

【0002】

血液凝固は、凝固が出血の現象によってのみ誘引されるように、非常に複雑な一連の抑制及び均衡によって制御されている (Smith, Travers, & Morrissey, 2015)。外傷によって、これらの酵素の活性化が引き起こされ、そして傷を封鎖するカスケード反応の増幅がもたらされる。血友病は、カスケードが早々に中断され、そして出血が継続するように、これらのタンパク質の1種に関する遺伝子コードにおける欠陥に起因する。血友病、血友病A、血友病B及びファンヴィルブランド病 (von Willebrand's disease) の最も共通の形態は、長い間、精製された因子濃縮液の注入、欠陥のある酵素の置き換え、及び血液が凝固する能力の復元によって治療されていた。

【0003】

因子の注入は、驚くほど効果的であり、それによって、子供時代に死亡していたかもしれない患者が、通常の平均寿命を有することが可能になる (Hoots, 2003)。予防使用の増加によって、すなわち、正当なレベルの保護を持続するための因子の定期的に予定された注入によって、これらの患者は、本質的に通常の生活を送ることができる (Srivastava et al., 2012)。これは、コストなしで、文字通りに、かつ比喩的に行われない。重度の血友病A患者は、この疾患の形態において欠損するタンパク質である因子VIII (FVIII) の短い循環半減期のため、因子を1日おきに注入する必要がある。これは、継続的な静脈アクセス及び非遵守などの多数の問題をもたらす。

【0004】

患者が、注入されたFVIIIに対して遮断抗体を発達させる場合、別の非常に重大な問題が生じる (Kempson & Meeks, 2014)。全血友病A患者の約30%が、それらの治療のある時点において抗体を発達させるであろうが、約5%は、FVIII注入がもはや有効ではなくなるような重度の阻害薬問題を引き起こす。これには、「バイパス」治療の使用が必要となる。因子VIIa (FVIIa) は、凝固カスケードの開始剤の1種であって、かつプロセス中のFVIIIまたは因子IX (FIX) のいずれかの必要性のために使用することができる。FVIIaは2時間のみの循環半減期を有するため、この場合、FVIIaの非常に高い濃度及び非常に頻繁な投与が必要となる。

【0005】

これら及び他の理由のために、より長半減期の因子が非常に望ましい (Pipe, 2010)。それほど頻繁でない投与によって、遵守、静脈アクセス問題が改善され、そしてより小さい質量の精製タンパク質に患者を曝露させ、おそらく、阻害薬形成を減少させるであろう。さらに、より長半減期のタンパク質は、まだ治療を受けていない世界中の血友病患者の推定70%に治療を拡大することができるであろう。因子のコストは重要問題であるが、血友病患者、特に子供たちのために必要とされる複雑な医学的サービスも重要問題である。因子が、単純に皮下注射されるのではなく、静脈を通して注入される必要があるため、重度疾患の子供たちは、専門的な血友病治療センターで治療されることが多い。彼らの治療に対する明らかな障害は、彼らは1週間に数回センターに連れて行かれなければならないことであり、これは、発展途上国において、治療の限界を越える可能性がある。より長い期間で持続する因子は、そのようなセンターに行かなければならぬ機会を、1週間に1度または1カ月に2度にも減少することができるであろう。

【0006】

この問題は、しばらくの間、認識されていて、そして因子の半減期を長くする多数の試みがあった。治療タンパク質の半減期を増加させるための2つの一般的戦略がある。第1は、一般に、PEG化と呼ばれるポリエチレンギリコール鎖によるタンパク質の修飾である (Ginn, Khalili, Lever, & Broccolini, 2014)。PEG鎖は、タンパク質周囲の水和水を増加させ、特定の受容体及び抗体に対する親和性の減少をもたらす。第2の戦略は、免疫グロブリンのFc部分またはヒト血清アルブミンのいずれかによる標的タンパク質の融合によって新生児Fc受容体 (FcRN) を利用する

ことである (Andersen et al., 2011)。免疫グロブリン及びアルブミンは両方とも、FcRNとのそれらの相互作用及びFcRNによる保護のため、長い循環半減期を有する。アルブミンまたは免疫グロブリンが種々の細胞中で内在化される場合、それらはFcRNに結合し、そして分解するのではなく、表面へとリサイクルされる。これらのタンパク質は両方とも、結果として数週間の半減期を有する。

【0007】

これらの戦略は、血友病Bに関するタンパク質である、ヒト因子IXの半減期を増加させるために、成功裏に利用された (Mannucci & Mancuso, 2014)。それらは、FVIIIの半減期を長くすることにおいては、それほど成功していない (Buyue et al., 2014; Stennicke et al., 2013)。FVIII自体は、不安定なタンパク質であり、かつフォンヴィルブランド因子(vWF)の存在を必要とする。vWF不在下のFVIIIは、数分のみの半減期を有する。複合体の半減期は、vWFの半減期によって決定されるため、FVIIIへの修飾はわずかな効果のみを有し、12時間から18時間まで半減期を増加させる。

【0008】

PEG化、アルブミン及びFcへの融合を含む類似の戦略が、FVIIaのために試みられた (Oldenburg & Albert, 2014; Schulze, 2008; van der Flier et al., 2015)。これらの修飾のそれぞれによって、半減期は2時間から10時間以上まで増加したが、FVIIaによる別の問題を解決することができなかった。FVIIaは、組織因子(TF)との複合体において最も活性である。TFの不在下、止血をもたらすために、非常に高濃度のFVIIaが必要とされる。設計されたFVIIaのいくつかの場合、これは阻害薬形成をもたらした。

【0009】

したがって、長半減期凝固複合体のための組成物及び方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0010】

本明細書中、凝固因子；アルブミンまたはアルブミンフラグメントに融合した第1のタンパク質を含む融合タンパク質；融合タンパク質による結合を可能にし、それによって、修飾凝固因子が調製されるように、凝固因子に結合する修飾分子；を含み、修飾凝固因子及び融合タンパク質が少なくとも2つの独立した部位において相互作用する、凝固因子複合体が開示される。

【0011】

本明細書において開示された凝固因子複合体を含むキットが開示される。

【0012】

凝固因子注入を必要とする疾患有する対象の治療方法であって、本明細書において開示された凝固因子複合体を対象に投与することを含む方法も開示される。疾患有、例えば、血友病であることが可能である。対象への凝固因子複合体の投与によって、凝固因子のみの投与時に得られた血中濃度半減期より長い、凝固因子複合体の血中濃度半減期をもたらすことができる。凝固因子複合体は、注射、吸入、鼻腔内または経口によって対象に投与することができる。

【0013】

本発明の1つまたはそれ以上の実施形態の詳細は、添付の図面及び以下の説明において明らかにされる。本発明の他の特徴、目的及び利点は、説明及び図面から、ならびに請求の範囲から明白であろう。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】長半減期凝固因子VII (修飾凝固因子を含む、凝固因子複合体)の構成のためのスキームを示す。

【図2】長半減期の高活性凝固因子VIIa (修飾凝固因子を含む、凝固因子複合体)の構成のためのスキームを示す。

【図3A】図3A及びBは、FVIIへの修飾分子の結合が、その活性を妨げないことを示す。図3Aは、マレイミド-P EG1000-ラウレートまたはマレイミド-P EG1000-フルオレセインイソチオシアネートのいずれかによって修飾されたFVIIが、未修飾FVIIと同活性を示すことを示す。

【図3B】図3Bは、未処理のFVII、同実験条件を受けたが、修飾分子を有さないFVII、及び修飾分子のマレイミド-P EG1000-ラウレートによって処理されたFVIIが、同活性を有することを示す。

【図4A】図4A及びBは、FVIIの重質鎖への修飾分子の結合を示す。図4Aは、未処理のFVII(対照)及び修飾FVII(修飾FVII)による、銀染色SDSポリアクリルアミドゲル(4~20%)を示す。修飾分子は、マレイミド-P EG1000-ビオチンである。

【図4B】図4Bは、類似ゲルの電気プロットを示す。プロットは、アビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)でプローブされ、次いで、HRPに関して、修飾分子を視覚化するために染色された。

【図5A】図5A~Cは、アルブミンが修飾FVIIに結合することを示す。図5Aは、20mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、4mM CaCl₂、0.01% Tween 20中、Superdex S200 Increaseにおいてクロマトグラフされ、そしてFVII活性に関して分析されたFVIIを示す。

【図5B】図5Bは、同一緩衝液中のクロマトグラフィーの前に、10μg/mlのヒト血清アルブミンで前もってインキュベーションされた修飾FVII(マレイミド-P EG1000-ラウレート)を示す。アルブミンは、分子量をより高くシフトする。

【図5C】図5Cは、アルブミンが修飾FVIIの活性に影響を与えないことを示す。

【図6A】図6A~Dは、融合タンパク質の構造及び修飾因子複合体の形成を示す。図6Aは、融合タンパク質モノマー、CM110の構造及びSDSアクリルアミドゲル電気泳動を示す。

【図6B】図6Bは、融合タンパク質ダイマー、CM210の構造及びSDSアクリルアミドゲル電気泳動を示す。

【図6C】図6Cは、20mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、4mM CaCl₂、0.01% Tween 20中、Superdex S200 Increaseにおけるクロマトグラフィーの前に、10μg/mlの融合タンパク質モノマー(CM110)で前もってインキュベーションされた修飾FVII(マレイミド-P EG1000-ラウレートまたはマレイミド-P EG1000-ミリストートによる修飾)を示す。

【図6D】図6Dは、CM110の添加が、修飾FVIIの活性に対する影響を与えないことを示す。

【図7A】図7A~Dは、融合タンパク質に修飾FVIIを結合させるクリックケミストリーを示す。図7Aは、FVIIを修飾するために使用されたクリックケミストリー試薬の構造を示す。

【図7B】図7Bは、マレイミド-P EG4-6メチルテトラジン(MPT)が、FVIIの活性に影響を与えないことを示す。

【図7C】図7Cは、マレイミド-P EG3-トランスシクロオクテンによって修飾された融合タンパク質CM110とのMPT修飾FVIIのインキュベーションが、20mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、4mM CaCl₂、0.01% Tween 20中、Superdex S200 Increaseにおけるクロマトグラフィー後もFVII活性を維持する高分子量複合体をもたらすことを示す。

【図7D】図7Dは、複合体の形成がFVII活性に影響を与えないことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本明細書に記載される材料、組成物及び方法は、開示された主題の特定の態様の以下の詳細な説明、ならびに本明細書に含まれる実施例及び図面を参照することによって、より

容易に理解されることがある。

【0016】

本材料、組成物及び方法が開示及び記される前に、下記の態様が、特定の合成方法及び特定の試薬に限定されず、実際には、もちろん、変化し得ることは理解されるはずである。本明細書で使用される専門用語は、特定の態様を説明することのみを目的としており、かつ限定するように意図されないことも理解されるべきである。

【0017】

また、本明細書全体で、種々の刊行物が参照される。それら全体でのこれらの刊行物の開示は、開示された主題が関連する技術状態をより完全に説明するため、本出願中に参照することによって本明細書に組み込まれる。開示された参照は、参照が依拠される文中で論じられる部分に含まれる材料に関して本明細書で参照することによって、個々に、そして特に含まれる。

【0018】

定義

本明細書中、及びそれに統いて、請求の範囲中、多くの用語が参照されるが、これらは、以下の意味を有するものとして定義される：

【0019】

本明細書及び請求の範囲全体で、「含む（comprise）」という用語、ならびに「含む（comprising）」及び「含む（comprises）」などの他の形態は、含むが、それに限定されないことを意味し、かつ例えば、他の添加剤、成分、整数またはステップを排除することは意図されない。

【0020】

記載及び添付の請求の範囲において使用される場合、単数形の形態「a」、「an」及び「the」は、文脈上明らかに他を規定しない限り、複数形の指示対象を含む。したがって、例えば、「酵素（an enzyme）」への参照は、2種以上のそのような酵素の混合物を含み、「善玉菌（the probiotic）」への参照は、2種以上のそのような善玉菌の混合物などを含む。

【0021】

「任意の」または「任意に」は、その後記載された現象または状況が、生じることが可能であるか、または生じることが可能ではないこと、ならびに記載には、現象または状況が生じる例及びそれが生じない例が含まれることを意味する。

【0022】

範囲は、本明細書中、「約」1つの特定値から、及び／または「約」別の特定値までとして表現することができる。「約」は、明記された値の5%以内を意味することができる。そのような範囲が表現される場合、別の態様は、1つの特定値から、及び／または他の特定値までを含む。同様に、値が近似として表される場合、前置詞「約」の使用によって、特定値が別の態様を形成することは理解されるであろう。範囲のそれぞれの終末点が、他の終末点と関係している場合及び他の終末点とは無関係である場合の両方において重要なことは、さらに理解されるであろう。多数の値が本明細書に開示され、かつそれぞれの値が、本明細書中、その値自体の他に、「約」その特定値として開示されていることも理解されている。例えば、値「5」が開示される場合、「約5」も開示される。

【0023】

ポリペプチドのフラグメントまたは変異体及びそのいずれの組合せも、本明細書に開示される。本発明のポリペプチド結合領域または結合分子を参照する場合の「フラグメント」または「変異体」という用語は、参照ポリペプチドの少なくともいくつかの特性（例えば、FVII変異体またはフラグメントに関する凝固活性、またはvWFフラグメントに関するFVII結合活性、またはアルブミンフラグメントによるリサイクリング活性）を維持するいずれのポリペプチドも含む。ポリペプチドのフラグメントには、本明細書の別の部分で論じられる特定の抗体フラグメントに加えて、タンパク分解フラグメント、ならびに削除フラグメントが含まれるが、自然発生した全長ポリペプチド（または成熟し

たポリペプチド)を含まない。本発明のポリペプチド結合領域または結合分子の変異体には、上記のフラグメントが含まれ、また、アミノ酸置換、欠失または挿入による異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドも含まれる。変異体は、自然発生または非自然発生型であることが可能である。非自然発生変異体は、当該技術において既知の変異誘発技術を使用して製造することができる。変異体ポリペプチドは、保存または非保存アミノ酸置換、欠失または付加を含むことができる。

【0024】

「フォンウィルブランド因子」は、本明細書中、「vWF」とも記載され、止血に関与する血液糖タンパク質である。基本的なvWFモノマーは、2050アミノ酸タンパク質である。全てのモノマーは、因子VIIICに結合するD'D3領域(フォンウィルブランド因子型D領域)を含む、特定の機能を有する多数の特定の領域を含む。

【0025】

「内在性vWF」という用語は、本明細書で使用される場合、血漿中に自然に存在するvWF分子を示す。内在性vWF分子は、マルチマーであることが可能であるが、モノマーまたはダイマーであることも可能である。血漿中の内在性vWFは、FVIIICに結合し、そしてFVIIICとの非共有結合型複合体を形成する。

【0026】

「アルブミンフラグメント」という用語は、本明細書で使用される場合、本明細書に記載の通り、融合タンパク質の半減期を延長する能力を維持する全長アルブミンのいずれのアルブミンフラグメントまたは変異体を意味する。そのようなアルブミンフラグメント及び変異体は、当業者に知られている。例えば、Otagiri et al(2009), Biol. Pharm. Bull. 32(4), 527-534は、77種のアルブミン変異体が知られており、これらの25種が領域IIICにおいて突然変異を有することを開示する。カルボキシ終点においてC末端175アミノ酸が欠けている自然変異体は、減少した半減期を有することが示された(Andersen et al(2010), Clin. Biochemistry 43, 367-372)。Iwao et al(2007)は、マウスモデルを使用して、自然発生ヒトアルブミン変異体の半減期を調査し、そしてK541E及びK560Eが、減少した半減期を有し、E501K及びE570Kが、増加した半減期を有し、そしてK573Eが、半減期にほとんど影響を与えたことを見出した(Iwao, et al(2007) B. B. A. Proteins and Proteomics 1774, 1582-1590)。Galliano et al(1993) Biochim. Biophys. Acta 1225, 27-32は、自然変異体E505Kを開示する。Minchietti et al(1990)は、自然変異体K536Eを開示する。Minchietti et al(1987) Biochim. Biophys. Acta 916, 411-418は、自然変異体K574Nを開示する。Takahashi et al(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4413-4417は、自然変異体D550Gを開示する。Carlson et al(1992). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89, 8225-8229は、自然変異体D550Aを開示する。これらは全て、アルブミンフラグメント及び変異体に関するそれらの教示に関して、全体として参照によって組み込まれる。

【0027】

「vWFフラグメント」という用語は、本明細書で使用される場合、FVIIICと相互作用し、かつ全長vWFによってFVIIICに通常提供される特徴、例えば、FVIIICへの早期活性化の防止、早期タンパク質分解の防止、早期クリアランスに導く可能性のあるリン脂質膜への会合の防止、裸FVIIICを結合するが、vWF結合FVIIICを結合する可能性はないFVIIICクリアランス受容体への結合の防止、及び/またはFVIIIC重質鎖及び軽質鎖相互作用の安定化の少なくとも1つまたはそれ以上を維持する、いずれのvWFフラグメントも意味する。「vWFフラグメント」という用語は、本明細書で使用される場合、全長または成熟vWFタンパク質を含まない。特定の実施形態において

て、「vWF フラグメント」は、本明細書で使用される場合、vWF タンパク質 D' 領域及びの D3 領域を含むが、vWF タンパク質の A1 領域、A2 領域、A3 領域、D4 領域、B1 領域、B2 領域、B3 領域、C1 領域、C2 領域及び CK 領域を含まない。vWF フラグメント及び変異体は、当業者に知られており、かつ本明細書に開示される。

【0028】

「融合」または「キメラ」タンパク質は、それが本質的に自然に連結しない第2のアミノ酸配列に連結する第1のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、「融合タンパク質」という用語は、本明細書で使用される場合、一例において、フォンウィルブラン因子フラグメント、例えば、D'D3 のアルブミンまたはアルブミンフラグメントへの融合を意味する。因子 VVIIa について、組織因子 (TF) に連結するアルブミンも開示される。

【0029】

本明細書中、「修飾分子」が開示される。修飾分子は、凝固因子、例えば、因子 VVII (FVII) の凝固強化活性を維持しながら、融合タンパク質と相互作用するように、凝固因子を修飾することができるいずれの分子でもある。例えば、FVIIは、ポリエチレングリコール鎖によって修飾され、かつ脂肪酸によってキャップされることが可能である。本明細書中、修飾分子の種々の例が論じられる。

【0030】

「修飾凝固因子」は、それが十分な凝固活性を維持しながら、融合タンパク質と相互作用することができるよう、修飾分子によって修飾されている凝固因子を意味する。修飾凝固因子は、本明細書中、誘導 FVII または F8F と記載することもできる。修飾凝固因子は、例えば、修飾凝固因子複合体、例えば、本発明の因子 VVII または因子 VVIIa 複合体を形成するよう、修飾 FVII に結合した脂肪酸を結合することができるような様式でヒトアルブミンに適切なサイズのリンカーによって結合した D'D3 の融合タンパク質に結合することが可能である。

【0031】

本明細書で使用される場合、「半減期」という用語は、生体内の特定のポリペプチドの生物的半減期を意味する。半減期が、対象に投与された量の半分が、動物において循環及び/または他組織からクリアにされるための所要時間によって表されてよい。

【0032】

「半減期限定因子」または「FVII 半減期限定因子」という用語は、本明細書で使用される場合、FVII タンパク質の半減期が、野生型 FVII と比較して、1.5 倍または 2 倍より長くなることを阻止する因子を示す。例えば、全長または成熟 vWF は、FVII 及び vWF 複合体が 1 つまたはそれ以上の vWF クリアランス経路によって系からクリアにされることを誘発することによって、FVII 半減期限定因子の役割を果たすことができる。一例において、内在性 vWF は、FVII 半減期限定因子である。別の例において、FVII タンパク質に非共有結合した全長組換型 vWF 分子は、FVII - 半減期限定因子であることが可能である。

【0033】

「相互作用」または「連結」という用語は、本明細書で使用される場合、一実施形態において、共有結合または非共有結合を意味する。「共有結合」という用語は、例えば、共有結合、例えば、ジスルフィド結合、ペプチド結合、あるいは 1 つまたはそれ以上のアミノ酸を意味する。別の実施形態において、「相互作用」または「連結」は、本明細書に開示されたタンパク質またはタンパク質フラグメントが、一緒に連結する 2 種のタンパク質またはタンパク質フラグメントの間で、例えば、FVII 及びアルブミンの間及び/または D'D3 及びアルブミンの間で、リンカーによって連結されることを意味する。第 1 のアミノ酸は、第 2 のアミノ酸に直接結合するか、または並置されることができ、あるいは代わりに、介在配列が第 1 の配列を第 2 の配列に共有結合することができる。「連結」という用語は、C 末端または N 末端における第 2 のアミノ酸配列への第 1 のアミノ酸配列の融合のみを意味するのではなく、第 2 のアミノ酸配列（または、それぞれ、第 1 のアミノ酸配列）におけるいずれか 2 個のアミノ酸中への第 1 のアミノ酸配列（または、第 2 の

アミノ酸配列) 全体の挿入も含む。一実施形態において、第1のアミノ酸配列は、ペプチド結合またはリンカーによって第2のアミノ酸配列に結合することが可能である。リンカーは、ペプチドまたはポリペプチドまたはいずれかの化学部分、例えば、クリックケミストリーであることが可能である。

【0034】

本明細書に開示される凝固因子複合体は、予防のために使用することができる。「予防的治療」という用語は、本明細書で使用される場合、出血エピソードの前、または出血エピソードを防ぐ通常の活動の間に一貫して分子を投与することを意味する。一実施形態において、一般的な止血剤を必要とする対象は、外科手術を経験しているか、または外科手術を経験しようとしている。凝固因子複合体は、外科手術の前または後に予防薬として投与することができる。凝固因子複合体は、急性出血エピソードを制御するために、外科手術の間または後に投与することができる。外科手術としては、限定されないが、肝臓移植、肝臓切除術、歯科治療または茎細胞移植が含まれる。

【0035】

本発明の凝固因子複合体は、オンデマンド(「断続的」とも記載される)治療のために使用することも可能である。「オンデマンド治療」または「断続的治療」という用語は、出血エピソードの症候に応じて、または出血を引き起こし得る活動の前のキメラ分子の投与を意味する。一態様において、オンデマンド(断続的)治療は、外傷の後などの出血の開始時、または外科手術の前などの出血が予想される場合に、対象に与えることができる。別の態様において、オンデマンド治療は、接触スポーツなどの出血のリスクを増加させる活動の前に与えることができる。

【0036】

本明細書で使用される場合、「急性出血」という用語は、根本的な原因にかかわらず、出血エピソードを意味する。例えば、対象は、外傷、尿毒症、遺伝性出血疾患(例えば、因子VII欠失)、血小板疾患、または凝固因子に対する抗体の発達に起因する耐性を有し得る。

【0037】

治療(treat)、治療(treatment)、治療(treating)という用語は、本明細書で使用される場合、例えば、疾患の重症度または状態の減少；疾患コースの継続時間の減少；疾患または状態と関連する1つまたはそれ以上の症候の改善；必ずしも疾患または状態を治すことなく、疾患または状態を有する対象への有益な作用の提供、あるいは疾患または状態と関連する1つまたはそれ以上の症候の予防を意味する。

【0038】

一実施形態において、「治療(treating)」または「治療(treatment)」という用語は、本発明の凝固因子複合体を投与することによって、対象において、少なくとも約1IU/dL、2IU/dL、3IU/dL、4IU/dL、5IU/dL、6IU/dL、7IU/dL、8IU/dL、9IU/dL、10IU/dL、11IU/dL、12IU/dL、13IU/dL、14IU/dL、15IU/dL、16IU/dL、17IU/dL、18IU/dL、19IU/dLまたは20IU/dLのFVIIIトラフ濃度を維持することを意味する。別の実施形態において、治療(treating)または治療(treatment)は、約1～約20IU/dL、約2～約20IU/dL、約3～約20IU/dL、約4～約20IU/dL、約5～約20IU/dL、約6～約20IU/dL、約7～約20IU/dL、約8～約20IU/dL、約9～約20IU/dLまたは約10～約20IU/dLのFVIIIトラフ濃度を維持することを意味する。疾患または状態の治療(treating)または治療(treatment)は、非血友病患者の対象のFVIII活性の少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%または20%に相当するレベルにおいて、対象のFVIII活性を維持することも含むことができる。治療に必要とされる最低トラフ濃度は、1つまたはそれ以上の既知の方法によって測定することができて、そして各自に対して

調整（増加または減少）が可能である。

【0039】

凝固因子複合体

ヒトアルブミンは、本明細書中に記載される融合タンパク質の構成において有用な一連の特性を有する。それは、新生児 Fc 受容体に結合することによって融合タンパク質の半減期を延長する能力を有し、かつそれは、脂肪酸及びビリルビンを含む多数の小分子を結合する。加えて、それは、種々のリガンドを結合するために利用することができる単一暴露スルフヒドリル基を有する。本明細書で利用される場合、これらの特性は、長半減期 FVII、ならびに FVIIa の長半減期、高活性バージョンの構成を可能にする。本明細書に開示される凝固因子複合体は、凝固因子；アルブミンまたはアルブミンフラグメントに融合した第 1 のタンパク質を含む融合タンパク質；融合タンパク質による結合を可能にし、それによって、修飾凝固因子が調製されるように、凝固因子に結合する修飾分子；を含み、修飾凝固因子及び融合タンパク質が少なくとも 2 つの独立した部位において相互作用する。修飾分子は、凝固因子への融合タンパク質の結合を可能にするか、または凝固因子と融合タンパク質との間の化学反応を引き起こすように、融合タンパク質に結合することも可能である。凝固因子と修飾分子との組合せは、本明細書中、修飾凝固因子、例えば、修飾因子 VVII 及び VVIIa と記載することができる。修飾凝固因子及び融合タンパク質は、少なくとも 2 つの独立した部位において相互作用する。凝固因子は、例えば、因子 VVIIa であることが可能である。別の実施形態において、凝固因子は、因子 VVII であることが可能である。

【0040】

凝固因子

vWF は非常に大きい分子であり、かつこれらの大分子の大マルチマー複合体として循環する (Lenting, Christophe, & Denis, 2015)。それは非常に大きいので、マクロファージ中に摂取されて、そして粒子として消化される。FVII を保護する D'D3 と呼ばれる vWF のより小さいフラグメントを設計する試みは成功しており、そしてこのフラグメントを Fc 領域に融合することによって、劇的にその半減期が増加する (Yee et al., 2014)。vWF 不足マウスにおいて、この D'D3 - Fc 融合は、約 15 時間から 7 日間以上まで FVII の半減期を増加する。

【0041】

vWF 及び FVII の結合定数は、約 0.3 nM である (Orlova, Kovnir, Vorobieva, Gabibov, & Vorobieva, 2013)。Yee, et al. (Yee et al., 2014) によって調製された D'D3 - Fc 融合の測定された結合定数は、1.5 nM である。溶液中に約 1 ~ 2 パーセントの遊離 FVII が常に存在するように、FVII は強く、しかしながら、逆戻り可能なように、vWF に結合する。マウス及びヒトの両方において、vWF は、FVII よりも約 50 倍高い濃度で存在する。より低い結合定数及び vWF のより高い濃度の間で、FVII は、D'D3 - Fc 融合から離れて急速に競争することが可能である。

【0042】

これらの問題に対する 1 つの潜在的な解決策は、本明細書に記載されるように、D'D3 をアルブミンに融合して、それによって、「融合タンパク質」を調製することによって見出される。アルブミンは、血液中の最も豊富なタンパク質である (Peters, 1995)。前記の通り、循環においてその 19 日半減期は、FcRN に結合するその能力によって決定される。それは 2 つの主要な役割を果たす：1 つは、血液のオスモル濃度を維持すること、そして第 2 は疎水性分子を輸送することである。アルブミンは、脂肪酸の主要輸送体である。インスリンの半減期を成功裏に増加させるために使用された戦略は、例えば、ミリスチン酸、14 炭素脂肪酸へのインスリンの抱合である。この分子は、インスリンデテミルと呼ばれる (Philips & Scheen, 2006)。注射時に、脂肪酸は迅速にアルブミンに結合し、4 分から 5 時間までインスリンの半減期を増加する

。

【0043】

これらの2つのアイデアの組合せは、長い間存在する半減期問題を解決し、そして大いに必要とされる解決策を提供するために、新規分子において本明細書に開示される（図1）。例えば、第1に、FVIIは、ポリエチレングリコール鎖によって修飾され、そして例えば、脂肪酸によってキャップされることが可能である。「修飾分子」のこの例は、本明細書に記載される場合、「修飾凝固因子」の一例を調製する。したがって、脂肪酸は、修飾凝固因子を調製するために、一実施形態において、FVII分子から突出する。修飾凝固因子は、本明細書中、誘導FVIIまたはF8Fと記載することもできる。修飾凝固因子は、修飾凝固因子複合体、例えば、本発明の因子VIIまたは因子VIIa複合体を形成するように、修飾FVIIに結合した脂肪酸を結合することができるような様式でヒトアルブミンに適切なサイズのリンカーによって結合した、vWFから誘導されたD'D3の融合タンパク質に結合することが可能である。D'D3フラグメントは、修飾FVII上のその同族部位に結合することができ、そして脂肪酸は、アルブミンに結合することができる。修飾凝固因子は、両方とも強い結合定数を有する、2つの部位において融合タンパク質と結合可能である。加えて、融合タンパク質においてアルブミンへとD'D3を結合するリンカーの長さは、最適な半減期延長のために、D'D3が、因子VII結合部位に対して適切に、または最適に方向づけられるように異なって、より長いか、またはより短いことが可能である。このようにして、本来のvWFが修飾FVIIに対して効果的に競争することが可能であること、そしてアルブミンへの結合が実質的に半減期を増加させることは、可能性が低い。

【0044】

修飾凝固因子及び融合タンパク質は、1、2、3、4またはそれ以上の部位において相互作用することが可能である。一実施形態において、修飾凝固因子及び融合タンパク質は、両分子上で2つの独立した部位において相互作用する。「独立した部位」とは、分子の一方または両方の非オーバーラップ、または異なる領域を意味する。少なくとも修飾凝固因子の1つの結合部位は、自然発生的な結合部位であることが可能である。換言すれば、結合部位は、凝固因子において自然に発生して、そしてその修飾の一部ではない。その部位における1つまたはそれ以上のアミノ酸が、凝固因子に対して、自然発生的でも、本来のものでもないように、修飾凝固因子における他の結合部位は修飾されることが可能である。

【0045】

融合タンパク質は、2種、3種、4種またはそれ以上の一緒に融合したタンパク質を含むことができる。例えば、第1の融合タンパク質は、フォンウィルブランド因子のD'D3フラグメントを含むことができる。vWFの変形及びフラグメントは当業者に知られており、そして本明細書中に考察される。そのようなものの例は、米国特許第9,125,890号、ならびに米国特許出願公開第2014/0357564号及び同第2013/120939号に見ることができる。代わりに、第1の融合タンパク質は、組織因子(TF)を含むことができる。第2のタンパク質は、アルブミン、または免疫グロブリンFcフラグメントを含むことができる。一例において、免疫グロブリンFcフラグメントは、修飾凝固因子に特異的な単一鎖可変領域(scfv)を含むことができる。scfvは、修飾凝固因子の修飾部位に特異的であることが可能である。

【0046】

図5は、アルブミンが修飾FVIIに結合することができ、そしてそれが再びFVII活性に影響を与えないことを明示する。パネルAは、FVII活性によって分析された、Superdex 200サイズ排除カラム上で、マレイミド-PEG1000-ラウレートによって修飾されたFVIIのクロマトグラフィーを示す。パネルBは、誘導FVIIへのアルブミンの付加が、予期されたように、分子量をより高くシフトさせることを示す。パネルCは、誘導FVIIに結合したアルブミンがFVII活性を損なわないことを明示する。

【0047】

融合タンパク質の2つのバージョンが、C3A細胞(ATCC CRL-10741)、ヒト肝細胞株への移入によって製造された。図6、パネルAのCM110は、フォン・ヴィルブランド因子のD'D3フラグメント、56アミノ酸グリシン、セリンリッチリンカーリー及び全長ヒトアルブミンからなる。CM210(図6、パネルB)は、D'D3領域を通してのスルフヒドリル結合によって連結された、この分子のダイマーである。マレイミド-P EG1000-ラウレートまたはマレイミド-P EG1000-ミリストートによって修飾されたFVIIがCM110と一緒にインキュベーションされる場合、図6、パネルCで示されるように、それらは、自然発生的にFVIIの活性をより高分子量にシフトする修飾凝固因子複合体を形成する。CM110がこの実験において過剰量で存在する場合、全てのFVII活性がより高分子量にシフトすることに留意することは重要である。CM110及びCM210のいずれも、修飾FVIIの活性に影響を与えない(図6、パネルD)。

【0048】

このような二重結合戦略は、多くの他の方法によって達成可能であるが、なお、必要とされるFc RNサイクリングを維持することを当業者は本開示から判断して認識するであろう。アルブミンは、ビリルビンなどの多種多様なリガンドを結合することが知られているため、他のリガンドが、修飾分子において脂肪酸を置き換えることができる(Peters, 1995)。

【0049】

別の実施形態は、アルブミン/脂肪酸対を抗体/小分子の組合せに置き換えることである。同族モノクローナル抗体を有する多くの小分子があり、そしてこれらは、しばしば、生物学試験片において小分子の検出に使用される(Bradbury, Sidhu, Dibel, & McCafferty, 2011)。D'D3、アミノ酸スペーサー、免疫グロブリンのFc領域、及び小分子、例えば、ニトロチロシンに特異的な単一鎖可変領域を有する分子を構成することができる。次いで、修飾分子は、マレイミド-P EG1000-ニトロチロシンの形態をとることができた。これは、同一の二重結合効果及びFc RNサイクリングを有するが、免疫グロブリンベースmを使用する。

【0050】

修飾FVIIの類似の戦略を使用する別の選択肢は、凝固因子及び融合タンパク質の間に共有結合を形成するために使用することができる。クリックケミストリーまたはバイオ直交型ケミストリーは、複合体化学環境において互いにのみ反応するよう意図される分子を説明する。図7中のパネルAは、一般構造マレイミド-P EG_N-Xの2種のそのような分子を示し、この場合、Xは、一方ではメチルテトラジンであり、他方ではトランスシクロオクテン(TCO)である。上記の通り、メチルテトラジン含有分子によるFVIIの修飾は、活性に影響を与えない(図7、パネルB)。本明細書に記載される融合タンパク質であるCM110及びCM210上の唯一の遊離スルフヒドリルは、アルブミン中のシステイン34に相当するものである。マレイミド-P EG3-TCOによってCM110またはCM210、及びマレイミド-P EG4-メチルテトラジンによってFVIIを修飾し、次いで混合することによって、TCOがメチルテトラジンと反応した時に、共有結合した複合体が形成する。パネルCは、マレイミド-P EG4-メチルテトラジン修飾FVIIへのマレイミド-P EG3-TCO修飾CM110の付加によって、なおFVII活性を維持する高分子量複合体がもたらされることを示す。パネルDは、再び、共有結合複合体の形成が活性に影響を与えないことを明示する。

【0051】

分子内結合の数学は、Kramer及びKarpen(Kramer & Karpen, 1998)によって、より詳細に、Zhou(Zhou, 2006)によって説明されている。結合は、個々の解離定数及び有効な局部濃度の関数である。融合タンパク質におけるアルブミン及び修飾FVIIの間の結合は、例えば、修飾FVIIへとD'D3フラグメントを結合する。次いで、D'D3フラグメントの局部濃度は非常に高くなり

、内在性vWFの結合を妨げる。FVIIへのD'D3結合またはアルブミンへの脂肪酸結合のいずれかのための解離定数がナノモル範囲であるため、修飾FVIIへの融合タンパク質の結合は強いべきである。クリックケミストリー修飾複合体に関しては、連結は共有結合である。

【0052】

この二重結合戦略は、Yee, et al. ² (Yee et al., 2014) が遭遇した少なくとも2つの問題を克服する。第1は、融合タンパク質に対するFVIIの結合親和性を増加し、そして既存の高濃度の血清中vWFによる希釈を防ぐことである。結合は、今や、結合定数及び有効濃度の両方の生成物であるべきであり、遊離vWFまたは遊離脂肪酸が結合のために効果的に競争することが不可能である。

【0053】

本明細書中、修飾凝固因子複合体とも記載されるこの分子は、FVIIまたは他の長半減期FVII分子によって与えられない、いくつかの望ましい特徴を有する。第1に、非常に強い、または共有結合は、融合タンパク質からの修飾FVIIの解離が非常に少ないと保証し、通常のvWFの大プール中への投与されたFVIIの損失を防ぐ。第2に、内在性vWFから修飾凝固因子複合体を分離し、そして半減期を延長するために融合タンパク質を使用することによって、7日間以上であったD'D3-Fcタンパク質に関するYee, et al. (Yee et al., 2014) によって示されたものと類似の半減期が得られる。第3に、遊離FVIIではなく、修飾凝固複合体を投与することによって、阻害薬形成の発生率を減少することができる。第4に、アルブミンを、FVIIに直接ではなく、融合タンパク質に結合することによって、FVII活性が保存される。FVIIへのアルブミンの直接融合は、不活性分子をもたらす{Power: 2015gu}。アルブミンをFVIIと直接接觸させずに離れて配置することは、FcRNによる効率的なリサイクルを補助するであろう。最終的に、これは、ヒト細胞系において製造された全ヒトタンパク質であり、これは、さらに阻害薬形成の発生率を減少することができる。

【0054】

修飾凝固因子VIIを含む凝固因子複合体の半減期は、凝固因子単独と比較して、少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90または100%またはそれより高くなることが可能である。凝固因子複合体は、未修飾の凝固因子と比較して、2、3、4、5、6、7、8、9または10倍またはそれより長い半減期を有することができる。より特に、凝固因子複合体の半減期は、FVIIタンパク質単独の半減期よりも少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約6倍、少なくとも約7倍、少なくとも約8倍、少なくとも約9倍、少なくとも約10倍、少なくとも約11倍または少なくとも約12倍またはそれより長くなることが可能である。一実施形態において、FVIIの半減期は、野生型FVIIの半減期より約1.5倍～約20倍、約1.5倍～約15倍または約1.5倍～約10倍長い。別の実施形態において、FVIIの半減期は、凝固因子複合体中にある場合、野生型FVIIまたはFVIIタンパク質単独と比較して、約2倍～約10倍、約2倍～約9倍、約2倍～約8倍、約2倍～約7倍、約2倍～約6倍、約2倍～約5倍、約2倍～約4倍、約2倍～約3倍、約2.5倍～約10倍、約2.5倍～約9倍、約2.5倍～約8倍、約2.5倍～約7倍、約2.5倍～約6倍、約2.5倍～約5倍、約2.5倍～約4倍、約2.5倍～約3倍、約3倍～約10倍、約3倍～約9倍、約3倍～約8倍、約3倍～約7倍、約3倍～約6倍、約3倍～約5倍、約3倍～約4倍、約4倍～約6倍、約5倍～約7倍または約6倍～約8倍長い。他の実施形態において、凝固因子複合体の半減期は、少なくとも約17時間、少なくとも約18時間、少なくとも約19時間、少なくとも約20時間、少なくとも約21時間、少なくとも約22時間、少なくとも約23時間、少なくとも約24時間、少なくとも約25時間、少なくとも約26時間、少なくとも約27時間、少なくとも約28時間、少なくとも約29時間、少なくとも約30時間、少なくとも約31時間、少なくとも約32時間、少なくとも約

33時間、少なくとも約34時間、少なくとも約35時間、少なくとも約36時間、少なくとも約48時間、少なくとも約60時間、少なくとも約72時間、少なくとも約84時間、少なくとも約96時間または少なくとも約108時間である。なお他の実施形態において、凝固因子複合体の半減期は、約15時間～約2週間、約16時間～約1週間、約17時間～約1週間、約18時間～約1週間、約19時間～約1週間、約20時間～約1週間、約21時間～約1週間、約22時間～約1週間、約23時間～約1週間、約24時間～約1週間、約36時間～約1週間、約48時間～約1週間、約60時間～約1週間、約24時間～約6日間、約24時間～約5日間、約24時間～約4日間、約24時間～約3日間または約24時間～約2日間である。

【 0 0 5 5 】

いくつかの実施形態において、対象あたりの凝固因子複合体の平均半減期は、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間（1日間）、約25時間、約26時間、約27時間、約28時間、約29時間、約30時間、約31時間、約32時間、約33時間、約34時間、約35時間、約36時間、約40時間、約44時間、約48時間（2日間）、約54時間、約60時間、約72時間（3日間）、約84時間、約96時間（4日間）、約108時間、約120時間（5日間）、約6日間、約7日間（1週間）、約8日間、約9日間、約10日間、約11日間、約12日間、約13日間または約14日間である。

【 0 0 5 6 】

長半減期、高活性 FVIIa

長半減期、高活性 FVIIa を調製するために、類似戦略を適用することができる（図 3）。標準的な凝固条件下、FVIIa は、最初に、タンパク質分解によって FVIIa へと活性化される。しかしながら、FVIIa は、因子 X (FX) を活性化するその機能を実行することに対して、非常に低い活性を有する。FVIIa が、外傷の部位において、膜結合組織因子に出会う時、それは結合して、100 倍より高い FXa 製造活性を有する複合体を形成する (Vadivel & Bajaj, 2012)。通常、FVIIa は、極低濃度で存在し、そして血液凝固の增幅力スケードを引き起こすことのみに機能する。バイパス剤として、FVIIa は、それがフィブリンクロットを形成するために必要とされるトロンビンバーストを提供するために十分な FX から FXa への活性化ができるよう、非常に高い濃度で投与される。

〔 0 0 5 7 〕

上記で開示された長半減期 F V I I I の例と類似して、T F は、約 1 nM の F V I I a に対する解離定数を有する (V ad i v e l & B a j a j , 2 0 1 2)。最初に水溶性脂肪酸によって F V I I a を誘導化し、次いで、それを、可溶性組織因子 - アルブミン融合タンパク質に結合させることによって、いくつかの望ましい特性を有する複合体が調製されるであろう。複合体は、F X の活性化に関して、2、10、20、30、40、50、60、70、80、90 または 100 倍またはそれより高い、増加した活性を有する。これによって、現在使用されているよりも実質的に少ない量のタンパク質を用いての効果的なバイパス治療が可能となり、それによって、コスト及び免疫原性チャンスの両方が減少する。複合体の半減期は、アルブミン融合の結果として F c R N を経由してリサイクルすることによって増加させることができ、それによって、それほど頻繁でない投与がもたらされる。これは、その非常に短い 2 時間の半減期のため、F V I I a に関する重要な考慮である。控えめな延長さえ有用であるが、この分子は、特に長い半減期を与えることができる。F V I I a へのアンチトロンビン I I I (A T I I I) の結合は、F V I I a 活性のクリアランスの主要経路の 1 つである (L aw s o n , B u t e n a s , R i b a r i k , & M a n n , 1 9 9 3)。A T I I I は、ヘパリンの存在下において、及び T F が膜結合された場合、F V I I a を非活性化することにおいて最も有効である。F V I I a の A T I I I 介在非活性化の研究によって、A T I I I が F V I I a を T F から取り外し、次いで、再結合を防ぐことが示された。強く結合した T F の存在は、膜結合 T F への誘導 F V I I a F の結合を防ぎ、そしておそらく、A T I I I 非活性化を防ぐであろう。

。

【0058】

修飾分子

「修飾分子」は、本明細書に開示される場合、凝固因子を修飾し、そしてそれが融合タンパク質と相互作用することを可能にさせるいのちの分子も含むことができる。修飾分子は、例えば、脂肪酸を含むことができる。修飾分子は、例えば、ポリエチレンギリコール鎖を通して修飾凝固因子に結合することができる。融合タンパク質の第1及び第2のタンパク質は、例えば、リンカーによって一緒に結合することができる。修飾凝固因子は、1つまたはそれ以上の修飾アミノ酸を含むことができる。さらに、あるいは代わりに、融合タンパク質は、修飾アミノ酸を含むことができる。例えば、本発明の凝固因子複合体は、いくつかの実施形態において、ペプチド結合または修飾ペプチド結合、すなわち、ペプチドイソスターによって互いに結合したアミノ酸から構成されることが可能であり、かつ20の遺伝子コード化アミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。ポリペプチドは、翻訳後加工などの天然プロセス、または当該技術において周知の化学修飾技術のいのちかによって修飾されてもよい。そのような修飾は、基本テキストに十分に説明されており、より詳細には、特定主題論文で、ならびに多数の研究文献で説明される。

【0059】

修飾は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖及びアミノまたはカルボキシル末端を含む、ポリペプチドのいのちにおいても生じることができる。同種の修飾が、所与のポリペプチドの様々な部位において、同一または様々な度合で存在し得ることは理解されるであろう。また、所与のポリペプチドが多くの種類の修飾を含んでもよい。ポリペプチドは、例えば、ユビキチン結合の結果として分枝していてもよく、かつそれらは、分枝の有無にかかわらず、環式であってもよい。環式、分枝及び分枝環式ポリペプチドは、翻訳後の天然プロセスの結果として生じ得、または合成法によって製造されてもよい。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボース化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、ホスホジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、peg化、タンパク質分解プロセス、リン酸化、ブレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、タンパク質へのアミノ酸の転移RNA介在付加、例えば、アルギニル化及びユビキチン結合が含まれる。(例えば、PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York; pgs. 1-12 (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990); Rattan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 48-62 (1992)を参照のこと)。

【0060】

FVIIは、表1に示される一般構造マレイミド-PEGn-Xの多数の修飾分子によって修飾されることができる。種々のそのような修飾分子を使用することができる。例えば、マレイミド-PEGの種々の修飾は、PEG-マレイミド誘導体に関するその開示に関して全体として参照によって本明細書に組み込まれる、米国特許第6,828,401号に提示されるものなど、当業者に既知である。本発明の例において、この修飾は、FVIIの活性に対する影響は観察されなかった。図3は、Mal-PEG-ラウレートまたはMal-PEG-FITCによる修飾の前及び後のFVII活性を示す。図4は、SDS含有ポリアクリルアミドゲルを示す。パネルAは、誘導体化が、FVIIの分子量または構造に対して影響を有さないことを示す銀染色ゲルである。パネルBは、修飾

分子、この場合、マレイミド - P E G 5 0 0 0 - ビオチンを視覚化するために、ストレプトアビジン - H R P によってプローブされた別のゲルのタンパク質プロットを示す。結果は、M a l - P E G - ビオチン分子がF V I I I の重質鎖と反応することを示す。修飾分子の例を表1に見ることができる。

表1. F V I I I を修飾するために使用される分子

マレイミド - P E G 5 0 0 0 - ビオチン
 マレイミド - P E G 1 0 0 0 フルオレセインイソチオシアネート
 マレイミド - P E G 1 0 0 0 - ラウレート
 マレイミド - P E G 1 0 0 0 - ミリストート
 マレイミド - P E G 4 - 6 - メチルテトラジン
 マレイミド - P E G 3 - トランスシクロオクテン

【0061】

凝固因子の修飾のための化学部分は、ポリエチレングリコール、エチレングリコール／プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなどの水溶性ポリマーから選択されてもよい。凝固因子は、分子内のランダムな位置で、または分子内のあらかじめ決められた位置で修飾されてよく、かつ1、2、3またはそれ以上の結合した化学部分を含んでもよい。

【0062】

ポリマーは、いずれの分子量のものであってもよく、かつ分枝していても、または分枝していないなくてもよい。ポリエチレングリコールに関して、好ましい分子量は、取扱い及び製造の容易さのため、約1 k D a ~ 約1 0 0 k D a である（「約」という用語は、ポリエチレングリコールの調製において、いくつかの分子が、記載された分子量より多く、いくつかは少なくなるであろうことを示している）。所望の治療プロフィール（例えば、所望の徐放期間、もしあるとすれば、生物学的活性に対する影響、取扱いの容易さ、抗原性の度合または欠如、及び治療タンパク質または類似体へのポリエチレングリコールの他の既知の効果）次第で、他のサイズが使用されてもよい。例えば、ポリエチレングリコールは、約2 0 0 、 5 0 0 、 1 0 0 0 、 1 5 0 0 、 2 0 0 0 、 2 5 0 0 、 3 0 0 0 、 3 5 0 0 、 4 0 0 0 、 4 5 0 0 、 5 0 0 0 、 5 5 0 0 、 6 0 0 0 、 6 5 0 0 、 7 0 0 0 、 7 5 0 0 、 8 0 0 0 、 8 5 0 0 、 9 0 0 0 、 9 5 0 0 、 1 0 , 0 0 0 、 1 0 , 5 0 0 、 1 1 , 0 0 0 、 1 1 , 5 0 0 、 1 2 , 0 0 0 、 1 2 , 5 0 0 、 1 3 , 0 0 0 、 1 3 , 5 0 0 、 1 4 , 0 0 0 、 1 4 , 5 0 0 、 1 5 , 0 0 0 、 1 5 , 5 0 0 、 1 6 , 0 0 0 、 1 6 , 5 0 0 、 1 7 , 0 0 0 、 1 7 , 5 0 0 、 1 8 , 0 0 0 、 1 8 , 5 0 0 、 1 9 , 0 0 0 、 1 9 , 5 0 0 、 2 0 , 0 0 0 、 2 5 , 0 0 0 、 3 0 , 0 0 0 、 3 5 , 0 0 0 、 4 0 , 0 0 0 、 4 5 , 0 0 0 、 5 0 , 0 0 0 、 5 5 , 0 0 0 、 6 0 , 0 0 0 、 6 5 , 0 0 0 、 7 0 , 0 0 0 、 7 5 , 0 0 0 、 8 0 , 0 0 0 、 8 5 , 0 0 0 、 9 0 , 0 0 0 、 9 5 , 0 0 0 または1 0 0 , 0 0 0 k D a の平均分子量を有し得る。

【0063】

上記のとおり、ポリエチレングリコールは、分枝構造を有し得る。分枝ポリエチレングリコールは、例えば、米国特許第5,643,575号；M o r p u r g o e t a l . , A p p l . B i o c h e m . B i o t e c h n o l . 5 6 : 5 9 - 7 2 (1 9 9 6) ；V o r o b j e v e t a l . , N u c l e o s i d e s N u c l e o t i d e s 1 8 : 2 7 4 5 - 2 7 5 0 (1 9 9 9) ；及びC a l i c e t i e t a l . , B i o c o n j u g . C h e m . 1 0 : 6 3 8 - 6 4 6 (1 9 9 9) に記載されている。上記文献のそれぞれの開示は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0064】

ポリエチレングリコール分子（または他の化学部分）は、タンパク質の機能的または抗原性領域に対する影響を考慮して、タンパク質に結合するべきである。例えば、参照によって本明細書に組み込まれる、欧州特許第0 4 0 1 3 8 4号（G - C S FへのP E Gへのカップリング）に開示される方法などの多数の結合方法が当業者に利用可能である。また、塩化トレシルを使用するG M - C S Fのp e g化を報告する、M a l i k e t a l .

, Exp. Hematol. 20: 1028 - 1035 (1992) も参照のこと。例えば、ポリエチレングリコールは、遊離アミノまたはカルボキシル基などの反応性基を経由してアミノ酸残基を通じて共有結合されてもよい。反応性基は、活性化ポリエチレングリコール分子が結合し得るものである。遊離アミノ基を有するアミノ酸残基としては、リシン残基及びN末端アミノ酸残基が含まれ得；遊離カルボキシル基を有するものとしては、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基及びC末端アミノ酸残基が含まれ得る。スルフヒドリル基も、ポリエチレングリコール分子を結合するための反応性基として使用されてよい。N末端またはリシン基における結合など、アミノ基における結合が治療目的では好ましい。

【0065】

上記で示唆されるように、ポリエチレングリコールは、多数のアミノ酸残基のいずれにも、連結によってタンパク質に結合し得る。例えば、ポリエチレングリコールは、リシン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸またはシステイン残基への共有結合によって、タンパク質に連結されることができる。ポリエチレングリコールをタンパク質の特定のアミノ酸残基（例えば、リシン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸またはシステイン）に、またはタンパク質のアミノ酸残基（例えば、リシン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン及びその組合せ）の2つ以上の種類に結合させるために、1つまたはそれ以上の反応化学が使用されてもよい。

【0066】

N末端において化学的に修飾させたタンパク質が特に望まれてもよい。本組成物の一例として、ポリエチレングリコールを使用して、（分子量、分岐などによる）様々なポリエチレングリコール分子、反応混合物中のポリエチレングリコール分子対タンパク質（ポリペプチド）分子の割合、実行されるPEG化反応の種類、及び選択されたN末端PEG化タンパク質の入手方法から選択されてもよい。N末端PEG化調製物の入手方法（すなわち、必要であれば、他のモノPEG化部分からこの部分を分離すること）は、PEG化タンパク質分子の個体群からのN末端PEG化材料の精製によるものであってよい。N末端修飾において化学的に修飾された選択的タンパク質は、特定のタンパク質における誘導体化のために利用可能な種々の種類の主要アミノ基の微分反応度（リシン対N末端）を利用する還元アルキル化によって達成されてもよい。適切な反応条件下、カルボニル基含有ポリマーによるN末端におけるタンパク質の実質的に選択的な誘導体化が達成される。

【0067】

上記で示されるように、本発明の凝固因子のPEG化は、いずれかの数の手段によっても達成されてよい。例えば、ポリエチレングリコールは、直接または介入リンカーによって分子に結合され得る。ポリエチレングリコールをタンパク質に結合するためのリンカーなしの系は、Delgado et al., Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Sys. 9: 249 - 304 (1992); Francis et al., Intern. J. of Hematol. 68: 1 - 18 (1998); 米国特許第4,002,531号；米国特許第5,349,052号；WO 95/06058；及びWO 98/32466に記載されており、これらの文献のそれぞれ開示は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0068】

介入リンカーを用いずに、ポリエチレングリコールをタンパク質のアミノ酸残基に直接結合するための1つの系は、塩化トレシルを使用するモノメトキシポリエチレングリコール(MPEG)の修飾によって製造されるトレシル化MPEGを利用する。タンパク質とトレシル化MPEGとの反応時、ポリエチレングリコールは、タンパク質のアミン基に直接結合される。したがって、本発明は、本発明のタンパク質を、2,2,2-トリフルオロスルホニル基を有するポリエチレングリコール分子と反応させることによって製造された、タンパク質-ポリエチレングリコール抱合体を含む。

【0069】

ポリエチレングリコールは、多数の種々の介入リンカーを使用してタンパク質に結合す

ることもできる。例えば、参照によって全開示が本明細書に組み込まれる米国特許第5,612,460号は、ポリエチレングリコールをタンパク質と結合するためのウレタンリンカーを開示する。ポリエチレングリコールがリンカーによってタンパク質に結合されるタンパク質ポリエチレングリコール抱合体は、タンパク質と、MPEG-スクシンイミジルスクシネート、1,1'-カルボニルジイミダゾールによって活性化されたMPEG、MPEG-2,4,5-トリクロロペニルカルボネート、MPEG-p-ニトロフェノールカルボネート及び種々のMPEG-スクシネート誘導体などの化合物との反応によっても製造することができる。多数の追加的なポリエチレングリコール誘導体及びポリエチレングリコールをタンパク質に結合するための反応化学については、全開示が参照によって本明細書に組み込まれる国際公開第WO98/32466号に記載されている。本明細書に開示される反応化学を使用して製造されたPeg化タンパク質生成物は、本発明の範囲内に含まれる。

【0070】

また、本発明の修飾凝固因子と結合するポリエチレングリコール部分の数（すなわち、置換度）は変動し得る。例えば、本発明のPeg化タンパク質は、平均上、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、17、20またはより多くのポリエチレングリコール分子に連結し得る。同様に、タンパク質分子あたり1~3、2~4、3~5、4~6、5~7、6~8、7~9、8~10、9~11、10~12、11~13、12~14、13~15、14~16、15~17、16~18、17~19または18~20のポリエチレングリコール部分などの範囲内の平均置換度。置換度を決定するための方法は、例えば、Delgado et al., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Sys. 9: 249-304 (1992)に記載されている。

【0071】

本発明のポリペプチドは、限定されないが、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水的相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィーを含む標準方法によって、化学合成及び組換細胞培養物から回収及び精製することができる。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）が精製のために使用される。タンパク質リフォールディングのためのよく知られている技術は、ポリペプチドが単離及び/または精製の間に変性される場合、活性配置を再生させるために使用されてもよい。

【0072】

本発明の修飾凝固因子複合体の存在及び量は、当該技術において周知のイムノアッセイであるELISAを使用して決定されてよい。本発明の修飾分子を検出/定量化するため有用であろう1つのELISAプロトコルにおいて、抗ヒト血清アルブミン抗体によるELISAプレートのコーティング、非特異的結合を防ぐためのプレートのブロッキング、ELISAプレートの洗浄、（1つまたはそれ以上の異なる濃度で）本発明の分子を含有する溶液の添加、（本明細書に記載されるか、当該技術において周知の）検出可能なラベルに結合した第2の非治療タンパク質特異的抗体の添加、及び第2の抗体の存在の検出を含む。このプロトコルの代わりのバージョンにおいて、ELISAプレートは、抗治療タンパク質特異的抗体でコーティングされてもよく、かつラベル化された第2の試薬は、抗ヒトアルブミンスーパーファミリー特異的抗体であってもよい。

【0073】

ポリペプチド及びポリヌクレオチドフラグメント及び変異体

本発明は、さらに、本明細書に記載の凝固因子複合体のフラグメント、ならびに修飾凝固因子、修飾分子または融合タンパク質などの凝固因子複合体の個々の成分のフラグメントに関する。これらの修飾は、活性または半減期を増加させるように分子を修飾させる、本明細書に開示されたもの、または分子の性質を強化するか、もしくは他の理由でそれを望ましくさせる他の修飾を含むことができる。

【0074】

1つまたはそれ以上のアミノ酸の欠失が、1つまたはそれ以上の機能の修飾または損失をもたらすとしても、複合体の凝固機能はなお維持され得る。したがって、本明細書に開示される分子のフラグメントには、全長タンパク質、ならびに参照ポリペプチドのアミノ酸配列から1つまたはそれ以上の残基が欠失されたポリペプチドが含まれ、本明細書において考察される。

【0075】

本出願は、本明細書に明示される参照ポリペプチド配列（例えば、凝固因子、修飾分子または融合タンパク質）またはそのフラグメントに対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるポリペプチドを含有するタンパク質に関する。

【0076】

「変異体（Variant）」とは、参照核酸またはポリペプチドとは異なるが、その基本的な特性を維持するポリヌクレオチドまたは核酸を意味する。一般に、変異体は、全体的に非常に類似しており、そして、多くの領域において、参照核酸またはポリペプチドとまったく同一である。

【0077】

本明細書で使用される場合、「変異体」は、タンパク質の既知の配列とは配列が異なるが、本明細書の他に記載されるか、または当該技術において既知の少なくとも1つのその機能及び／または治療特性（例えば、治療活性及び／または生物学活性、凝固を含むが、それに限定されない）を維持する、本明細書に開示されたタンパク質を意味する。一般に、変異体は、全体的に極めて類似しており、そして、多くの領域において、目的のタンパク質またはアルブミンスーパーファミリータンパク質のアミノ酸配列と同一である。

【0078】

本発明は、例えば、凝固因子自体、融合タンパク質または修飾分子のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含むか、あるいは代わりに、それからなるタンパク質にも関する。これらのポリペプチドのフラグメントも提供される（例えば、本明細書に記載されたフラグメント）。本発明によって包含されるさらなるポリペプチドは、厳しいハイブリッド化条件下（例えば、約45で6倍の塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）中で結合DNAをフィルターし、それに続いて、約50～65で0.2倍のSSC、0.1%SDSで1回またはそれ以上洗浄するためのハイブリッド化）、非常に厳しい条件下（例えば、約45で6倍の塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）中で結合DNAをフィルターし、それに続いて、約68で0.1倍のSSC、0.2%SDSで1回またはそれ以上洗浄するためのハイブリッド化）、または当業者に既知の他の厳しいハイブリッド化条件下で本発明のアミノ酸配列をコード化する核酸分子の補体にハイブリッド化する、ポリヌクレオチドによってコード化されたポリペプチドである（例えば、Ausubel, F. M. et al., eds., 1989 Current protocol in Molecular Biology, Green publishing associates, Inc., 及びJohn Wiley & Sons Inc., New York, 6.3.1-6.3.6及び2.10.3頁を参照のこと）。これらのポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドも本発明によって含まれる。

【0079】

少なくとも、本発明の問題のアミノ酸配列と、例えば、95%「同一の」アミノ酸配列を有するポリペプチドによって、対象ポリペプチド配列が、問い合わせアミノ酸配列の100アミノ酸あたり5までのアミノ酸変換を含み得ることを除き、対象ポリペプチドのアミノ酸配列が、問い合わせ配列と同一であることが意図される。換言すれば、問い合わせアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、対象配列中のアミノ酸残基の5%までが挿入、欠失、または別のアミノ酸によって置換されていてもよい。参照配列のこれらの変化は、参照アミノ酸配列のアミノもしくはカル

ボキシ末端位において生じてもよく、またはこれらの末端位の間で、参照配列の残基の間で個々に分散して、もしくは参照配列内の1つまたはそれ以上の隣接する基において生じてもよい。

【0080】

実際的な問題として、いずれかの特定のポリペプチドが、例えば、凝固因子またはフレグメントのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%は98%または99%同一であるかどうかは、既知のコンピュータプログラムを使用して慣習的に決定することができる。問い合わせ配列（本発明の配列）及び対象配列の間の最も全体的適合を決定するための好ましい方法は、グローバル配列アライメントとも呼ばれ、Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. 6: 237-245 (1990))のアルゴリズムに基づき、FASTDBコンピュータプログラムを使用して決定することができる。配列アライメントにおいて、問い合わせ及び対象配列は、両方ともヌクレオチド配列またはアミノ酸配列である。上記グローバル配列アライメントの結果は、パーセント同一性として表される。FASTDBアミノ酸アライメントで使用される好ましいパラメーターは、以下の通りである：Matrix = PAM 0, k-tuple = 2, Mismatch Penalty = 1, Joining Penalty = 20, Randomization Group Length = 0, Cutoff Score = 1, Window Size = sequence length, Gap Penalty = 5, Gap Size Penalty = 0.05, Window Size = 500またはより短い対象アミノ酸配列の長さ。

【0081】

本発明のポリヌクレオチド変異体は、コード領域、非翻訳領域または両方において改変を含有し得る。サイレント置換、付加または欠失を生じるが、コード化されたポリペプチドの特性または活性を変更しない改変を含有するポリヌクレオチド変異体が特に好ましい。遺伝コードの縮重によるサイレント置換によって生じたヌクレオチド変異体が好ましい。さらに、50未満、40未満、30未満、20未満、10未満、または5～50、5～25、5～10、1～5もしくは1～2のアミノ酸が、いずれかの組合せで置換、欠失または付加されるポリペプチド変異体も好ましい。ポリヌクレオチド変異体は、様々な理由で、例えば、特定のホストのためにコドン発現を最適化する（ヒトmRNAのコドンを、酵母またはE. coliなどの細菌ホストに好ましいものに変更する）ために、製造することができる。

【0082】

自然発生型変異体は「対立遺伝子変異体」と呼ばれ、そして生体の染色体上の所与の位置を占める遺伝子のいくつかの代わりの形態の1つを示す（Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)）。これらの対立遺伝子変異体は、ポリヌクレオチド及び/またはポリペプチドレベルで変化することが可能であり、かつ本発明に含まれる。代わりに、非自然発生型変異体は、突然変異誘発技術によって、または直接的合成によって製造されてもよい。

【0083】

タンパク質エンジニアリング及び組換DNA技術の周知の方法を使用して、本発明のポリペプチドの特徴を改善するか、または変更するために、変異体が調製されてもよい。例えば、1つまたはそれ以上のアミノ酸が、生物学的機能の実質的な損失を伴わずに、本発明のポリペプチドのN末端またはC末端から欠失することが可能である。例として、Ron et al. (J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993))は、3、8または27のアミノ末端アミノ酸残基が欠失した後でさえも、ヘパリン結合活性を有する変異体KGFタンパク質を報告した。同様に、このタンパク質のカルボキシ末端から8～10のアミノ酸残基が欠失した後、インターフェロンガンマは、10倍まで高い活性を示した。（Dobeli et al., J. Biotechnology 7: 199-216 (1988) . . . ）

【0084】

したがって、本発明は、機能的活性（例えば、生物学的活性及び／または治療的活性）を有するポリペプチド変異体をさらに含む。非常に好ましい実施形態において、本発明は、長期半減期などの機能的活性の増加を可能にする修飾を凝固因子に提供する。

【0085】

凝固因子注入を必要とする疾患を有する対象の治療方法であって、本明細書において開示された凝固因子複合体を対象に投与することを含む方法も開示される。疾患は、例えば、血友病であることが可能である。対象への凝固因子複合体の投与によって、凝固因子のみの投与時に得られた血中濃度半減期より長い、凝固因子複合体の血中濃度半減期をもたらすことができる。凝固因子複合体は、注射、吸入、鼻腔内または経口によって対象に投与することができる。

【0086】

本発明の修飾凝固因子複合体またはその配合物は、非経口（例えば、皮下または筋肉内）注射または静脈内注入を含む、いずれかの従来法によって投与されてよい。治療は、単一投与、またはある期間にわたっての複数回投与からなってもよい。

【0087】

本明細書に開示された凝固因子複合体は、1つまたはそれ以上の許容可能なキャリアと一緒に、医薬配合物として存在することが可能である。キャリア（複数可）は、凝固因子複合体と適合可能であり、かつその受容体にとって有害ではないという意味で、「許容可能」でなければならない。

【0088】

配合物は、単位剤形で都合よく提供されてもよく、かつ薬学技術において周知のいずれかの方法によって調製され得る。そのような方法には、1つまたはそれ以上の付属要素を構成するキャリアと凝固因子複合体を会合させるステップが含まれる。一般に、配合物は、活性成分を液体キャリアまたは微粉碎固体キャリアまたは両方と均一かつ密接に会合させ、次いで、必要であれば、製品を形成することによって調製される。

【0089】

キット

凝固因子複合体を含むキットも本明細書に開示される。本発明の配合物または組成物は、凝固因子複合体の延長された貯蔵寿命を示す取扱説明書もしくは添付文書と一緒に包装されてもよいか、またはそれと一緒にキット内に含まれてもよい。例えば、そのような取扱説明書または添付文書は、本発明の凝固因子複合体の延長されたか、または長期の貯蔵寿命を考慮に入れて、時間、温度及び光などの推薦される貯蔵条件を記載してもよい。そのような取扱説明書または添付文書は、管理された病院、クリニックまたはオフィス条件の以外の現場での使用を必要し得る配合物の貯蔵の容易さなどの本発明の凝固因子複合体の特定の利点も記載してもよい。上記のように、本発明の配合物は水性形態であってもよく、かつ治療活性の有意な損失を伴わずに、理想的な状況とはほど遠い状況下で貯蔵してもよい。

【0090】

治療方法

本発明の凝固因子複合体及び／またはポリヌクレオチドは、単独で、または他の治療剤との組合せで投与されてもよい。それらは、本発明の他の凝固因子複合体及び／またはポリヌクレオチドとの組合せで投与されてもよい。組合せは、同時に、例えば、混合物として、別個ではあるが、同時に；または連続的に投与されてよい。これには、組み合わせられた薬剤が一緒に治療混合物として投与されるプレゼンテーション、組み合わせられた薬剤が、別個ではあるが、同時に、例えば、別個の静脈路を通して同一個人に投与される手順が含まれる。「組合せの」投与は、最初に与えられ、第2が続く、1種の化合物または薬剤をさらに含む。

【0091】

特定の態様において、本発明の方法で使用される凝固因子複合体は、緩衝剤、糖及び／または糖アルコール（限定されないが、トレハロース及びマンニトールを含む）、（グリ

シンなどの)安定剤、ならびに(Polysorbate 80などの)界面活性剤を含有する配合物中に含まれることが可能である。さらなる実施形態において、配合物は、ナトリウム、ヒスチジン、カルシウム及びグルタチオンをさらに含み得る。

【0092】

一態様において、凝固因子複合体を含む配合物は、投与前に凍結乾燥される。凍結乾燥は、当該技術において共通の技術を使用して実行され、かつ開発された組成物のために最適化されるべきである(Tang et al., Pharm Res. 21: 1911-200, (2004)及びChang et al., Pharm Res. 13: 243-9 (1996))。

【0093】

医薬配合物を調製する方法は、次のステップの1つまたはそれ以上を含むことができる:凍結乾燥の前に、上記混合物に、本明細書に記載の安定剤を添加すること、凍結乾燥の前に、上記混合物に、本明細書に記載のバルキング剤、オスモル濃度調節剤、界面活性剤から選択される少なくとも1種の薬剤を添加すること。凍結乾燥された配合物は、一態様において、1種またはそれ以上の緩衝剤、バルキング剤及び安定剤から少なくとも構成される。本態様において、凍結乾燥ステップの間または再構成の間に凝集が問題となる場合、界面活性剤の有益性は評価され、かつ選択される。凍結乾燥の間にpHの安定域内に配合物を維持するために、適切な緩衝剤が含まれる。

【0094】

凍結乾燥された材料の標準的な再構成の実施は、(典型的に凍結乾燥の間に除去された体積と等しい)純水または殺菌注射用蒸留水(WFI)の体積を戻して添加することであるが、抗菌剤の希薄溶液が、非経口投与のため医薬品製造において使用されることもある(Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18: 1311-1354 (1992))。

【0095】

凍結乾燥された材料は、水溶液として再構成されてもよい。種々の水性キャリア、例えば、殺菌注射用蒸留水、複数回投与使用のための防腐剤を含む水または適切な量の界面活性剤を含む水(例えば、水性懸濁液の製造に適切な賦形剤との混合物で活性化合物を含有する水性懸濁液)。種々の態様において、そのような賦形剤は、懸濁剤、例えば、限定されないが、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、ガムトラガカント及びアカシアガムであり:分散または湿潤剤は、天然由来ホスファチド、例えば、限定されないが、レシチン、酸化アルキレンと脂肪酸との縮合生成物、例えば、限定されないが、ポリオキシエチレンステアレート、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物、例えば、限定されないが、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、またはエチレンオキシドと、脂肪酸及びヘキシトールから誘導された部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート、またはエチレンオキシドと、脂肪酸及びヘキシトール無水物から誘導された部分エステルとの縮合生成物、例えば、限定されないが、ポリエチレンソルビタンモノオレエートである。種々の態様において、水性懸濁液は、1種またはそれ以上の防腐剤、例えば、限定されないが、エチルまたはn-プロピル、p-ヒドロキシベンゾエートも含有する。

【0096】

特定の実施形態において、本発明の組成物は、シリングまたは他の貯蔵容器を使用する投与のための液体配合物である。さらなる実施形態において、これらの液体配合物は、水溶液として再構成された、本明細書に記載の凍結乾燥された材料から製造される。さらなる態様において、本発明の組成物は、1種またはそれ以上の薬学的に許容されるキャリアをさらに含む。「薬学的」または「薬理学的に」許容されるという句は、下記の当該技術において周知の経路を使用して投与される場合、安定し、会合及び開裂生成物などのタンパク質分解を抑制し、加えて、アレルギー性または他の不利な反応を生じない分子実体及び組成物を示す。「薬学的に許容されるキャリア」は、上記で開示される薬剤を含めて、

いずれか、及び全ての臨床的に有用な溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌及び抗真菌剤、等張及び吸収遅延剤などを含む。

【0097】

凝固因子複合体の単一または複数回投与は、治療する医師によって選択される服用レベル及びパターンで実行される。疾患の予防または治療に関して、適切な用量は、治療される疾患の種類、疾患の重症度及び経過、薬剤が予防または治療目的で投与されるかどうか、以前の治療、患者の病歴及び薬剤への応答ならびに担当医の裁量次第である。

【0098】

さらなる実施形態において、そして上記のいずれかによって、血友病Aなどの凝固疾患の治療には、凝固因子複合体単独で、または別の薬剤との組合せでの初期治療、それに続く、凝固因子複合体及び／または別の薬剤の1回またはそれ以上の繰返し投与が含まれてよい。初期及びその後の繰返し投与の特性は、一部、治療される疾患次第であろう。

【0099】

さらなる態様において、凝固因子複合体は、0.5IU/kg～200IU/kgの範囲の用量で対象に投与されることが可能である。いくつかの実施形態において、凝固因子複合体は、1～190、5～180、10～170、15～160、20～450、25～140、30～130、35～120、40～110、45～100、50～90、55～80または60～70IU/kgの範囲の用量で投与される。さらなる実施形態において、そして上記のいずれかに従って、凝固因子複合体は、約1IU/kg～約150IU/kgの用量で対象に投与することが可能である。なおさらなる実施形態において、凝固因子複合体は、1.5IU/kg～150IU/kg、2IU/kg～50IU/kg、5IU/kg～40IU/kg、10IU/kg～20IU/kg、10IU/kg～100IU/kg、25IU/kg～75IU/kg及び40IU/kg～75IU/kgの用量で投与される。なおさらなる実施形態において、凝固因子複合体は、2、5、7.5、10、15、20、25、30、35、40、45または50IU/kgで投与される。認識されるであろうように、そしてさらに本明細書に議論されるように、凝固因子複合体の適切な用量は、適切な用量応答データと関連して、血中濃度用量を決定するための確立されたアッセイの使用によって確認されてもよい。

【0100】

特定の例において、本発明の複合体は、血友病Aを治療するために、筋肉内に注入または投与することが可能である。凝固因子複合体の組成物は、本明細書に記載の通り医薬品配合物中に含まれることが可能である。そのような配合物は、経口的に、局所的に、経皮的に、非経口的に、吸入スプレーによって、経腔的に、直腸的に、または頭蓋内注射によって投与することができる。非経口的という用語は、本明細書で使用される場合、皮下注射、静脈内、筋肉内、囊内注射、または注入技術を含む。静脈内、皮内、筋肉内、乳房内、腹腔内、くも膜下腔内、眼球後、肺内注射による投与、及び／または特定の部位における外科的埋め込みも考慮される。一般に、組成物は、本質的にバイロジエン、ならびに受容体に有害である他の不純物を含まない。

【0101】

一態様において、本発明の配合物は、最初のボーラスと、それに続いて、製剤の治療循環レベルを維持するための連続的注入によって投与される。別の例として、本発明の化合物は、一回限りの投与として投与される。当業者は、良好な医療行為及び個々の患者の臨床条件によって決定される有効用量及び投与レジメンを容易に最適化するであろう。投与の経路は、限定されないが、静脈内、腹腔内、皮下または筋肉内投与であることが可能である。投与の頻度は、薬剤の薬物動態剤パラメーター及び投与経路次第である。最適な医薬配合物は、投与経路及び所望の用量次第で、当業者によって決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042 pages 1435-1712を参照のこと。上記文献の開示は、参照によって、全体として、全ての目的に関して、特に、配合、投与経路及び医薬品の容量に関する

全ての教示に関して、本明細書に組み込まれる。そのような配合物は、投与された薬剤の物理的状態、安定性、生体内放出レート、及び生体内クリアランスレートに影響を与える。投与の経路次第で、適切な用量は、体重、体表面積または臓器サイズによって計算される。適切な用量は、適切な用量応答データと関連して、血中濃度用量を決定するための確立されたアッセイの使用によって確認されてもよい。最終投与レジメンは、担当医によって、薬剤の作用を変性する種々の要因、例えば、薬剤の比活性、ダメージの重度及び患者の応答性、年齢、状態、体重、性別及び患者の食事、いずれの感染症の重症度、投与時間及び他の臨床的要因を考慮して決定される。例として、本発明の凝固因子複合体の典型的な用量は、約 500 μg / kg と等しい、約 50 IU / kg である。研究が実行されると、種々の疾患及び状態に対する治療の適切な服用レベル及び期間に関して、さらなる情報が生じるであろう。

【0102】

いくつかの実施形態において、凝固因子複合体は、対象に単独で投与される。いくつかの実施形態において、凝固因子複合体は、1種またはそれ以上の他の凝固因子との組合せで対象に投与される。

【0103】

さらなる実施形態において、凝固因子複合体は、1日に1回以下で対象に投与される。さらなる実施形態において、凝固因子複合体は、隔日に1回以下、3日に1回以下、4日に1回以下、5日に1回以下、1週に1回以下、2週に1回以下、1月に1回以下で対象に投与される。さらなる実施形態において、凝固因子複合体は、1日に2回以下で対象に投与される。

【0104】

本発明が一般的に説明されたが、同様に、実例として提供されて、そして限定するよう意図されない以下の実施例を参照することによって、容易に理解されるであろう。

【0105】

さらなる説明をしなくても、当業者は、前記及び以下の説明のための実施例を使用して、本発明で認識された変更を実施及び利用することが可能であり、かつ主張された方法を実施することができると考えられる。したがって、次の実施例は、特に、本発明の好ましい実施形態を指摘しており、そしていずれかの様式で本開示の残りの部分を限定するものとして解釈されないべきである。

【実施例】

【0106】

凝固因子の修飾 - FVIIII 及び FVIIIfa は、両方とも、血友病 A の治療におけるそれらの役割のため、十分に研究され、かつ修飾された分子である。いくつかの方法及びタンパク質上の部位が、修飾のために利用可能である。Wakabayashi, et al. (Wakabayashi, Koszelak, Mastri, & Fay, 2001) は、Cys310 及び Cys692 においてアクリロダン及びフルオレセインで FVIIII を修飾して、そして FVIIII 活性の 2 つの異なるアッセイにおいて、これが FVIIII の活性に対する影響を有さなかったことを示した。精製された FVIIII は、水性緩衝液中、マレイミド化合物と室温で 1 時間または 4 度で一晩反応することができる。マレイミドは遊離システインと特異的に反応して、そしてタンパク質標識実験のために広く使用される。標識化タンパク質は、次いで、記載される通り、イオン交換によって単離されてよい (Wakabayashi & Fay, 2013)。

【0107】

FVIIII または FVIIIfa を修飾する別の方法は、所望の分子を、それぞれのタンパク質を修飾する炭水化物鎖に結合させることである (Stennicke et al., 2013)。いずれかの分子を修飾させる第 3 の方法は、所望のアミノ酸標的を、タンパク質のいずれかの末端に結合させることである (Pasut & Veronese, 2012)。

【0108】

アルブミンは、ビリルビン、インドメタシン、イブプロフェンなどを含む多種多様な小分子を結合することが知られている (Peters, 1995)。これらのリガンドの大部分の結合は、pHに依存せず、したがって、マレイミド-ポリエチレンスペーサーの端部で脂肪酸部分と置き換えができる。

【0109】

アルブミン融合タンパク質の構成 - ヒトvWFのD'D3フラグメントまたはTFの可溶性形態のスクレオチド配列は、Genbankから入手することができる。プラスミドは、コード配列及び適切な長さのアミノ酸リンカーを含んで構成される。これらの配列は、構成がキャップ部位からC3A、ヒト肝細胞株のヒトアルブミン遺伝子へのスクレオチド111における相で挿入することができるよう、ヒトアルブミン遺伝子からの適切なDNAによって両側を挟むことができる (Kelly & Sussman, 2000)。記載の通り、これは、Cas/CRISPRを使用して達成することができる (Ran et al., 2013)。さらに、適切な配列を含有するプラスミドを新規合成することが可能である。

【0110】

アルブミン融合タンパク質の精製 - 融合タンパク質は、ヒト血清アルブミンへのモノクローナル抗体によって抱合されたアガロースビーズを使用して、C3A細胞化アブ上清液から回収できる。次いで、融合タンパク質は、ヒト血清アルブミンで溶出し、そしてサイズ選択クロマトグラフィーによって分離することができる。

【0111】

修飾凝固因子複合体の形成 - 溶融タンパク質を、修飾FVIIの限界濃度で、一晩、4でインキュベーションし、次いで、サイズ選択クロマトグラフィーを使用して精製することができる。同様に、TF-アルブミン融合を、誘導FVIIaの限界濃度で、一晩、4でインキュベーションし、次いで、サイズ選択クロマトグラフィーを使用して精製することができる。

【0112】

生体内及び生体外特性決定 - 記載の通り、治療複合体の活性、薬物動態及び薬力薬理学の生体内及び生体外特性決定を実行することができる (Mei et al., 2010; Yee et al., 2014)。他に定義されない限り、本明細書で使用された全ての技術的及び科学的用語は、開示された発明が属する技術の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に引用された刊行物及びそれらが引用した材料は、特に参照によって組み込まれる。

【0113】

当業者は、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するか、またはルーチンな実験以上のものを使用することなく、確認することができるであろう。そのような等価物は、以下の請求項によって包括されるように意図される。

【0114】

材料及び方法

精製された、B欠失組換型因子VII (FVII)は、Ray Biotech (Norcross, GA)から購入された。FVII活性は、Diapharma (West Chester Township, OH)から入手したCoamatic FVIIアッセイを使用して分析された。FVII ELISAは、Affinity Biologicals (Ancaster, ON, CA)から入手された。他の抗体及びELISAキットは、Abcam (Cambridge, MA)から入手された。脂肪酸含有マレイミド-PEG誘導体は、Creative PEGworks (Chapel Hill, NC)によって合成された。他のマレイミド-PEG誘導体は、Nanocs (New York, NY)またはClick Chemistry Tools (Scottsdale, AZ)から入手された。細胞培養、分子生物学及び一般試薬は、Life Technologies (Carlsbad, CA)またはSigma-Aldrich (St. Louis, MO)から入手された。カラムクロマトグラフィー供給

材料及び装置は、GE Life Sciences (Pittsburgh, PA) から入手された。

【0115】

CM110 及び CM210 の合成 - 合成遺伝子 CM110 及び CM210 の発現プラスミドは、Gene Art division of Life Technologies によって合成された。タンパク質は、5 % 定義子ウシ血清を含有する媒体中、PEI 対 DNA の 6 / 1 比を使用して、C3A 細胞のポリエチレンイミン (PEI) ベース移入によって製造された。24 時間後、媒体を、Glutamax 含有する無血清 DMEM に変更した。媒体を変更し、そして 4 日間毎日回収した。上清媒体を 1 ml His TRAP カラム上に通し、20 mM リン酸カリウム、pH 7.4、0.5 M NaCl 及び 30 mM イミダゾールを含有する緩衝液の 10 倍カラム体積で洗浄した。300 mM イミダゾールを含有する同一緩衝液を用いて、タンパク質をカラムから溶出させた。タンパク質含有フラクションをプールし、そして濃縮し、次いで、ゲルfiltrationカラムを通過させることによって、20 mM HEPES、pH 7.4、150 mM NaCl、4 mM CaCl₂、0.01% Tween 20 を含有する緩衝液に変更した。次いで、タンパク質溶液を、10 × 300 mm Superdex 200 Increase カラムに適用し、Akta Pure クロマトグラフィー装置において、同一緩衝液中、0.5 ml / 分で実行した。タンパク質含有フラクションをプールし、そして濃縮した。

【0116】

FVIIIf または CM210 の修飾 - 因子VIIIf は、一般構造マレイミド - PEGn-X (式中、X は、ビオチン、フルオレセインイソチオシアネート、ラウレート、ミリステート、トランスシクロオクテンまたはメチルテトラジンである) の種々の分子によって修飾された。因子VIIIf は、20 mM HEPES、pH 7.4、150 mM NaCl 及び 4 mM CaCl₂、0.01% Tween 20 を含有する緩衝液中に溶解し、次いで、10 μM マレイミド - PEG - X 試薬と一緒に 1 時間、室温でインキュベーションした。より小さい PEG 化合物に関して、ゲルfiltrationカラム上、または 1000 ダルトンより大きい PEG 試薬に関して、Superdex 200 Increase 上に通過させることによって、過剰量の試薬を除去した。CM110 または CM210 は、同一条件を使用して、mal - PEG - TCO によって誘導体化された。

【0117】

複合体形成 - FVIIIf / CM110 または CM210 複合体は、20 mM HEPES、pH 7.4、150 mM NaCl 及び 4 mM CaCl₂ を含有する緩衝液中、室温で 1 時間、修飾 FVIIIf を 10 倍過剰量の CM110 または CM210 と一緒にインキュベーションすることによって形成された。複合体は、0.5 ml / 分において同一緩衝液中、Superdex 200 Increase または Superose 6 Increase のいずれか上でのクロマトグラフィーによって精製された。

【0118】

共有結合複合体形成のために、マレイミド - PEG4 - Me テトラジンによって修飾された FVIIIf を、20 mM HEPES、pH 7.4、150 mM NaCl 及び 4 mM CaCl₂ を含有する緩衝液中、4 ℃ で一晩、マレイミド - PEG3 - TCO 修飾 CM110 または CM210 の 10 倍過剰量と一緒にインキュベーションした。Superose 6 Increase 上を通過させることによって、複合体を単離した。

【0119】

本出願が提供する発明の例として以下の発明が挙げられる。

(1) a. 凝固因子；

b. アルブミンまたはアルブミンフラグメントに融合した第 1 のタンパク質を含む融合タンパク質；及び

c. 前記融合タンパク質による結合を可能にし、それによって、修飾凝固因子が調製されるように、前記凝固因子に結合する修飾分子；を含み、前記修飾凝固因子及び前記融合タンパク質が、少なくとも 2 つの独立した部位において相互作用する、凝固因子複合体。

- (2) 前記修飾凝固因子の少なくとも1つの結合部位が、自然発生的な結合部位である、上記(1)に記載の凝固因子複合体。
- (3) 前記融合タンパク質の少なくとも1つの結合部位が、前記修飾分子によって提供される、上記(1)または(2)に記載の凝固因子複合体。
- (4) 前記凝固因子が、因子VIIIaである、上記(1)～(3)のいずれか一項に記載の凝固因子複合体。
- (5) 前記修飾凝固因子が、修飾因子VIIIaである、上記(1)～(3)のいずれか一項に記載の凝固因子複合体。
- (6) 前記融合タンパク質の前記第1のタンパク質が、フォンウィルブランド因子のフラグメントである、上記(1)～(5)のいずれか一項に記載の凝固因子複合体。
- (7) 前記フォンウィルブランド因子のフラグメントが、D'D3フラグメントである、上記(6)に記載の凝固因子複合体。
- (8) 前記融合タンパク質の前記第1のタンパク質が、組織因子(TF)である、上記(6)に記載の凝固因子複合体。
- (9) 前記修飾凝固因子及び前記融合タンパク質が、非共有結合を形成する、上記(1)～(8)のいずれか一項に記載の凝固因子複合体。
- (10) 前記修飾凝固因子及び融合タンパク質が、共有結合的に相互作用する、上記(1)～(8)のいずれか一項に記載の凝固因子複合体。
- (11) 前記共有結合がペプチド結合ではない、上記(10)に記載の凝固因子複合体。
- (12) 前記共有結合が核酸の翻訳によって製造されたペプチド結合ではない、上記(10)に記載の凝固因子複合体。
- (13) 前記修飾分子が、脂肪酸を含む、上記(1)～(12)のいずれか一項に記載の凝固因子複合体。
- (14) 前記修飾分子が、クリックケミストリーによって製造される、上記(1)～(13)のいずれか一項に記載の凝固因子複合体。
- (15) 前記凝固因子が、クリックケミストリーによって前記融合タンパク質に結合する、上記(1)～(14)のいずれか一項に記載の凝固因子複合体。
- (16) 前記修飾分子が、ポリエチレングリコール鎖を通して前記凝固因子に結合される、上記(1)～(15)のいずれか一項に記載の凝固因子複合体。
- (17) 前記ポリエチレングリコール鎖が、前記凝固因子上のマレイミドに連結する、上記(16)に記載の凝固因子複合体。
- (18) 前記ポリエチレングリコール鎖が、Xがメチルテトラジンであるマレイミド-PEG_N-Xを含む構造を有するマレイミドに連結する、上記(17)に記載の凝固因子複合体。
- (19) 前記融合タンパク質の前記第1のタンパク質が、リンカーによってアルブミンと一緒に結合する、上記(1)～(18)のいずれか一項に記載の凝固因子複合体。
- (20) 前記凝固因子が、修飾アミノ酸を含む、上記(1)～(19)のいずれか一項に記載の凝固因子複合体。
- (21) 前記融合タンパク質が、修飾アミノ酸を含む、上記(1)～(20)のいずれか一項に記載の凝固因子複合体。
- (22) 前記凝固因子複合体の半減期が、凝固因子単独と比較して少なくとも20%大きい、上記(1)～(21)のいずれか一項に記載の凝固因子複合体。
- (23) 上記(1)～(22)のいずれか一項に記載の組成物を含む、キット。
- (24) 上記(1)に記載の凝固因子複合体を対象に投与することを含む、凝固因子注入を必要とする疾患有する対象を治療する方法。
- (25) 前記対象への前記凝固因子複合体の投与が、前記凝固因子単独の投与時に得られた血中濃度半減期より大きい前記凝固因子複合体の血中濃度半減期をもたらす、上記(24)に記載の方法。
- (26) 前記凝固因子複合体が、注射、吸入、鼻腔内または経口で前記対象に投与される、上記(24)または(25)に記載の方法。

(27) 前記疾患が血友病である、上記(24)～(26)のいずれか一項に記載の方法。

参考文献

- Andersen, J. T., Pehrson, R., Tolmachev, V., Daba, M. B., Abrahmsen, L., & Ekblad, C. (2011). Extending half-life by indirect targeting of the neonatal Fc receptor (FcRn) using a minimal albumin binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(7), 5234-5241. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/286/7/5234.full.pdf+html>
- Bradbury, A. R. M., Sidhu, S., Dubel, S., & McCafferty, J. (2011). Beyond natural antibodies: the power of *in vitro* display technologies. *Nature Publishing Group*, 29(3), 245-254. <http://doi.org/10.1038/nbt.1791>
- Buyue, Y., Liu, T., Kulman, J. D., Toby, G. G., Kamphaus, G. D., Patarroyo-White, S., et al. (2014). A Single Chain Variant of Factor VII Fc Fusion Protein Retains Normal *In Vivo* Efficacy but Exhibits Altered *In Vitro* Activity. *PLoS ONE*, 9(11), e113600. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0113600>
- Ginn, C., Khalili, H., Lever, R., & Broccolini, S. (2014). PEGylation and its impact on the design of new protein-based medicines. *Future Medicinal Chemistry*, 6(16), 1829-1846. <http://doi.org/10.4155/fmc.14.125>
- Hoots, W. K. (2003). Comprehensive care for hemophilia and related inherited bleeding disorders: why it matters. *Current Hematology Reports*, 2(5), 395-401.
- Horisawa, K. (2014). Specific and quantitative labeling of biomolecules using clinical chemistry. *Frontiers in Physiology* 5, 457.
- Kelly, J. H., & Sussman, N. L. (2000). A Fluorescent Cell-Based Assay for Cytochrome P-450 Isozyme 1 A2 Induction and Inhibition. *Journal of Biomolecular Screening*, 5(4), 249-253. <http://doi.org/10.1177/108705710000500407>
- Kempton, C. L., & Meeks, S. L. (2014). Toward optimal therapy for inhibitors in hemophilia. *Hematology/the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology Education Program*, 2014(1), 364-371. <http://doi.org/10.1182/asheducation-2014.1.364>

Kramer, R. H., & Karpen, J. W. (1998). Spanning binding sites on allosteric proteins with polymer-linked ligand dimers. *Nature*, 395 (6703), 710-713. <http://doi.org/10.1038/27227>

Lawson, J. H., Butenas, S., Ribarik, N., & Mann, K. G. (1993). Complex-dependent inhibition of factor VIIa by antithrombin III and heparin. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (2), 767-770.

Lenting, P. J., Christophe, O. D., & Denis, C. V. (2015). von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood*, 125 (13), 2019-2028. <http://doi.org/10.1182/blood-2014-06-528406>

Mannucci, P. M., & Mancuso, M. E. (2014). Fusion technology and recombinant FVIII and FIX in the management of the hemophiliacs. *Drug Design, Development and Therapy*, 365. <http://doi.org/10.2147/DDDT.S47312>

Mei, B., Pan, C., Jiang, H., Tjandra, H., Strauss, J., Chen, Y., et al. (2010). Rational design of a fully active, long-acting PEGylated factor VIII for hemophilia A treatment. *Blood*, 116 (2), 270-279. <http://doi.org/10.1182/blood-2009-11-254755>

Oldenburg, J., & Albert, T. (2014). Novel products for haemostasis-current status. *Haemophilia*, 20, 23-28. <http://doi.org/10.1111/hae.12428>

Orlova, N. A., Kovnir, S. V., Vorobiev, I. I., Gabibov, A. G., & Vorobiev, A. I. (2013). Blood Clotting Factor VIII: From Evolution to Therapy. *Acta Naturae*, 5 (2), 19-39.

Pasut, G., & Veronese, F. M. (2012). State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research. *Journal of Controlled Release*, 161 (2), 461-472.

Peters, T., Jr. (1995). All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications.

Philips, J.-C., & Scheen, A. (2006). Insulin detemir in the treatment of type 1 and type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, 2 (3), 277-283.

Pipe, S. W. (2010). Hemophilia: new protein therapeutics. *Hematology/the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Educa

- tion Program, 2010, 203-209. <http://doi.org/10.1182/asheducation-2010.1.203>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., et al. (2013). Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell*, 1-15. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>
- Schulte, S. (2008). Use of albumin fusion technology to prolong the half-life of recombinant factor VIIa. *Thrombosis Research*, 122 (S4), S14-S19. [http://doi.org/10.1016/S0049-3848\(08\)70029-X](http://doi.org/10.1016/S0049-3848(08)70029-X)
- Smith, S. A., Travers, R. J., & Morrissey, J. H. (2015). How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1-11. <http://doi.org/10.3109/10409238.2015.1050550>
- Srivastava, A., Brewer, A. K., Mauser-Bunschoten, E. P., Key, N. S., Kitchen, S., Llinas, A., et al. (2012). Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*, 19 (1), e1-e47. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x>
- Stennicke, H. R., Kjalkke, M., Karpf, D. M., Baling, K. W., Johansen, P. B., Elm, T., et al. (2013). A novel B-domain O-glycopeGylated FVII (N8-GP) demonstrates full efficacy and prolonged effect in hemophilic mice models. *Blood*, 121 (11), 2108-2116. <http://doi.org/10.1182/blood-2012-01-407494>
- Vadivel, K., & Bajaj, S. P. (2012). Structural biology of factor VIIa/tissue factor initiated coagulation. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, 17, 2476-2494.
- van der Flier, A., Liu, Z., Tan, S., Chen, K., Drager, D., Liu, T., et al. (2015). FcRN Rescues Recombinant Factor VIII Fc Fusion Protein from a VWF Independent FVIII Clearance Pathway in Mouse Hepatocytes. *PLoS ONE*, 10 (4), e0124930-23. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0124930>
- Wakabayashi, H., & Fay, P. J. (2013). Molecular orientation of Factor VIIa on the phospholipid membrane surface determined by fluorescence resonance energy transfer. *The Biochemical Journal*, 452 (2), 293-301. <http://doi.org/10.1042/BJ20130025>

Wakabayashi, H., Koszelak, M. E., Mastri, M., & Fay, P. J. (2001). Metal Ion-independent Association of Factor VIII Subunits and the Roles of Calcium and Copper Ions for Cofactor Activity and Inter-Subunit Affinity. *Biochemistry*, 40(34), 10293-10300. <http://doi.org/10.1021/bi010353q>

Yee, A., Gildersleeve, R. D., Gu, S., Kreetz, C. A., McGee, B. M., Carr, K. M., et al. (2014). A von Willebrand factor fragment containing the D'D3 domains is sufficient to stabilize coagulation factor VIII in mice. *Blood*, 124(3), 445-452. <http://doi.org/10.1182/blood-2013-11-540534>

Zhou, H.-X. (2006). Quantitative Relation between Intermolecular and Intramolecular Binding of Pro-Rich Peptides to SH3 Domains. *Biophysical Journal*, 91(9), 3170-3181. <http://doi.org/10.1529/biophysj.106.090258>