表に提示する。ラグタイム(分);ETP、生成した全トロンビン(nM);ピーク、トロンビンピークの高さ(nM);tt ピーク、ピーク最大の時間(分);スタートテイル、速度開始時間(分);速度、トロンビン生成の最高速度(nM/分)。

10

20

30

40

トロンビン生成時間(TGT)に関して、ファミリー3の第X因子バリエーション:FIX欠損血漿中の内因性凝固経路(セファリン)の凝血促進能力の測定

1-実験プロトコル

試薬、自動装置及び実験プロトコルは実施例6に記載されているものと同じである。トロンビン生成試験を、20 µlのセファリン(1mlの蒸留したH₂Oで再構成したCK-Prest)及び20 µlのfluca-キット(基質+CaCl₂)の存在下で任意選択に細胞上清及び対照を含有する正常な血漿の80 µlのプールで実施する。使用した血漿は正常な血漿及び第IX因子欠損血漿である。

【0188】

2-結果

VKORの存在下でHEK293F細胞のトランスフェクションから生じたファミリー3の上清を、既に記載した対照を使用してセファリンによる活性化後にTGTにより分析した。

10

【0189】

対照は予想されるように作用し、FIX欠損血漿は陰性であり(それはIIaを全く生成できず)、FXIの用量を増加させた場合、有効性の勾配が見出される{図24; table 18(表19)}。このアッセイにおいて、FXによる補足(2つのアッセイを実施した)はトロンビンの有意な量を生成することができない(1.24及び1.53nM/分の速度)。他方で、ファミリー1のFX-IIa、FX-FXIIa1及び2、FX-Ka12及び3、並びにFX-対照+変異体は、対照の少なくとも3.4X~52X多い有意な量のトロンビンを生成することが可能となる{図24及び図25; table 18(表19)}。更に、FX-PAR1M及びFX-Ka12変異体を除いて、全ての変異体はFX-WTより活性である。

20

【0190】

【表 19】

グループ名	ユニキャリアブ レート	欠損 FIX	FIX Def + FIX 1U/ml	FIX Def + FIX 0.1U/ml	FIX Def + FX-WT 7.5µg/ml	FIX Def + FX-対 照+ 7.5µg/ml	FIX Def + FX-IIa 7.5µg/ml
ラグタイム	18.33	42.5	13.67	31.83	30.5	22.5	17.5
ETP	1383.5	0	1529	899.5	316.5	1233.5	1495.5
ピーク	311.19	0.49	369.87	107.53	16.16	125.06	265.59
tt ピーク	20.33	57.33	15.33	36.33	43.5	29.67	21.17
スタートテ イル	36.5	0	31	55	71	46	35
速度	155.60	0.03	222.81	23.90	1.24	17.44	72.37

グループ名	FIX Def + FX- PAR1 7.5µg/ml	FIX Def + FX- PAR1M 7.5µg/ml	FIX Def + FX- FXIa1 7.5µg/ml	FIX Def + FX- FXIa2 7.5µg/ml	FIX Def + FX- Kal1 7.5µg/ml	FIX Def + FX- Kal2 7.5µg/ml	FIX Def + FX- Kal3 1.6µg/ml	FIX Def + FX-WT 7.5µg/ml
ラグタイム	22	29.67	15	17.67	27.67	16.5	18.17	27.5
ETP	527	424.5	752.5	618	400	772.5	535	341
ピーク	38.39	24	59.65	48.93	21.04	61.27	42.44	18.68
tt ピーク	32.67	42	23.67	26.83	39.83	24.67	27.33	39.67
スタートテ イル	57	71	45.5	46	70	48	49.5	70
速度	3.60	1.95	6.88	5.34	1.73	7.50	4.63	1.53

Table 18:セファリンによる活性化後、第 IX 因子欠損血漿のプールへのファミリー3 の FX 又はそのバリアントの添加から得たトロンビノグラムによる動態パラメーター

図 24 のトロンビノグラムの動態パラメーターを表に提示する。ラグタイム(分);ETP、生成した全トロンビン(nM);ピーク、トロンビンピークの高さ(nM);tt ピーク、ピーク最大の時間(分);スタートテイル、速度開始時間(分);速度、トロンビン生成の最高速度(nM/分)。

【 図 1 】

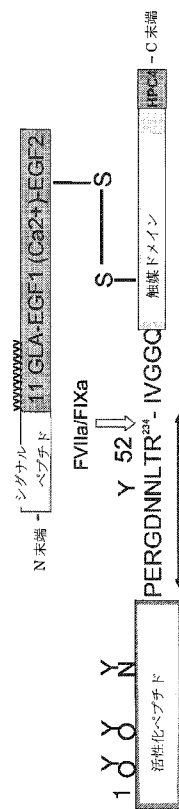


Figure 1

【 図 2 】

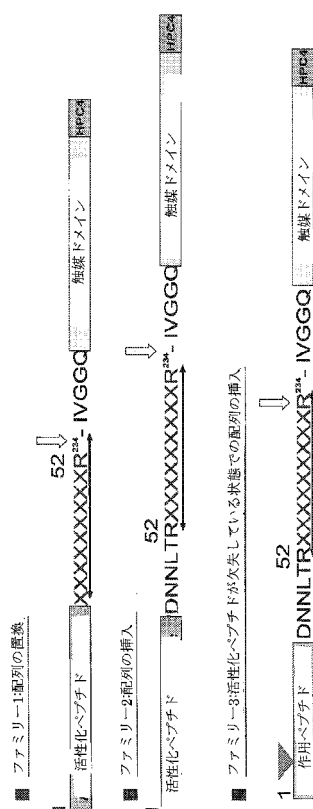


Figure 2

【 図 3 】

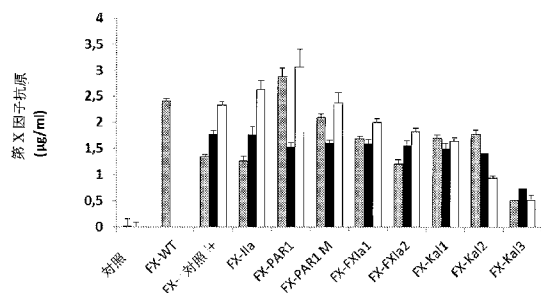


Figure 3

【 図 5 】

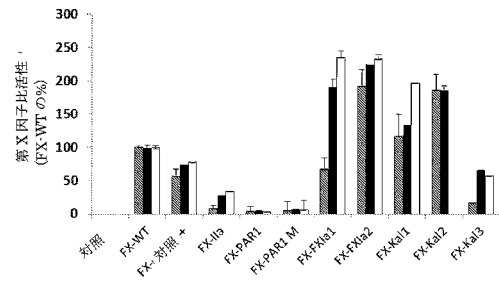


Figure 5

【 図 4 】

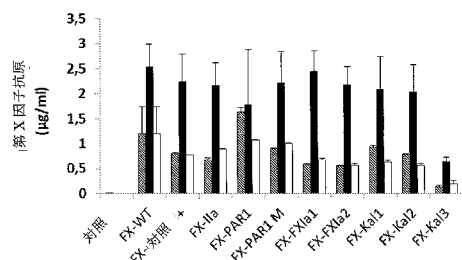


Figure 4

【 図 6 】

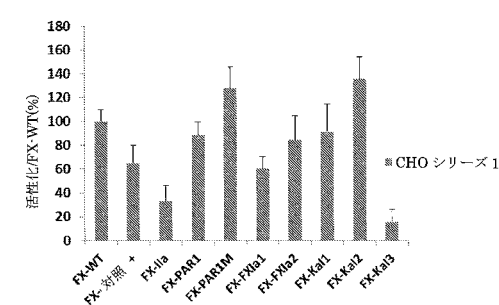


Figure 6

【図 7】

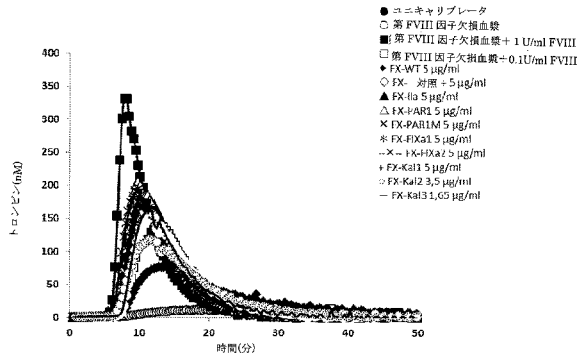


Figure 7

【図 9】

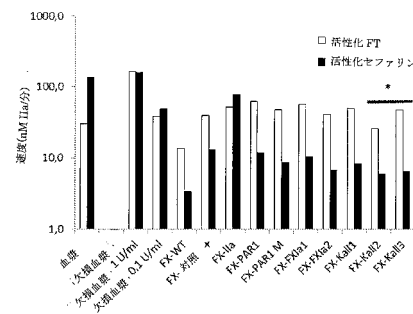


Figure 9

【図 8】

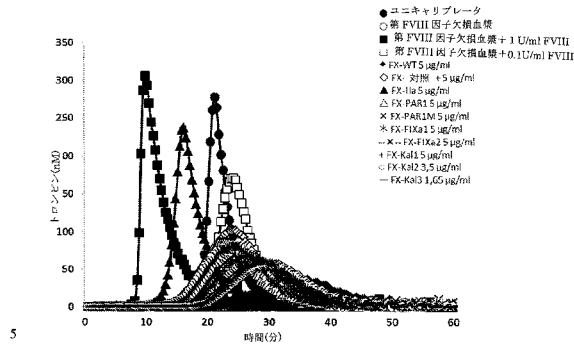


Figure 8

【図 10】

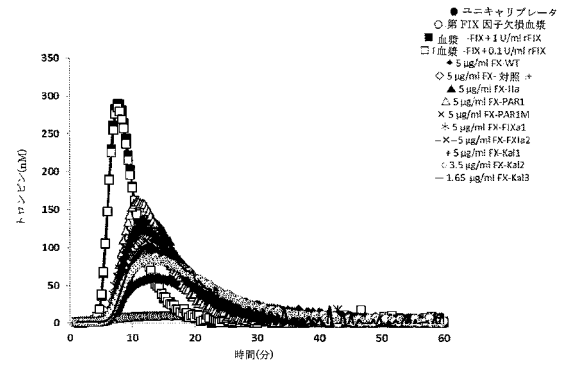


Figure 10

【図 11】

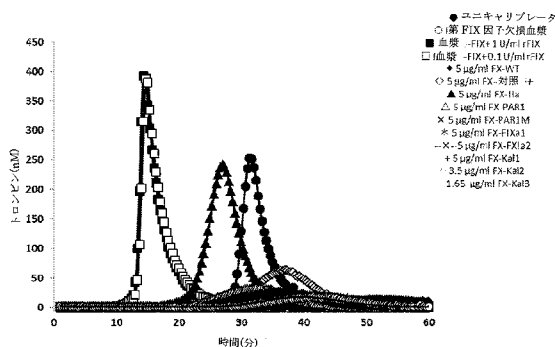


Figure 11

【図 13】

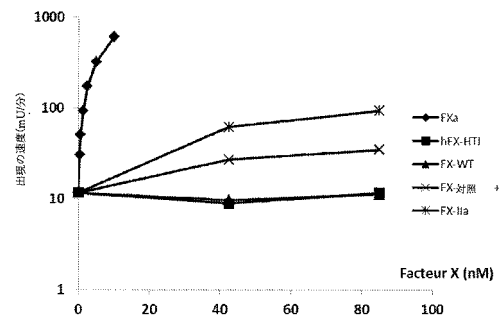


Figure 13

【図 12】

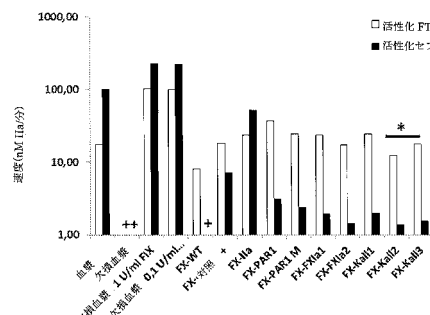


Figure 12

【図 14】

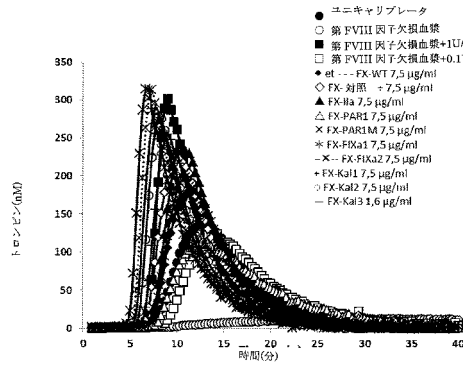


Figure 14

【図 15】

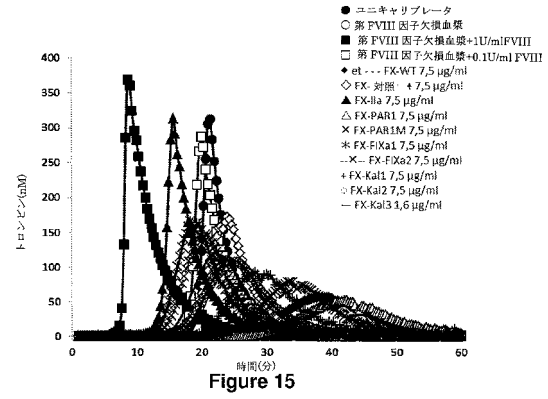


Figure 15

【図 16】

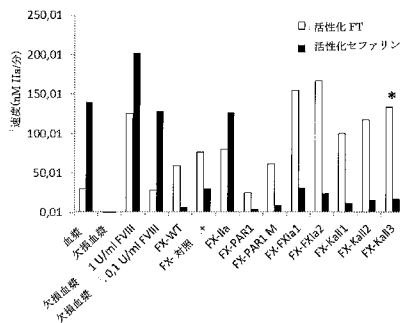


Figure 16

【図 17】

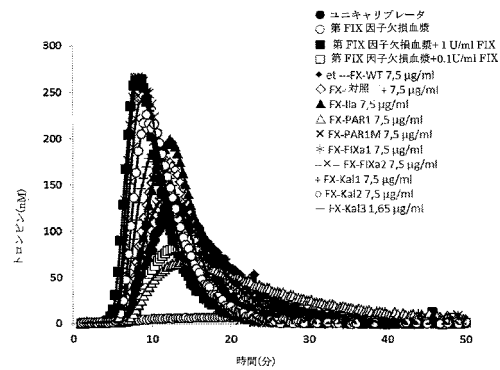


Figure 17

【図 18】

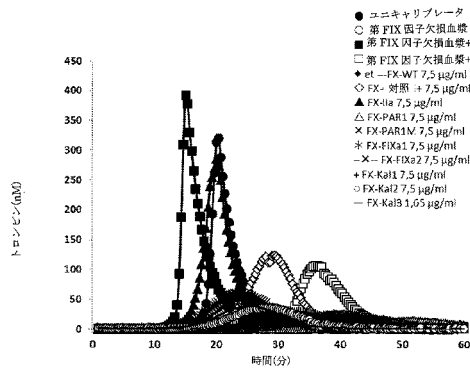


Figure 18

【図 20】

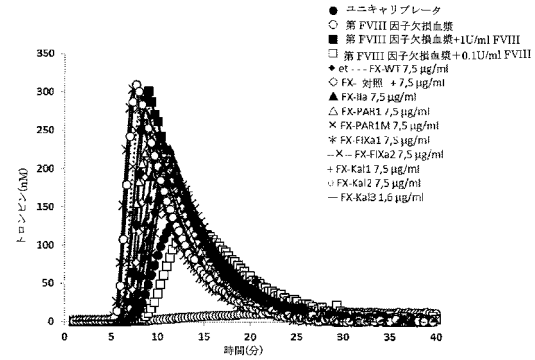


Figure 20

【図 19】

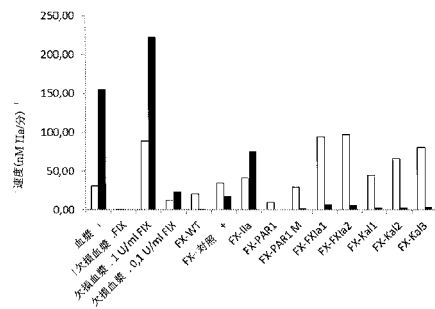


Figure 19

【図 21】

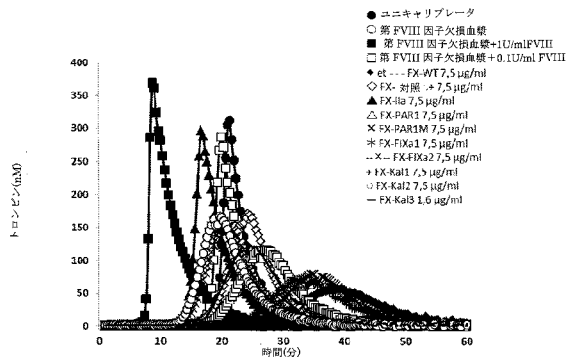


Figure 21

【図 22】

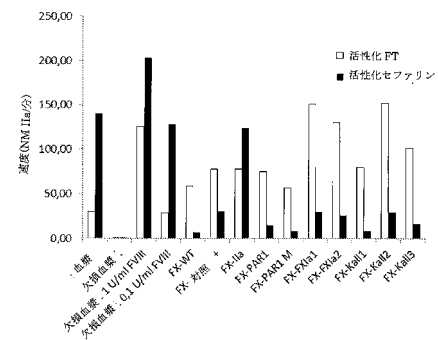
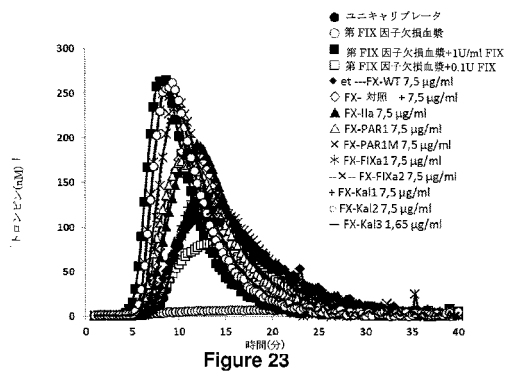
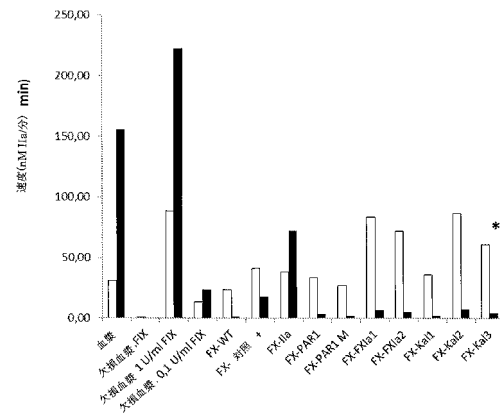


Figure 22

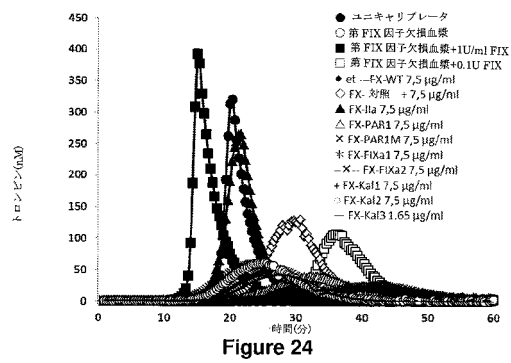
【図 23】



【図 25】



【図 24】



【配列表】

2016506945000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2014/050191

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N9/64 A61K38/48 C12N15/12
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/10896 A2 (BAXTER AG [AT]) 15 February 2001 (2001-02-15) abstract page 7, line 9; claims 1-43; figures 1,2; sequences 1,2 -----	1-11
A	WO 2006/128668 A2 (ZLB BEHRING GMBH [DE]; SCHULTE STEFAN [DE]; HAUSER HANS-PETER [DE]; KA) 7 December 2006 (2006-12-07) abstract; sequence 2 claims 1-23; figures 1-3; examples 3,4 -----	1-11
A	WO 2006/018204 A1 (ZLB BEHRING GMBH [DE]; WEIMER THOMAS [DE]; SCHULTE STEFAN [DE]; HOFMAN) 23 February 2006 (2006-02-23) abstract page 40; claims 1-42; figure 1; example 3; sequence 41 -----	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 April 2014

Date of mailing of the international search report

30/04/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, Didier

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2014/050191

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0110896	A2	15-02-2001	AT 389013 T 15-03-2008
			AT 410216 B 25-03-2003
			AU 778571 B2 09-12-2004
			AU 6280700 A 05-03-2001
			CA 2380844 A1 15-02-2001
			DE 60038312 T2 26-03-2009
			DK 1238065 T3 07-07-2008
			EP 1238065 A2 11-09-2002
			ES 2302696 T3 01-08-2008
			US 6958322 B1 25-10-2005
			WO 0110896 A2 15-02-2001

WO 2006128668	A2	07-12-2006	AU 2006254311 A1 07-12-2006
			CA 2609226 A1 07-12-2006
			DK 1891091 T3 17-02-2014
			EP 1728798 A1 06-12-2006
			EP 1891091 A2 27-02-2008
			ES 2445394 T3 03-03-2014
			JP 5049271 B2 17-10-2012
			JP 2008541742 A 27-11-2008
			KR 20080022086 A 10-03-2008
			US 2009053185 A1 26-02-2009
			WO 2006128668 A2 07-12-2006

WO 2006018204	A1	23-02-2006	AT 469216 T 15-06-2010
			AU 2005274406 A1 23-02-2006
			BR P10514396 A2 12-05-2009
			CA 2592521 A1 23-02-2006
			CN 101006175 A 25-07-2007
			DK 1781782 T3 23-08-2010
			EP 1781782 A1 09-05-2007
			ES 2346072 T3 08-10-2010
			JP 2008509688 A 03-04-2008
			KR 20070043051 A 24-04-2007
			US 2009130060 A1 21-05-2009
			WO 2006018204 A1 23-02-2006

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2014/050191

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N9/64 A61K38/48 C12N15/12 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 01/10896 A2 (BAXTER AG [AT]) 15 février 2001 (2001-02-15) abrégé page 7, ligne 9; revendications 1-43; figures 1,2; séquences 1,2 -----	1-11
A	WO 2006/128668 A2 (ZLB BEHRING GMBH [DE]; SCHULTE STEFAN [DE]; HAUSER HANS-PETER [DE]; KA) 7 décembre 2006 (2006-12-07) abrégé; séquence 2 revendications 1-23; figures 1-3; exemples 3,4 -----	1-11
A	WO 2006/018204 A1 (ZLB BEHRING GMBH [DE]; WEIMER THOMAS [DE]; SCHULTE STEFAN [DE]; HOFMAN) 23 février 2006 (2006-02-23) abrégé page 40; revendications 1-42; figure 1; exemple 3; séquence 41 -----	1-11
<input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents citées: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
16 avril 2014		30/04/2014
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Gurdjian, Didier

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2014/050191

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0110896	A2	15-02-2001	AT 389013 T	15-03-2008
			AT 410216 B	25-03-2003
			AU 778571 B2	09-12-2004
			AU 6280700 A	05-03-2001
			CA 2380844 A1	15-02-2001
			DE 60038312 T2	26-03-2009
			DK 1238065 T3	07-07-2008
			EP 1238065 A2	11-09-2002
			ES 2302696 T3	01-08-2008
			US 6958322 B1	25-10-2005
			WO 0110896 A2	15-02-2001
WO 2006128668	A2	07-12-2006	AU 2006254311 A1	07-12-2006
			CA 2609226 A1	07-12-2006
			DK 1891091 T3	17-02-2014
			EP 1728798 A1	06-12-2006
			EP 1891091 A2	27-02-2008
			ES 2445394 T3	03-03-2014
			JP 5049271 B2	17-10-2012
			JP 2008541742 A	27-11-2008
			KR 20080022086 A	10-03-2008
			US 2009053185 A1	26-02-2009
			WO 2006128668 A2	07-12-2006
WO 2006018204	A1	23-02-2006	AT 469216 T	15-06-2010
			AU 2005274406 A1	23-02-2006
			BR P10514396 A2	12-05-2009
			CA 2592521 A1	23-02-2006
			CN 101006175 A	25-07-2007
			DK 1781782 T3	23-08-2010
			EP 1781782 A1	09-05-2007
			ES 2346072 T3	08-10-2010
			JP 2008509688 A	03-04-2008
			KR 20070043051 A	24-04-2007
			US 2009130060 A1	21-05-2009
			WO 2006018204 A1	23-02-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P 7/04
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02

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

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 ジャン - リュック・プランティエ

フランス・F - 5 9 1 7 0・クロワ・リュ・アナトール・フランス・1 7

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 DA01 DA02 DA05 DA06 DA11 EA04 GA11
HA08

4B065 AA01X AA26X AA57X AA87X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA44

4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 BA41 DC10 DC17

NA14 ZA532

4H045 AA10 AA30 BA09 BA40 CA40 DA65 EA20 FA74