(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7319187号
(P7319187)

(45)発行日　令和5年8月1日(2023.8.1)

(24)登録日　令和5年7月24日(2023.7.24)

(51)国際特許分類		FI		
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	19/00	ZNA
C07K 14/745 (2006.01)		C07K	14/745	
C12P 21/02 (2006.01)		C12P	21/02	C
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z
C07K 14/59 (2006.01)		C07K	14/59	

請求項の数　17　（全112頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-501670(P2019-501670)
(86)(22)出願日　平成29年7月11日(2017.7.11)
(65)公表番号　特表2019-530637(P2019-530637A)
(43)公表日　令和1年10月24日(2019.10.24)
(86)国際出願番号　PCT/IL2017/050784
(87)国際公開番号　WO2018/011799
(87)国際公開日　平成30年1月18日(2018.1.18)
審査請求日　令和2年7月6日(2020.7.6)
(31)優先権主張番号　62/360,767
(32)優先日　平成28年7月11日(2016.7.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　508233526
オプコ バイオロジクス リミテッド
イスラエル国キルヤト ガト８２１１８　０４・アシュレガン ストリート １６
(74)代理人　110001379
弁理士法人大島特許事務所
(72)発明者　ハーショービッツ、オーレン
イスラエル国エム．ピー． シクミム７　９８２０００・ピー．オー．ビー． ２１５・キブツ レバディム
(72)発明者　モスクコビッチ、ラウラ
イスラエル国ギヴァト シュムエル ５４　０１８４４・シレニ ６
審査官　福澤 洋光

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　長時間作用型凝固因子ＶＩＩおよびその製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト活性第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドであって、

前記ＦＶＩＩａのＣ末端に直列に結合した３個のＣＴＰ分子を含み、

前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドは、実質的に純粋な活性型であり、

前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドは、

ａ．少なくとも１５ｍｏｌ／ｍｏｌからなる高シアル酸含量；

ｂ．少なくとも１０ｍｏｌ／ｍｏｌのＯ－グリカン含量を含む高グリコシル化型、

ｃ．５％未満の酸化型からなる前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａの低酸化型；

ｄ．高い比率のカルボキシル化グルタミン酸残基；

ｅ．少なくとも６０％の荷電Ｎ－グリカン；および

ｆ．少なくとも１０，５００Ｕ／ｍｇの効力を含み、

前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは、配列番号７で示されるアミノ酸配列からなる、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａ。

【請求項２】

前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａのアミノ酸配列は、配列番号７のシステイン残基１３５とシステイン残基２６２との間のジスルフィド（Ｓ－Ｓ）架橋を含むジスルフィド結合二本鎖ヘテロダイマーの構造として存在し、前記二本鎖は、配列番号７のアミノ酸１～１５２を含む軽鎖およびアミノ酸１５３～４９０を含む重鎖を含む、請求項１に記載のＣＴＰ修飾

ＦＶＩＩａ。
【請求項３】
ａ．前記高い比率のカルボキシル化グルタミン酸（Ｇｌａ）残基が、少なくとも９０％のＧｌａ残基からなる、
ｂ．前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａが、荷電Ｎ－グリカンを、８５．３％および８４．２％からなる群から選択される比率で含み、
ｃ．前記効力が、１５，５６３Ｕ／ｍｇ、１６，７２０Ｕ／ｍｇ、２２，４７８Ｕ／ｍｇおよび２３，６０８Ｕ／ｍｇからなる群から選択される、
ｄ．前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａが、ＣＴＰ当たり、少なくとも４つのＯ結合型グリコシル化部位のグリコシル化を含む、
または、これらの任意の組み合わせを含む、
請求項１または２に記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａ。
【請求項４】
ａ．前記実質的に純粋な活性型が、少なくとも６０％の前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａの高グリコシル化型を含む、
ｂ．前記実質的に純粋な活性型の純度パーセンテージが、９７．３％、９７．６％、９７．４％および９７．０％からなる群から選択される、
または、これらの任意の組み合わせを含む、
請求項１～３のいずれか１項に記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａ。
【請求項５】
ヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト活性第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドの製造方法であって、
前記ポリペプチドが、ＦＶＩＩのＣ末端に直列に結合した３個のＣＴＰ分子を含み、
前記方法が、
（Ｉ）所定の数の細胞にＣＴＰ修飾ＦＶＩＩをコードするコード部分を含む発現ベクターを安定に遺伝子導入するステップであって、
（ＩＩ）前記遺伝子導入された細胞が、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを発現および分泌する、該ステップ；
（ＩＩＩ）前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを過剰発現する細胞クローンを取得するステップ；
（ＩＶ）溶液中で前記クローンを所定の規模まで増殖するステップ；
（Ｖ）前記クローンを含有する前記溶液をハーベストするステップ；
（ＶＩ）前記クローンを含む前記溶液を濾過し、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを含む清澄化ハーベスト溶液を得るステップ；および
（ＶＩＩ）前記清澄化ハーベスト溶液からＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを精製および活性化して、目的の濃度のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａを有する精製されたタンパク質溶液を得て、それによりＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａを製造するステップを含み；
前記製造されたＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａが、
ａ．５％未満の酸化型からなる前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａの低酸化型；
ｂ．高い比率のカルボキシル化グルタミン酸残基；
ｃ．９０％のグルタミン酸（Ｇｌａ）残基からなる、少なくとも６０％の荷電Ｎ－グリカン；または
ｄ．少なくとも１０，５００Ｕ／ｍｇの効力；
の内の少なくとも１つを含み、
前記製造されたＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａのアミノ酸配列は、配列番号７で示される、方法。
【請求項６】
前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドの純度が、少なくとも９０％であるか、または、９７．３％、９７．６％、９７．４％および９７．０％からなる群から選択される、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
ａ．前記増殖するステップが、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを最適に発現および分泌するワ

ーキングセルバンク（ＷＣＢ）から得たクローンを増殖することを含むか、または、
前記増殖するステップが、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを最適に発現および分泌するマスターセルバンク（ＭＣＢ）から得たクローンを増殖することを含む、
ｂ．前記製造方法が、動物不含プロセスである、
ｃ．前記クローンが、少なくとも４０ｍｇ／Ｌのレベルで ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを発現および分泌する、
ｄ．前記クローンが、一連の継代培養ステップにより、生産バイオリアクターのレベルまで溶液中で増殖される、
ｅ．ウィルス除去が、約２２のウィルス対数減少係数（ＬＲＦ）を示す、
または、これらの任意の組み合わせを含む、
請求項５または６に記載の方法。
【請求項８】
前記バイオリアクターが、使い捨て型のバイオリアクターまたはステンレス鋼バイオリアクターを含むか、または、
前記バイオリアクターが、流加バッチ方式バイオリアクターとして運転される、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記清澄化ハーベストの前記精製が、
前記清澄化ハーベスト溶液に、アフィニティカラム、マルチモデルまたは混合モードカラム、疎水性相互作用カラム、およびアニオン交換カラムを通過させるカラム通過ステップ；および
前記清澄化ハーベスト中または前記カラム通過ステップのいずれか後に収集した溶出液中、またはこれらの任意の組み合わせ中に存在するウィルスを不活化するステップであって、ウィルスの不活化が、前記ウィルスに対し毒性の溶液中でのインキュベーションもしくはナノ濾過、またはこれらの任意の組み合わせを含む、該ステップ；を含むステップを、上記の順に実施することを含み、
アニオン交換の溶出液は、限外濾過／透析濾過ステップに供され、
それにより、精製されたＣＴＰ修飾ＦＶＩＩに到達する、請求項５～８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
ウィルス除去が、約２２のウィルス対数減少係数（ＬＲＦ）を示す、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
ａ．前記製造されたＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａが、高度グリコシル化されている、
ｂ．前記製造されたＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａが、高Ｏ－グリカン含量を含む、
または、これらの任意の組み合わせを含む、
請求項５～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
前記製造されたＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａのグリコシル化パターンが、ＣＴＰ当たり、少なくとも４つのＯ結合型グリコシル化部位のグリコシル化を含む、請求項５～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
ａ．前記製造されたＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａが、高度にシアル化されている、
ｂ．前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａが、少なくとも１５ｍｏｌ／ｍｏｌからなるシアル酸含量を含む、
ｃ．前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａが、少なくとも１０ｍｏｌ／ｍｏｌからなるＯ－グリカン含量を含む、
ｄ．前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａの低い比率の酸化型が、５％未満の酸化型からなる、
ｅ．前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａの高い比率のカルボキシル化グルタミン酸残基（Ｇｌａ）が、少なくとも９０％のＧｌａからなる、

ｆ．前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａが、荷電Ｎ－グリカンを、８５．３％および８４．２％からなる群から選択される比率で含み、
ｇ．前記効力が、１５，５６３Ｕ／ｍｇ、１６，７２０Ｕ／ｍｇ、２２，４７８Ｕ／ｍｇおよび２３，６０８Ｕ／ｍｇからなる群から選択される、
ｈ．前記方法が、高度グリコシル化ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａの少なくとも２０％の回収率を達成する、
ｉ．前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドの回収率が、９７．３、９７．６、９７．４および９７．０％からなる群から選択される、
または、これらの任意の組み合わせを含む、
請求項５～１２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１４】
前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａの少なくとも６０％が、カルボキシル化グルタミン酸残基（Ｇｌａ）の高グリコシル化型を含む、請求項５～１３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１５】
前記製造されたＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａのアミノ酸配列が、配列番号７のシステイン残基１３５とシステイン残基２６２との間のジスルフィド（Ｓ－Ｓ）架橋を含むジスルフィド結合二本鎖ヘテロダイマーの構造として存在し、
前記二本鎖が、配列番号７のアミノ酸１～１５２を含む軽鎖およびアミノ酸１５３～４９０を含む重鎖を含む、請求項５～１４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１６】
ヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト活性第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドであって、
前記ＦＶＩＩのＣ末端に直列に結合した３個のＣＴＰ分子を含み、
請求項５～１５のいずれか１項に記載の方法により製造される、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチド。

【請求項１７】
請求項１～４のいずれか１項に記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａと、薬学的に許容可能なキャリアとを含む、組成物。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
凝固因子のカルボキシ末端に結合した絨毛性ゴナドトロピンのカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）を少なくとも１個含むポリペプチドおよびこれをコードするポリヌクレオチドが開示される。本開示のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを含む医薬組成物および医薬製剤、ならびにこれを使用する方法およびこれを製造する方法も開示される。

【背景技術】
【０００２】
凝固因子補充療法の開発によって、多くの血友病患者の生活が変貌した。血友病は、凝血または血液凝固を制御する身体能力を損なう、遺伝性障害群である。血友病患者では、有効な血液凝固に必要である第ＶＩＩＩ因子または第ＩＸ因子のタンパク質が十分な量産生されない。重篤な血友病患者では、わずかな損傷でさえ、数日間または数週間にわたって続く失血を生じ、完全に治癒することはなく、関節および他の臓器の消耗性の永続的な損傷および早死に繋がる可能性がある。

【０００３】
血友病は、凝固カスケードにおける重要な因子の欠損、または非存在により引き起こされる遺伝性のＸ染色体連鎖出血性障害である。血友病患者では、トロンビン生成およびフィブリン塊形成が大きく損なわれ、最も一般的には、関節および内部臓器での、自然発生的出血症状、および手術または外傷中および手術または外傷後に過度の出血に至る。血友病患者における高頻度の出血はまた、関節腫脹、関節損傷、極度の奇形、頻発する感染症、および可動性の低下の原因となる可能性がある（メイヨークリニック）。血友病Ａは第

ＶＩＩＩ因子発現の欠陥または欠損により引き起こされ、血友病Ｂは第ＩＸ因子発現の欠陥または欠損により引き起こされる。

【０００４】

血友病Ｂは、ＦＩＸのプロコアグラント活性の欠損をもたらす。血友病Ｂの患者は、自然発生的な軟組織出血および再発性関節血症を有し、これが手足を不自由にする関節症につながる場合が多い。これらの患者のための現在の治療としては、組み換えＦＩＸの静脈内投与が挙げられる。しかし、ＦＩＸの費用および循環からの比較的急速な除去の問題により、長時間作用型ＦＩＸの開発は難易度の高い課題となっている。市販されているＦＶＩＩＩおよびＦＩＸは、致命的な出血症状に対する制御の改善に繋がっている。多くの患者が予防的治療を受け、それにより、出血およびそれに伴う合併症の危険性が低減している。しかし、かなりの割合（１０～３０％）の患者で、体外から投与されたＦＶＩＩＩおよびＦＩＸに対して阻害性の抗体が発生する。迂回性の生成物である、ＦＶＩＩａの投与は、恒常性を誘導し、阻害性の抗体を有する患者に対し効果的治療を提供し得る。

【０００５】

組み換えＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標））が市販されており、阻害物質を伴う血友病患者における出血症状の治療用として、１９９６年に承認された。しかし、ｒＦＶＩＩａは、２．５時間という終末半減期で急速に排出される。結果として、患者は一般に、軽度から中度の出血の後に、十分な恒常性を達成するために、複数回の高頻度の注入（２～３時間の間隔に２～３用量の投与）を必要とする。このために、単回投与後に止血活性の期間を延長し、かなり低い投与頻度を可能にする長時間作用型のＦＶＩＩａの開発に関し大きな関心が持たれている。長時間作用型ＦＶＩＩａはまた、長期の予防的治療の実現性を高めるであろう。

【０００６】

ＦＶＩＩａの半減期を延長させるための種々の技術が開発されている。しかし、このタンパク質の生物学的活性を保存し、この改変により影響を与える免疫原性を誘導しないことを保証すると同時に、このタンパク質の半減期の延長を達成する必要性が残されている。本発明は、ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）をＦＶＩＩａと結合させて、半減期および生物活性を延長するようにＦＶＩＩａを修飾することにより、この必要性に対処する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

一態様では、ヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）ポリペプチドを製造する方法が開示され、前記ポリペプチドは、ＦＶＩＩのＣ末端に直列に結合した３個のＣＴＰ分子を含み、該方法は、所定の数の細胞に前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩをコードするコード部分を含む発現ベクターを安定に遺伝子導入し、前記遺伝子導入細胞が前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを発現し、分泌するステップ；前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを過剰発現する細胞クローンを得るステップ；溶液中で前記クローンを所定の規模に増殖するステップ；前記クローンを含む前記溶液をハーベストするステップ；前記クローンを含む前記溶液を濾過して、清澄化ハーベスト溶液を得るステップ；および前記清澄化ハーベスト溶液から前記ポリペプチドを精製し、目的の濃度のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを有する精製タンパク質溶液を得て、それによりＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを製造するステップを含み、製造したＣＴＰ修飾ＦＶＩＩのアミノ酸配列は配列番号７で示される。

【０００８】

別の態様では、ヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト活性第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドを製造する方法が開示され、前記ポリペプチドは、ＦＶＩＩのＣ末端に直列に結合した３個のＣＴＰ分子を含み、該方法は、所定の数の細胞にＣＴＰ修飾ＦＶＩＩをコードするコード部分を含む発現ベクターを安定に遺伝子導入し、前記遺伝子導入細胞が前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを発現し、分泌するステップ；前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを過剰発現する細胞クローンを得るステップ；溶液中で前記クロ

ーンを所定の規模に増殖するステップ；前記クローンを含む前記溶液をハーベストするステップ；前記クローンを含む前記溶液を濾過して、清澄化ハーベスト溶液を得るステップ；および前記清澄化ハーベスト溶液から前記ポリペプチドを精製および活性化し、目的の濃度のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａを有する精製タンパク質溶液を得て、それによりＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａを製造するステップを含み、製造したＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａのアミノ酸配列は配列番号７で示される。

【０００９】

別の態様では、Ｃ末端に直列に結合した３個のＣＴＰ分子を含むヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）ポリペプチドが開示され、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、所定の数の細胞に前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩをコードするコード部分を含む発現ベクターを安定に遺伝子導入し、前記遺伝子導入細胞が前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを発現し、分泌するステップ；前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを過剰発現する細胞クローンを得るステップ；溶液中で前記クローンを所定の規模に増殖するステップ；前記クローンを含む前記溶液をハーベストするステップ；前記クローンを含む前記溶液を濾過して、清澄化ハーベスト溶液を得るステップ；および前記清澄化ハーベスト溶液から前記ポリペプチドを精製し、目的の濃度のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを有する精製タンパク質溶液を得るステップを含む方法により製造され、前記製造したＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、配列番号７で示されるアミノ酸配列を含む。

【００１０】

別の態様では、Ｃ末端に直列に結合した３個のＣＴＰ分子を含むヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト活性化第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドが開示され、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは、所定の数の細胞に前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩをコードするコード部分を含む発現ベクターを安定に遺伝子導入し、前記遺伝子導入細胞が前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを発現し、分泌するステップ；前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを過剰発現する細胞クローンを得るステップ；溶液中で前記クローンを所定の規模に増殖するステップ；前記クローンを含む前記溶液をハーベストするステップ；前記クローンを含む前記溶液を濾過して、清澄化ハーベスト溶液を得るステップ；および前記清澄化ハーベスト溶液から前記ポリペプチドを精製および活性化して、目的の濃度のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａを有する精製タンパク質溶液を得るステップを含む方法により製造され、前記製造したＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは、配列番号７で示されるアミノ酸配列を含む。

【００１１】

関連する態様では、製造したヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）ポリペプチドは高度にグリコシル化されている。別の関連する態様では、製造したＣＴＰ修飾ＦＶＩＩのグリコシル化パターンは、ＣＴＰ当たり、少なくとも４つのＯ結合型グリコシル化部位のグリコシル化を含む。別の関連する態様では、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、高比率の荷電Ｎ－グリカンを含む。別の関連する態様では、製造したヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）ポリペプチドは高度にシアル化されている。

【００１２】

関連する態様では、製造したヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）ポリペプチドは、高比率のカルボキシル化グルタミン酸残基を含む。

【００１３】

関連する態様では、クローンの増殖は、ワーキングセルバンク（ＷＣＢ）から、またはマスターセルバンク（ＭＣＢ）から得たクローンを増殖することを含む。別の関連する態様では、前記クローンは、少なくとも６００ｍｇ／Ｌのレベルでの修飾ＦＶＩＩを発現し、分泌する。別の関連する態様では、前記クローンは、一連の継代培養ステップにより、生産バイオリアクターのレベルまで溶液中で増殖される。別の関連する態様では、バイオリアクターには、使い捨て型のバイオリアクターまたはステンレス鋼バイオリアクターが含まれる。別の関連する態様では、前記バイオリアクターは、流加バッチ方式バイオ

リアクターとして運転される。

【００１４】

関連する態様では、少なくとも６０％の前記清澄化ハーベスト由来の精製ヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）ポリペプチドは、高グリコシル化型のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを含む。関連する態様では、少なくとも６０％の前記清澄化ハーベスト由来の精製ヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）ポリペプチドは、高比率のカルボキシル化グルタミン酸残基を含む。

【００１５】

関連する態様では、精製は、前記清澄化ハーベストに、アフィニティカラム、マルチモデル（ｍｕｌｔｉｍｏｄｅｌ）または混合モードカラム、疎水性相互作用カラム、およびアニオン交換カラムを通過させるステップ；カラムクロマトグラフィー後の清澄化ハーベスト中または溶出液収集物中に存在するウィルスの不活化ステップ、またはこれらの任意の組み合わせを順次実施することを含み、ウィルスの不活化は、前記ウィルスに毒性の溶液中でのインキュベーションもしくはナノ濾過、またはこれらの任意の組み合わせを含み、陰イオン交換溶出液は、限外濾過／透析濾過ステップに供される。

【００１６】

関連する態様では、製造した（ＣＴＰ）修飾ヒト第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）ポリペプチドは活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチド（ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチド）を含む。

【００１７】

関連する態様では、製造方法は、高度グリコシル化ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩの少なくとも２０％の回収率を達成する。

【００１８】

別の態様では、組成物は、製造したＣＴＰ修飾ＦＶＩＩおよび薬学的に許容可能なキャリアを含む。

【００１９】

別の態様では、Ｃ末端に直列に結合した３個のＣＴＰ分子を含むヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト活性第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドが本明細書で開示され、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドは、実質的に純粋な活性型であり、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドは、（ａ）高シアル酸含量；（ｂ）低酸化型；（ｃ）高グリコシル化型；（ｄ）高い比率のカルボキシル化グルタミン酸残基；（ｅ）高い比率の荷電Ｎ－グリカン；および（ｆ）高い効力；またはこれらの任意の組み合わせを有し、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは、配列番号７に示すアミノ酸配列を含む。

【００２０】

関連する態様では、高シアル酸含量は、少なくとも１５ｍｏｌ／ｍｏｌからなる。別の関連する態様では、高グリコシル化型は、少なくとも１０ｍｏｌ／ｍｏｌのＯ－グリカン含量を含む。別の関連する態様では、実質的に純粋な活性型は、少なくとも６０％の前記活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａの高グリコシル化型を含む。別の関連する態様では、少なくとも６０％の実質的に純粋なＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａ型は、高い比率のカルボキシル化グルタミン酸（Ｇｌａ）残基を含む。別の関連する態様では、高い比率のカルボキシル化グルタミン酸（Ｇｌａ）残基は、少なくとも９０％のＧｌａ残基からなる。別の関連する態様では、低い比率の酸化型は、５％未満からなる。別の関連する態様では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも９０％である。さらに関連する態様では、純度パーセンテージは、９７．３％、９７．６％、９７．４％および９７．０％からなる群から選択される。別の関連する態様では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの効力は、少なくとも１０，５００Ｕ／ｍｇである。さらに関連する態様では、効力は、１５，５６３Ｕ／ｍｇ、１６，７２０Ｕ／ｍｇ、２２，４７８Ｕ／ｍｇおよび２３，６０８Ｕ／ｍｇからなる群から選択される。

【００２１】

別の態様では、（ａ）高シアル酸含量；（ｂ）低酸化型；（ｃ）高グリコシル化型；（ｄ）高い比率のカルボキシル化グルタミン酸残基；（ｅ）高い比率の荷電Ｎ－グリカン；および（ｆ）高い効力；またはこれらの任意の組み合わせを含むＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａおよび薬学的に許容可能なキャリアを含む組成物が本明細書で開示され、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは、配列番号７に示すアミノ酸配列を含む。

【００２２】

他の特徴および利点は、以下の詳細な説明、実施例および図面から明らかになるであろう。しかし、詳細な説明および特定の実施例は、本開示の好ましい実施形態を示してはいるが、この詳細な説明から、本開示の趣旨および範囲内での様々な変更および修正が当業者には明らかであり、したがって、これらは実例として与えられているにすぎないことを理解されたい。

【００２３】

特許または特許出願ファイルは、少なくとも１つのカラー図面を含む。このカラー図面（単一または複数）を含む特許または特許出願公開公報のコピーは、要求があれば、有料で米国特許商標局より提供される。

【図面の簡単な説明】

【００２４】

【図１】ｐＣＩ－ｄｈｆｒ－ＭＯＤ－５０１４プラスミドのマップを示す。

【図２Ａ】ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$精製プロセスの概略図を示す。バッチ３１は、ＰＫ／ＰＤ試験のために作製した。

【図２Ｂ】ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$精製プロセスの概略図を示す。バッチ３８は、生存試験のために作製した。

【図３Ａ】最終のＦＶＩＩおよびＦＶＩＩａのＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロットを示す。１０μｇ（バッチ３１）または５μｇ（バッチ３８）を、クマシー染色したＳＤＳ－ＰＡＧＥの各レーンにロードした。１．ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$ポリペプチド、２．重鎖（３ｘＣＴＰを含む）、３．軽鎖。３個全ての抗体が、ＦＶＩＩを検出する。

【図３Ｂ】最終のＦＶＩＩおよびＦＶＩＩａのＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロットを示す。１０μｇ（バッチ３１）または５μｇ（バッチ３８）を、クマシー染色したＳＤＳ－ＰＡＧＥの各レーンにロードした。１．ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$ポリペプチド、２．重鎖（３ｘＣＴＰを含む）、３．軽鎖。

【図３Ｃ】最終のＦＶＩＩおよびＦＶＩＩａのＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロットを示す。１０μｇ（バッチ３１）または５μｇ（バッチ３８）を、クマシー染色したＳＤＳ－ＰＡＧＥの各レーンにロードした。１．ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$ポリペプチド、２．重鎖（３ｘＣＴＰを含む）、３．軽鎖。

【図３Ｄ】最終のＦＶＩＩおよびＦＶＩＩａのＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロットを示す。１０μｇ（バッチ３１）または５μｇ（バッチ３８）を、クマシー染色したＳＤＳ－ＰＡＧＥの各レーンにロードした。１．ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$ポリペプチド、２．重鎖（３ｘＣＴＰを含む）、３．軽鎖。

【図３Ｅ】最終のＦＶＩＩおよびＦＶＩＩａのＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロットを示す。１０μｇ（バッチ３１）または５μｇ（バッチ３８）を、クマシー染色したＳＤＳ－ＰＡＧＥの各レーンにロードした。１．ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$ポリペプチド、２．重鎖（３ｘＣＴＰを含む）、３．軽鎖。

【図３Ｆ】最終のＦＶＩＩおよびＦＶＩＩａのＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロットを示す。１μｇのタンパク質を、ウエスタンブロットの各々のレーンにロードした。１．ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$ポリペプチド、２．重鎖（３ｘＣＴＰを含む）、３．軽鎖。３個全ての抗体が、ＦＶＩＩを検出する。ＦＶＩＩａ軽鎖は、α－ＦＶＩＩを用いて検出される。

【図３Ｇ】最終のＦＶＩＩおよびＦＶＩＩａのＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロットを示す。１μｇのタンパク質を、ウエスタンブロットの各々のレーンにロードした。１．ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$ポリペプチド、２．重鎖（３ｘＣＴＰを含む）、３．軽鎖。３個全ての抗体が、ＦＶＩＩを検出する。ＦＶＩＩａ重鎖は、α－ＣＴＰにより検出された。

【図３Ｈ】最終のＦＶＩＩおよびＦＶＩＩａのＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロットを示す。１μｇのタンパク質を、ウエスタンブロットの各々のレーンにロードした。１．ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$ポリペプチド、２．重鎖（３ｘＣＴＰを含む）、３．軽鎖。３個全ての抗体が、ＦＶＩＩを検出する。ＦＶＩＩａ重鎖は、α－Ｇｌａにより検出された。

【図４】ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$の発色活性が、セラミックヒドロキシアパタイト（ＨＡ）カラムでの精製の結果として増強されたことを示す。市販の発色活性試験キットであるＢＩＯＰＨＥＮ（Ｈｙｐｈｅｎ　ＢｉｏＭｅｄ　２２１３０４）を用いて、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$ハーベスト、工程中の画分および精製ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$の、ヒト正常プール血漿に対するインビトロ効力の比較評価を実施した。ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$ハーベストおよびタンパク質を系列希釈し、用量反応曲線を正常ヒト血漿の基準調製物に対し比較することにより、その効力を評価した。

【図５】ＦＶＩＩＩ欠損マウスにおける、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$の、ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）に対比したＰＫプロファイルを示す。ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$は、ＦＶＩＩ選択、ＨＡ精製プロセスおよび活性化後に生成された。ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$またはＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）を、単回の静脈内注射で、ＦＶＩＩＩ－／－血友病マウスに投与した。血液試料は、投与の０．０８３、０．５、２、８、２４、４８、および７２時間後に眼窩後部より採取した。クエン酸処理血漿（０．３８％）を、サンプリング直後に調製して、－２０℃で分析時まで保存し、ＰＫプロファイルを、ＳＴＡＣＬＯＴ市販のキットを用いてＦＶＩＩａ凝固活性に基づいて確証した。

【図６Ａ】ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$が、ＦＶＩＩ選択、ＨＡ精製プロセスおよび活性化後に生成されたことを示す。ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$またはＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）を、単回の静脈内注射で、ＦＶＩＩＩ－／－血友病マウスに投与した。血液試料は、投与の０．０８３、０．５、２、８、２４、４８、および７２時間後に眼窩後部より採取した。クエン酸処理血漿（０．３８％）をサンプリング直後に調製して、－２０℃で分析時まで保存した。トロンビン生成パラメーターを、ＰＫ実験の間に評価し、ピークに対する最大量を含むパラメーターを評価した。

【図６Ｂ】ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$が、ＦＶＩＩ選択、ＨＡ精製プロセスおよび活性化後に生成されたことを示す。ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$またはＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）を、単回の静脈内注射で、ＦＶＩＩＩ－／－血友病マウスに投与した。血液試料は、投与の０．０８３、０．５、２、８、２４、４８、および７２時間後に眼窩後部より採取した。クエン酸処理血漿（０．３８％）をサンプリング直後に調製して、－２０℃で分析時まで保存した。トロンビン生成パラメーターは、ＰＫ実験の間に評価し、時点に対するトロンビンの量を含むパラメーターを評価した。

【図６Ｃ】ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$が、ＦＶＩＩ選択、ＨＡ精製プロセスおよび活性化後に生成されたことを示す。ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$またはＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）を、単回の静脈内注射で、ＦＶＩＩＩ－／－血友病マウスに投与した。血液試料は、投与の０．０８３、０．５、２、８、２４、４８、および７２時間後に眼窩後部より採取した。クエン酸処理血漿（０．３８％）をサンプリング直後に調製して、－２０℃で分析時まで保存した。トロンビン生成パラメーターは、ＰＫ実験の間に評価し、トロンビン生成速度を含むパラメーターを評価した。

【図７Ａ】尾静脈切断（ＴＶＴ）後の血友病マウス生存曲線を示す。ＴＶＴは、投与１５分後に行った。マウス生存は、ＴＶＴ後２４時間にわたり観察し、最初の１２時間の間１時間ごとに、および２４時間後に記録した。対照群データ（ビークル）は、実験あたり５匹のマウスによる３つの実験の合計である。

【図７Ｂ】尾静脈切断（ＴＶＴ）後の血友病マウス生存曲線を示す。ＴＶＴは、投与２４時間後に行った。マウス生存は、ＴＶＴ後２４時間にわたり観察し、最初の１２時間の間１時間ごとに、および２４時間後に記録した。対照群データ（ビークル）は、実験あたり５匹のマウスによる３つの実験の合計である。

【図７Ｃ】尾静脈切断（ＴＶＴ）後の血友病マウス生存曲線を示す。ＴＶＴは、投与４８時間後に行った。マウス生存は、ＴＶＴ後２４時間にわたり観察し、最初の１２時間の間

１時間ごとに、および２４時間後に記録した。対照群データ（ビークル）は、実験あたり５匹のマウスによる３つの実験の合計である。
【図７Ｄ】ＴＶＴの２４時間後に記録したマウス生存をまとめたものである。
【図８】ＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ）とＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子（ＭＯＤ－５０１４）との間の基質（Ｐｅｆａｃｈｒｏｍｅ　ＦＶＩＩａ）切断活性の比較を示す。
【図９】組織因子に結合した場合の、ＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ）とＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子（ＭＯＤ－５０１４）との間の基質（Ｐｅｆａｃｈｒｏｍｅ　ＦＶＩＩａ）活性の比較を示す。
【図１０】第ＶＩＩａ因子の濃度に対する、ＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ）またはＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａ（ＭＯＤ－５０１４）による活性化第Ｘ因子の生成の比較を示す。
【図１１】第Ｘ因子の濃度に対する、ＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ）またはＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａ（ＭＯＤ－５０１４）による活性化第Ｘ因子の生成の比較を示す。
【図１２】組織因子の非存在下での、脂質濃度に対する、ＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ）またはＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａ（ＭＯＤ－５０１４）による活性化第Ｘ因子の生成速度の比較を示す（図１２Ａ）。組織因子の非存在下での、脂質濃度に対する、ＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ）またはＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａ（ＭＯＤ－５０１４）による活性化第Ｘ因子の生成の比較を示す（図１２Ｂ）。
【図１３】組織因子の非存在下での、第Ｘ因子濃度に対する、ＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ）とＭＯＤ－５０１４との間の活性化第Ｘ因子の生成の比較を示す。
【図１４】ポリブレンを考慮して、ＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ）およびＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子（ＭＯＤ－５０１４）による基質（Ｐｅｆａｃｈｒｏｍｅ　ＦＶＩＩａ）切断の阻害の比較を示す。
【図１５】ＴＦＰＩ濃度に対して（図１５Ａ）、およびＦＶＩＩａのＴＦＰＩ暴露期間に対して（図１５Ｂ）、ＭＯＤ－５０１４のＴＦＰＩ暴露期間に対して（図１５Ｃ）、ＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ）およびＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ（ＭＯＤ－５０１４）による基質（Ｐｅｆａｃｈｒｏｍｅ　ＦＸａ）切断の阻害の比較を示す。
【図１６】ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$の上流プロセスフロー製造チャートを示す。
【図１７】ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$の精製プロセスのフローチャートを示す。
【図１８】精製されたＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$の還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果を示す。
【図１９】合計Ｎ－グリカン中の荷電Ｎ－グリカンの比率は、精製プロセス中一定であり、初期の荷電Ｎ－グリカンの比率は、上流細胞培養プロセスから生じていることを示す。
【図２０】酸化型およびその他の関連型の含量は、精製プロセスを通して減少することを示す。マルチモデルおよびＨＩＣカラムは、酸化型および関連型の減少に最も大きく影響する精製ステップである。
【図２１】マルチモデルカラムによる非γ－カルボキシル化タンパク質の除去を示す。ＣＨＴカラムは非γ－カルボキシル化タンパク質を除去することにより、γ－カルボキシル化画分を濃縮する。
【図２２】全ての精製プロセスのシアル酸の含量を示す。シアル酸含量は、精製プロセス中一定であり、初期のシアル酸含量は、上流細胞培養プロセスから生じている。
【発明を実施するための形態】
【００２５】
一実施形態では、ヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）ポリペプチドを製造する方法が開示され、前記ＦＶＩＩは、そのＣ末端に直列に結合した３個のＣＴＰ分子を含み、該方法は、所定の数の細胞に前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩをコードするコード部分を含む発現ベクターを安定に遺伝子導入し、前記遺伝子導入細胞が前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを発現し、分泌するステップ；前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを過剰発現する細胞クローンを得るステップ；溶液中で前記クローンを所定の規模に増殖するステップ；前記クローンを含む前記溶液をハーベストするステップ；前記クローンを含む前記溶液を濾過して、清澄化ハーベスト溶液を得るステップ；および前

記清澄化ハーベスト溶液を精製し、目的の濃度のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを有する精製タンパク質溶液を得るステップ；それによりＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを製造するステップを含み、製造したＣＴＰ修飾ＦＶＩＩのアミノ酸配列は配列番号７で示される。

【００２６】

一実施形態では、Ｃ末端に直列に結合した３個のＣＴＰ分子を含むヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）が開示され、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、所定の数の細胞に前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩをコードするコード部分を含む発現ベクターを安定に遺伝子導入し、前記遺伝子導入細胞が前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを発現し、分泌するステップ；前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを過剰発現する細胞クローンを得るステップ；溶液中で前記クローンを所定の規模に増殖するステップ；前記クローンを含む前記溶液をハーベストするステップ；前記クローンを含む前記溶液を濾過して、清澄化ハーベスト溶液を得るステップ；および前記清澄化ハーベスト溶液を精製し、目的の濃度のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを有する精製タンパク質溶液を得るステップを含む方法により製造され、前記製造したＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、配列番号７で示されるアミノ酸配列を含む。

【００２７】

一実施形態では、Ｃ末端に直列に結合した３個のＣＴＰ分子を含むヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）を含む組成物が開示される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、活性化ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ（ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａ）を含む。

【００２８】

ヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾第ＶＩＩ因子ポリペプチド

【００２９】

凝固第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）は、不活性プロ酵素（チモーゲン）として血流中に肝細胞により分泌される４４４アミノ酸の糖タンパク質（５０ＫＤａ）である。組織損傷時および循環血液への暴露時に、ＦＶＩＩは、ＦＶＩＩに対する真のレセプタータンパク質であり、血管壁の深部層に局在する種々の細胞により発現される、組織因子（ＴＦ）との複合体を形成する。このＦＶＩＩ－ＴＦ複合体の形成は、ＦＶＩＩの活性化をもたらす。活性化されたＦＶＩＩ（ＦＶＩＩａ）は、第ＩＸ因子および第Ｘ因子を活性化することによって、外因性の凝固経路を開始する。

【００３０】

ＦＶＩＩは、凝固系と関連するビタミンＫ依存性糖タンパク質の群に属する。ＦＶＩＩは、Ｎ末端プロペプチドを有する前駆体、続いて成熟アミノ酸配列として合成される。このプロペプチドは、グルタミン酸残基（Ｇｌｕ）をγ－カルボキシグルタミン酸残基（Ｇｌａ）へ変換するガンマカルボキシラーゼに対するドッキング部位を含む。カルボキシグルタミン酸（Ｇｌａ）は、グルタミン酸残基の翻訳後カルボキシル化によりタンパク質中に導入される非共通アミノ酸である。この修飾により、カルシウムイオンに対する親和性が導入されるが、ＦＶＩＩ因子を含む凝固因子のγ－カルボキシル化を導入するためには、ビタミンＫが必要である。ＧｌａドメインはＧｌａドメインは、カルシウムイオンの高親和性結合に関与し、この高親和性結合は、凝血に重要な役割を果たす。このドメインには、２つの上皮細胞増殖因子様（ＥＧＦ）ドメイン、連結部位（ＣＲ）およびＣ末端セリンプロテアーゼドメインが続く。分泌の前に、ＦＶＩＩプロペプチドが切断され、シグナルペプチドが除去されて、４０６アミノ酸の単鎖チモーゲンＦＶＩＩ糖タンパク質を形成される。分泌後、このタンパク質は、ＣＲでの切断によって、ジスルフィド結合の二本鎖のヘテロ二量体、ＦＶＩＩａへと活性化され得る。ＦＶＩＩの血漿中濃度は、１０ｎＭであり、健常者では、約１％が活性型で循環する。

【００３１】

一実施形態では、ＦＶＩＩもしくはＦＶＩＩａの生物学的半減期を延長させる方法またはＦＶＩＩもしくはＦＶＩＩａの曲線下面積（ＡＵＣ）を増大させる方法が本明細書で提

供され、該方法は、３個のＣＴＰをＦＶＩＩもしくはＦＶＩＩａのカルボキシ末端に結合し、これによって、ＦＶＩＩもしくはＦＶＩＩａの生物学的半減期を延長するかまたはＡＵＣを増大させるステップを含む。

【００３２】

別の実施形態では、第ＶＩＩａ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドの投与頻度を低減する方法が本明細書で開示され、該方法は、前記ＦＶＩＩａポリペプチドのカルボキシ末端に３個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）を結合し、それにより、前記ＦＶＩＩａポリペプチドの投与頻度を低減するステップを含む。

【００３３】

別の実施形態では、第ＶＩＩａ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドのクリアランス速度を低減する方法が本明細書で開示され、該方法は、前記ＦＶＩＩａポリペプチドのカルボキシ末端に３個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）を結合し、それにより、前記ＦＶＩＩａポリペプチドのクリアランス速度を低減するステップを含む。

【００３４】

一実施形態では、活性化ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドを製造する方法が本明細書で開示され、該方法は、前記ＦＶＩＩａポリペプチドのカルボキシ末端に３個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）を結合し、それにより、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドを製造するステップを含む。

【００３５】

別の実施形態では、本開示の凝固因子はタンパク質である。別の実施形態では、本開示の凝固因子はペプチドである。別の実施形態では、本開示の凝固因子はポリペプチドである。別の実施形態では、凝固因子は酵素である。別の実施形態では、凝固因子は、セリンプロテアーゼである。別の実施形態では、凝固因子は、糖タンパク質である。別の実施形態では、凝固因子は、ビタミンＫ依存性糖タンパク質である。別の実施形態では、凝固因子は、ビタミンＫ非依存性糖タンパク質である。別の実施形態では、凝固因子は、トランスグルタミナーゼである。別の実施形態では、凝固因子は、不活性なチモーゲンである。別の実施形態では、凝固因子は、当業者に既知の任意の凝固因子である。別の実施形態では、凝固因子は、第ＶＩＩａ因子（ＦＶＩＩａ）である。

【００３６】

別の実施形態では、凝固因子は、組み換えタンパク質である。別の実施形態では、凝固因子は、組み換え糖タンパク質である。別の実施形態では、凝固因子は、組み換えＦＶＩＩである。別の実施形態では、凝固因子は、組み換えＦＶＩＩａである。別の実施形態では、凝固因子は、シグナルペプチドである。別の実施形態では、組換え凝固因子は、シグナルペプチドを含まない。別の実施形態では、活性化凝固因子は、シグナルペプチドを含まない。

【００３７】

別の実施形態では、凝固因子は、Ｃ末端に結合された３個のＣＴＰ反復を含み、Ｎ末端に結合されたＣＴＰを含まない。

【００３８】

別の実施形態では、ＦＶＩＩａポリペプチドおよび前記ＦＶＩＩａのカルボキシ末端に結合した３個のゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）からなるＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドが本明細書で開示される。

【００３９】

別の実施形態では、凝固因子は、ＦＶＩＩのドメイン組織化と類似または同一のドメイン組織化を含む凝固因子である。別の実施形態では、凝固因子は、Ｎ末端プロペプチド（シグナル配列）を有する前駆体として合成される。別の実施形態では、本明細書で記載の凝固因子は、不活性なプロ酵素型である。別の実施形態では、本明細書で記載の凝固因子は、不活性チモーゲンであり、これは、細胞から分泌され、Ｎ末端シグナル配列を欠いている。別の実施形態では、本明細書で記載の凝固因子は、活性化凝固因子である。別の実施形態では、本明細書で記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、活性化されるまでは不活性なプロ

酵素型である。別の実施形態では、本明細書で記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、不活性チモーゲンであり、これは、細胞から分泌され、Ｎ末端シグナル配列を欠いている。別の実施形態では、本明細書で記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、活性化凝固因子である。別の実施形態では、凝固因子は、肝細胞中で生成される。別の実施形態では、凝固因子は、グルタミン酸（Ｇｌｕ）をγ－カルボキシグルタミン酸（Ｇｌａ）に変換するガンマカルボキシラーゼのためのドッキング部位を含む。別の実施形態では、本明細書で使用される場合、凝固因子は、市販の凝固因子である。

【００４０】

一実施形態では、Ｃ末端に直列に結合した３個のＣＴＰ分子を含むヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト活性第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドが本明細書で開示され、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドは、実質的に純粋な活性型であり、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドは、（ａ）高シアル酸含量；（ｂ）低酸化型；（ｃ）高グリコシル化型；（ｄ）高い比率のカルボキシル化グルタミン酸残基；（ｅ）高い比率の荷電Ｎ－グリカン；および（ｆ）高い効力；またはこれらの任意の組み合わせを有し、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは、配列番号７に示すアミノ酸配列を含む。

【００４１】

一実施形態では、Ｃ末端に直列に結合した３個のＣＴＰ分子を含むヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト活性第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドが本明細書で開示され、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドは、実質的に純粋な活性型であり、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドは、（ａ）高シアル酸含量；（ｂ）低酸化型；（ｃ）高グリコシル化型；（ｄ）高い比率のカルボキシル化グルタミン酸残基；（ｅ）高い比率の荷電Ｎ－グリカン；および（ｆ）少なくとも１０Ｕ／ｍｇの効力；またはこれらの任意の組み合わせを有し、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは、配列番号７に示すアミノ酸配列を含む。

【００４２】

関連する実施形態では、高シアル酸含量は、少なくとも１５ｍｏｌ／ｍｏｌからなる。別の関連する態様では、高グリコシル化型は、少なくとも１０ｍｏｌ／ｍｏｌのＯ－グリカン含量を含む。別の関連する態様では、実質的に純粋な活性型は、少なくとも６０％の前記活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａの高グリコシル化型を含む。別の関連する態様では、少なくとも６０％の実質的に純粋なＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａ型は、高い比率のカルボキシル化グルタミン酸（Ｇｌａ）残基を含む。別の関連する態様では、高い比率のカルボキシル化グルタミン酸（Ｇｌａ）残基は、少なくとも９０％のＧｌａ残基からなる。別の関連する態様では、低い比率の酸化型は、５％未満からなる。別の関連する態様では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも９０％である。さらに関連する態様では、純度パーセンテージは、９７．３％、９７．６％、９７．４％および９７．０％からなる群から選択される。別の関連する態様では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの効力は、少なくとも１０，５００Ｕ／ｍｇである。さらに関連する態様では、効力は、１５，５６３Ｕ／ｍｇ、１６，７２０Ｕ／ｍｇ、２２，４７８Ｕ／ｍｇおよび２３，６０８Ｕ／ｍｇからなる群から選択される。

【００４３】

別の実施形態では、（ａ）高シアル酸含量；（ｂ）低酸化型；（ｃ）高グリコシル化型；（ｄ）高い比率のカルボキシル化グルタミン酸残基；（ｅ）高い比率の荷電Ｎ－グリカン；および（ｆ）高い効力；またはこれらの任意の組み合わせを含むＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａおよび薬学的に許容可能なキャリアを含む組成物が本明細書で開示され、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは、配列番号７に示すアミノ酸配列を含む。

【００４４】

別の実施形態では、（ａ）高シアル酸含量；（ｂ）低酸化型；（ｃ）高グリコシル化型；（ｄ）高い比率のカルボキシル化グルタミン酸残基；（ｅ）高い比率の荷電Ｎ－グリカン；および（ｆ）少なくとも１０，５００Ｕ／ｍｇの効力；またはこれらの任意の組み合

わせを含むＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａおよび薬学的に許容可能なキャリアを含む組成物が本明細書で開示され、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは、配列番号７に示すアミノ酸配列を含む。

【００４５】

別の実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａを含む組成物が本明細書で開示され、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドは実質的に純粋な活性型であり、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドは、

ａ．高シアル酸含量；

ｂ．高グリコシル化型を含み、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは：

ｃ．低酸化型；

ｄ．高い比率のカルボキシル化グルタミン酸残基；

ｅ．少なくとも６０％の荷電Ｎ－グリカン；または

ｆ．少なくとも１０，５００Ｕ／ｍｇの効力；

またはこれらの任意の組み合わせ、の内の少なくとも１つをさらに含み、

前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは、配列番号７で示されるアミノ酸配列を含む。

【００４６】

別の実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａを含む組成物が本明細書で開示され、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドは実質的に純粋な活性型であり、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドは、

ａ．高シアル酸含量；

ｂ．高グリコシル化型を含み、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは：

ｃ．低酸化型；

ｄ．高い比率のカルボキシル化グルタミン酸残基；

ｅ．少なくとも６０％の荷電Ｎ－グリカン；または

ｆ．少なくとも１０，５００Ｕ／ｍｇの効力；

またはこれらの任意の組み合わせ、の内の少なくとも１つをさらに含み、

前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは、配列番号７に示されるアミノ酸配列を含み、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａのアミノ酸配列は、配列番号７のシステイン残基１３５とシステイン残基２６２との間のジスルフィド（Ｓ－Ｓ）架橋を含むジスルフィド結合二本鎖ヘテロダイマーの構造として存在し、前記二本鎖は、配列番号７のアミノ酸１～１５２を含む軽鎖およびアミノ酸１５３～４９０を含む重鎖を含む。

【００４７】

一実施形態では、第ＶＩＩ因子をコードする核酸配列は、以下の核酸配列を含む：

ｃｔｃｇａｇｇａｃａｔｇｇｔｃｔｃｃｃａｇｇｃｃｃｔｃａｇｇｃｔｃｃｔｃｔｇｃｃｔｔ
ｃｔｇｃｔｔｇｇｇｃｔｔｃａｇｇｇｃｔｇｃｃｔｇｇｃｔｇｃａｇｔｃｔｔｃｇｔａａ
ｃｃｃａｇｇａｇｇａａｇｃｃｃａｃｇｇｃｇｔｃｃｔｇｃａｃｃｇｇｃｇｃｃｇｇｃｇ
ｃｇｃｃａａｃｇｃｇｔｔｃｃｔｇｇａｇｇａｇｃｔｇｃｇｇｃｃｇｇｇｃｔｃｃｃｔｇ
ｇａｇａｇｇｇａｇｔｇｃａａｇｇａｇｇａｇｃａｇｔｇｃｔｃｃｔｔｃｇａｇｇａｇｇ
ｃｃｃｇｇｇａｇａｔｃｔｔｃａａｇｇａｃｇｃｇｇａｇａｇｇａｃｇａａｇｃｔｇｔｔ
ｃｔｇｇａｔｔｔｃｔｔａｃａｇｔｇａｔｇｇｇｇａｃｃａｇｔｇｔｇｃｃｔｃａａｇｔ
ｃｃａｔｇｃｃａｇａａｔｇｇｇｇｇｃｔｃｃｔｇｃａａｇｇａｃｃａｇｃｔｃｃａｇｔ
ｃｃｔａｔａｔｃｔｇｃｔｔｃｔｇｃｃｔｃｃｃｔｇｃｃｔｔｃｇａｇｇｇｃｃｇｇａａ
ｃｔｇｔｇａｇａｃｇｃａｃａａｇｇａｔｇａｃｃａｇｃｔｇａｔｃｔｇｔｇｔｇａａｃ
ｇａｇａａｃｇｇｃｇｇｃｔｇｔｇａｇｃａｇｔａｃｔｇｃａｇｔｇａｃｃａｃａｃｇｇ
ｇｃａｃｃａａｇｃｇｃｔｃｃｔｇｔｃｇｇｔｇｃｃａｃｇａｇｇｇｇｔａｃｔｃｔｃｔ
ｇｃｔｇｇｃａｇａｃｇｇｇｇｔｇｔｃｃｔｇｃａｃａｃｃｃａｃａｇｔｔｇａａｔａｔ
ｃｃａｔｇｔｇｇａａａａａｔａｃｃｔａｔｔｃｔａｇａａａａａａａｇａａａｔｇｃｃａ
ｇｃａａａｃｃｃｃａａｇｇｃｃｇａａｔｔｇｔｇｇｇｇｇｇｃａａｇｇｔｇｔｇｃｃｃ
ｃａａａｇｇｇｇａｇｔｇｔｃｃａｔｇｇｃａｇｇｔｃｃｔｇｔｔｇｔｔｇｇｔｇａａｔ
ｇｇａｇｃｔｃａｇｔｔｇｔｇｔｇｇｇｇｇｇｇａｃｃｃｔｇａｔｃａａｃａｃｃａｔｃｔ
ｇｇｇｔｇｇｔｃｔｃｃｇｃｇｇｃｃｃａｃｔｇｔｔｔｃｇａｃａａａａｔｃａａｇａａ

ｃｔｇｇａｇｇａａｃｃｔｇａｔｃｇｃｇｇｔｇｃｔｇｇｇｃｇａｇｃａｃｇａｃｃｔｃ
ａｇｃｇａｇｃａｃｇａｃｇｇｇｇａｔｇａｇｃａｇａｇｃｃｇｇｃｇｇｇｔｇｇｃｇｃ
ａｇｇｔｃａｔｃａｔｃｃｃｃａｇｃａｃｇｔａｃｇｔｃｃｃｇｇｇｃａｃｃａｃｃａａ
ｃｃａｃｇａｃａｔｃｇｃｇｃｔｇｃｔｃｃｇｃｃｔｇｃａｃｃａｇｃｃｃｇｔｇｇｔｃ
ｃｔｃａｃｔｇａｃｃａｔｇｔｇｇｔｇｃｃｃｃｔｃｔｇｃｃｔｇｃｃｃｇａａｃｇｇａ
ｃｇｔｔｃｔｃｔｇａｇａｇｇａｃｇｃｔｇｇｃｃｔｔｃｇｔｇｃｇｃｔｔｃｔｃａｔｔ
ｇｇｔｃａｇｃｇｇｃｔｇｇｇｇｃｃａｇｃｔｇｃｔｇｇａｃｃｇｔｇｇｃｇｃｃａｃｇ
ｇｃｃｃｔｇｇａｇｃｔｃａｔｇｇｔｃｃｔｃａａｃｇｔｇｃｃｃｃｇｇｃｔｇａｔｇａ
ｃｃｃａｇｇａｃｔｇｃｃｔｇｃａｇｃａｇｔｃａｃｇｇａａｇｇｔｇｇｇａｇａｃｔｃ
ｃｃｃａａａｔａｔｃａｃｇｇａｇｔａｃａｔｇｔｔｃｔｇｔｇｃｃｇｇｃｔａｃｔｃｇ
ｇａｔｇｇｃａｇｃａａｇｇａｃｔｃｃｔｇｃａａｇｇｇｇｇａｃａｇｔｇｇａｇｇｃｃ
ｃａｃａｔｇｃｃａｃｃｃａｃｔａｃｃｇｇｇｇｃａｃｇｔｇｇｔａｃｃｔｇａｃｇｇｇ
ｃａｔｃｇｔｃａｇｃｔｇｇｇｇｃｃａｇｇｇｃｔｇｃｇｃａａｃｃｇｔｇｇｇｃｃａｃ
ｔｔｔｇｇｇｇｔｇｔａｃａｃｃａｇｇｇｔｃｔｃｃｃａｇｔａｃａｔｃｇａｇｔｇｇｃ
ｔｇｃａａａａｇｃｔｃａｔｇｃｇｃｔｃａｇａｇｃｃａｃｇｃｃｃｃａｇｇａｇｔｃｃｔ
ｃｃｔｇｃｇａｇｃｃｃｃａｔｔｔｃｃｃｔｇａｇｇａｔｇｃｇｇｃｃｇｃ（配列番号１
）。

【００４８】

別の実施形態では、第ＶＩＩ因子のアミノ酸配列は、以下のアミノ酸配列を含む：ＭＶ
ＳＱＡＬＲＬＬＣＬＬＬＧＬＱＧＣＬＡＡＶＦＶＴＱＥＥＡＨＧＶＬＨＲＲＲＲＡＮＡＦ
ＬＥＥＬＲＰＧＳＬＥＲＥＣＫＥＥＱＣＳＦＥＥＡＲＥＩＦＫＤＡＥＲＴＫＬＦＷＩＳＹ
ＳＤＧＤＱＣＡＳＳＰＣＱＮＧＧＳＣＫＤＱＬＱＳＹＩＣＦＣＬＰＡＦＥＧＲＮＣＥＴＨ
ＫＤＤＱＬＩＣＶＮＥＮＧＧＣＥＱＹＣＳＤＨＴＧＴＫＲＳＣＲＣＨＥＧＹＳＬＬＡＤＧ
ＶＳＣＴＰＴＶＥＹＰＣＧＫＩＰＩＬＥＫＲＮＡＳＫＰＱＧＲＩＶＧＧＫＶＣＰＫＧＥＣ
ＰＷＱＶＬＬＬＶＮＧＡＱＬＣＧＧＴＬＩＮＴＩＷＶＶＳＡＡＨＣＦＤＫＩＫＮＷＲＮＬ
ＩＡＶＬＧＥＨＤＬＳＥＨＤＧＤＥＱＳＲＲＶＡＱＶＩＩＰＳＴＹＶＰＧＴＴＮＨＤＩＡ
ＬＬＲＬＨＱＰＶＶＬＴＤＨＶＶＰＬＣＬＰＥＲＴＦＳＥＲＴＬＡＦＶＲＦＳＬＶＳＧＷ
ＧＱＬＬＤＲＧＡＴＡＬＥＬＭＶＬＮＶＰＲＬＭＴＱＤＣＬＱＱＳＲＫＶＧＤＳＰＮＩＴ
ＥＹＭＦＣＡＧＹＳＤＧＳＫＤＳＣＫＧＤＳＧＧＰＨＡＴＨＹＲＧＴＷＹＬＴＧＩＶＳＷ
ＧＱＧＣＡＴＶＧＨＦＧＶＹＴＲＶＳＱＹＩＥＷＬＱＫＬＭＲＳＥＰＲＰＧＶＬＬＲＡＰ
ＦＰ（配列番号２）。

【００４９】

別の実施形態では、第ＶＩＩ因子のアミノ酸配列は、以下のアミノ酸配列を含む：ＭＶ
ＳＱＡＬＲＬＬＣＬＬＬＧＬＱＧＣＬＡＡＶＦＶＴＱＥＥＡＨＧＶＬＨＲＲＲＲＡＮＡＦ
ＬＥＥＬＲＰＧＳＬＥＲＥＣＫＥＥＱＣＳＦＥＥＡＲＥＩＦＫＤＡＥＲＴＫＬＦＷＩＳＹ
ＳＤＧＤＱＣＡＳＳＰＣＱＮＧＧＳＣＫＤＱＬＱＳＹＩＣＦＣＬＰＡＦＥＧＲＮＣＥＴＨ
ＫＤＤＱＬＩＣＶＮＥＮＧＧＣＥＱＹＣＳＤＨＴＧＴＫＲＳＣＲＣＨＥＧＹＳＬＬＡＤＧ
ＶＳＣＴＰＴＶＥＹＰＣＧＫＩＰＩＬＥＫＲＮＡＳＫＰＱＧＲＩＶＧＧＫＶＣＰＫＧＥＣ
ＰＷＱＶＬＬＬＶＮＧＡＱＬＣＧＧＴＬＩＮＴＩＷＶＶＳＡＡＨＣＦＤＫＩＫＮＷＲＮＬ
ＩＡＶＬＧＥＨＤＬＳＥＨＤＧＤＥＱＳＲＲＶＡＱＶＩＩＰＳＴＹＶＰＧＴＴＮＨＤＩＡ
ＬＬＲＬＨＱＰＶＶＬＴＤＨＶＶＰＬＣＬＰＥＲＴＦＳＥＲＴＬＡＦＶＲＦＳＬＶＳＧＷ
ＧＱＬＬＤＲＧＡＴＡＬＥＬＭＶＬＮＶＰＲＬＭＴＱＤＣＬＱＱＳＲＫＶＧＤＳＰＮＩＴ
ＥＹＭＦＣＡＧＹＳＤＧＳＫＤＳＣＫＧＤＳＧＧＰＨＡＴＨＹＲＧＴＷＹＬＴＧＩＶＳＷ
ＧＱＧＣＡＴＶＧＨＦＧＶＹＴＲＶＳＱＹＩＥＷＬＱＫＬＭＲＳＥＰＲＰＧＶＬＬＲＡＰ
ＦＰＧＣＧＲ（配列番号３）。

【００５０】

別の実施形態では、第ＶＩＩ因子－ＣＴＰ－ＣＴＰ－ＣＴＰ（カルボキシ末端に結合）
をコードする核酸配列は、以下の核酸配列を含む：ｃｔｃｇａｇｇａｃａｔｇｇｔｃｔｃ
ｃｃａｇｇｃｃｃｔｃａｇｇｃｔｃｃｔｃｔｇｃｃｔｔｃｔｇｃｔｔｇｇｇｃｔｔｃａｇ
ｇｇｃｔｇｃｃｔｇｇｃｔｇｃａｇｔｃｔｔｃｇｔａａｃｃｃａｇｇａｇｇａａｇｃｃｃ

acggcgtcctgcaccggcgccggcgcgccaacgcgttcct
ggaggagctgcggccggggctccctggagagggagtgcaag
gaggagcagtgctccttcgaggaggcccggggagatcttca
aggacgcggagaggacgaagctgttctggatttcttacag
tgatggggaccagtgtgcctcaagtccatgccagaatggg
ggctcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgcttct
gcctccctgccttcgagggccggaactgtgagacgcacaa
ggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaacggcggctgt
gagcagtactgcagtgaccacacggggcaccaagcgctcct
gtcggtgccacgaggggtactctctgctggcagacgggggt
gtcctgcacacccacagttgaatatccatgtggaaaaata
cctatttctagaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggcc
gaattgtgggggggcaaggtgtgcccaaaggggagtgtcc
atggcaggtcctgttgttggtgaatggagctcagttgtgt
ggggggaccctgatcaacaccatctgggtggtctccgcgg
cccactgtttcgacaaaatcaagaactggaggaacctgat
cgcggtgctgggcgagcacgacctcagcgagcacgacgggg
gatgagcagagccggcgggtggcgcaggtcatcatccccca
gcacgtacgtcccgggcaccaccaaccacgacatcgcgct
gctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactgaccatgtg
gtgcccctctgcctgcccgaacggacgttctctgagaggga
cgctggcctttcgtgcgcttctcattggtcagcggctgggg
ccagctgctggaccgtggcgccacggcccctggagctcatg
gtcctcaacgtgccccggctgatgacccaggactgcctgc
agcagtcacggaaggtgggagactccccaaatatcacggga
gtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggac
tcctgcaaggggacagtggaggcccacatgccacccact
accggggcacgtggtacctgaccggcatcgtgagctgggg
ccagggctgcgccaccgtgggccacttcggcgtgtacacc
agggtgtcccagtacatcgagtggctgcagaaactgatga
gaagcgagcccagaccccggcgtgctgctgagagccccctt
ccccagcagcagctccaaggccccctccccctagcctgccc
agccctagcagactgcctgggcccagtgacacccctatcc
tgcctcagtccagctccagcaaggccccacccccctagcct
gccttctcccttctcggctgcctggccccagcgatactcca
attctgccccagtcctccagcagtaaggctcccccctccat
ctctgccatccccccagcagactgccaggccccttctgatac
acccatcctccccacagtgatgaggatccgcgggccgcttaa
ttaa（配列番号４）。

【００５１】

別の実施形態では、第ＶＩＩ因子－ＣＴＰ－ＣＴＰ－ＣＴＰ（カルボキシ末端に結合）のアミノ酸配列は、以下のアミノ酸配列を含む：ＭＶＳＱＡＬＲＬＬＣＬＬＬＧＬＱＧＣ
ＬＡＡＶＦＶＴＱＥＥＡＨＧＶＬＨＲＲＲＲＡＮＡＦＬＥＥＬＲＰＧＳＬＥＲＥＣＫＥＥ
ＱＣＳＦＥＥＡＲＥＩＦＫＤＡＥＲＴＫＬＦＷＩＳＹＳＤＧＤＱＣＡＳＳＰＣＱＮＧＧＳ
ＣＫＤＱＬＱＳＹＩＣＦＣＬＰＡＦＥＧＲＮＣＥＴＨＫＤＤＱＬＩＣＶＮＥＮＧＧＣＥＱ
ＹＣＳＤＨＴＧＴＫＲＳＣＲＣＨＥＧＹＳＬＬＡＤＧＶＳＣＴＰＴＶＥＹＰＣＧＫＩＰＩ
ＬＥＫＲＮＡＳＫＰＱＧＲＩＶＧＧＫＶＣＰＫＧＥＣＰＷＱＶＬＬＬＶＮＧＡＱＬＣＧＧ
ＴＬＩＮＴＩＷＶＶＳＡＡＨＣＦＤＫＩＫＮＷＲＮＬＩＡＶＬＧＥＨＤＬＳＥＨＤＧＤＥ
ＱＳＲＲＶＡＱＶＩＩＰＳＴＹＶＰＧＴＴＮＨＤＩＡＬＬＲＬＨＱＰＶＶＬＴＤＨＶＶＰ
ＬＣＬＰＥＲＴＦＳＥＲＴＬＡＦＶＲＦＳＬＶＳＧＷＧＱＬＬＤＲＧＡＴＡＬＥＬＭＶＬ

ＮＶＰＲＬＭＴＱＤＣＬＱＱＳＲＫＶＧＤＳＰＮＩＴＥＹＭＦＣＡＧＹＳＤＧＳＫＤＳＣ
ＫＧＤＳＧＧＰＨＡＴＨＹＲＧＴＷＹＬＴＧＩＶＳＷＧＱＧＣＡＴＶＧＨＦＧＶＹＴＲＶ
ＳＱＹＩＥＷＬＱＫＬＭＲＳＥＰＲＰＧＶＬＬＲＡＰＦＰＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳＬＰＳＰ
ＳＲＬＰＧＰＳＤＴＰＩＬＰＱＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳＬＰＳＰＳＲＬＰＧＰＳＤＴＰＩＬ
ＰＱＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳＬＰＳＰＳＲＬＰＧＰＳＤＴＰＩＬＰＱ（配列番号５）。別の実施形態では、配列番号５のアミノ酸１～３８は、シグナル配列を含む。別の実施形態では、シグナル配列のアミノ酸配列は、ＭＶＳＱＡＬＲＬＬＣＬＬＬＧＬＱＧＣＬＡＡＶＦＶＴＱＥＥＡＨＧＶＬＨＲＲＲＲ（配列番号６）を含む。

【００５２】

別の実施形態では、シグナルペプチドを欠く第ＶＩＩ因子－ＣＴＰ－ＣＴＰ－ＣＴＰ（カルボキシ末端に結合）のアミノ酸配列は、以下のアミノ酸配列を含む：

ＡＮＡＦＬＥＥＬＲＰ　ＧＳＬＥＲＥＣＫＥＥ　ＱＣＳＦＥＥＡＲＥＩ
ＦＫＤＡＥＲＴＫＬＦ　ＷＩＳＹＳＤＧＤＱＣ　ＡＳＳＰＣＱＮＧＧＳ
ＣＫＤＱＬＱＳＹＩＣ　ＦＣＬＰＡＦＥＧＲＮ　ＣＥＴＨＫＤＤＱＬＩ
ＣＶＮＥＮＧＧＣＥＱ　ＹＣＳＤＨＴＧＴＫＲ　ＳＣＲＣＨＥＧＹＳＬ
ＬＡＤＧＶＳＣＴＰＴ　ＶＥＹＰＣＧＫＩＰＩ　ＬＥＫＲＮＡＳＫＰＱ
ＧＲＩＶＧＧＫＶＣＰ　ＫＧＥＣＰＷＱＶＬＬ　ＬＶＮＧＡＱＬＣＧＧ
ＴＬＩＮＴＩＷＶＶＳ　ＡＡＨＣＦＤＫＩＫＮ　ＷＲＮＬＩＡＶＬＧＥ
ＨＤＬＳＥＨＤＧＤＥ　ＱＳＲＲＶＡＱＶＩＩ　ＰＳＴＹＶＰＧＴＴＮ
ＨＤＩＡＬＬＲＬＨＱ　ＰＶＶＬＴＤＨＶＶＰ　ＬＣＬＰＥＲＴＦＳＥ
ＲＴＬＡＦＶＲＦＳＬ　ＶＳＧＷＧＱＬＬＤＲ　ＧＡＴＡＬＥＬＭＶＬ
ＮＶＰＲＬＭＴＱＤＣ　ＬＱＱＳＲＫＶＧＤＳ　ＰＮＩＴＥＹＭＦＣＡ
ＧＹＳＤＧＳＫＤＳＣ　ＫＧＤＳＧＧＰＨＡＴ　ＨＹＲＧＴＷＹＬＴＧ
ＩＶＳＷＧＱＧＣＡＴ　ＶＧＨＦＧＶＹＴＲＶ　ＳＱＹＩＥＷＬＱＫＬ
ＭＲＳＥＰＲＰＧＶＬ　ＬＲＡＰＦＰＳＳＳＳ　ＫＡＰＰＰＳＬＰＳＰ
ＳＲＬＰＧＰＳＤＴＰ　ＩＬＰＱＳＳＳＳＫＡ　ＰＰＰＳＬＰＳＰＳＲ
ＬＰＧＰＳＤＴＰＩＬ　ＰＱＳＳＳＳＫＡＰＰ　ＰＳＬＰＳＰＳＲＬＰ
ＧＰＳＤＴＰＩＬＰＱ（配列番号７）。

【００５３】

別の実施形態では、活性化第ＶＩＩ因子－ＣＴＰ－ＣＴＰ－ＣＴＰ（カルボキシ末端に結合）（ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$）のアミノ酸配列は、シグナルペプチドを欠き、配列番号７で示されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$は、シグナルペプチドを欠き、配列番号７の相同体を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$は、シグナルペプチドを欠き、配列番号７の変異体を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$のアミノ酸配列は、残基１５２の位置のアルギニン（Ｒ）と、残基１５３の位置のイソロイシン（Ｉ）との間で切断される。別の実施形態では、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$のアミノ酸配列は、それぞれの鎖上に存在するシステイン残基間のジスルフィドＳ－Ｓ架橋を含むジスルフィド結合二本鎖ヘテロダイマーの構造として存在する。別の実施形態では、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$のアミノ酸配列は、軽鎖中に存在するシステイン残基と重鎖中に存在するシステイン残基との間のジスルフィド－Ｓ－Ｓ－結合により連結した軽鎖および重鎖を含むヘテロダイマーの構造として存在する。別の実施形態では、軽鎖はＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$アミノ酸配列のＮ末端断片を含み、重鎖はＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$アミノ酸配列のＣ末端断片を含む。別の実施形態では、システイン残基は、いずれかの鎖の任意のシステイン残基であってよい。別の実施形態では、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$のアミノ酸配列は、配列番号７のシステイン残基１３５とシステイン残基２６２との間のＳ－Ｓ架橋を含むジスルフィド結合二本鎖ヘテロダイマーの構造として存在し、前記二本鎖は、配列番号７のアミノ酸１～１５２を含む軽鎖およびアミノ酸１５３～４９０を含む重鎖を含む。

【００５４】

別の実施形態では、軽鎖は、変性条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥで、約２５ｋＤａに移動する。別の実施形態では、重鎖は、変性条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥで、約５０ｋＤａに移動

する。別の実施形態では、重鎖は、変性条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥで、約６０ｋＤａに移動する。

【００５５】

別の実施形態では、Ｃ末端に結合した３個のＣＴＰにより修飾された活性化ＦＶＩＩ（ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ－ＣＴＰ－ＣＴＰ）の軽鎖は、配列番号８を含む。

ＡＮＡＦＬＥＥＬＲＰＧＳＬＥＲＥＣＫＥＥＱＣＳＦＥＥＡＲＥＩＦＫＤＡＥＲＴＫＬＦＷＩＳＹＳＤＧＤＱＣＡＳＳＰＣＱＮＧＧＳＣＫＤＱＬＱＳＹＩＣＦＣＬＰＡＦＥＧＲＮＣＥＴＨＫＤＤＱＬＩＣＶＮＥＮＧＧＣＥＱＹＣＳＤＨＴＧＴＫＲＳＣＲＣＨＥＧＹＳＬＬＡＤＧＶＳＣＴＰＴＶＥＹＰＣＧＫＩＰＩＬＥＫＲＮＡＳＫＰＱＧＲ（配列番号８）。

【００５６】

別の実施形態では、Ｃ末端に結合した３個のＣＴＰにより修飾された活性化ＦＶＩＩ（ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ－ＣＴＰ－ＣＴＰ）の重鎖は、配列番号９を含む。

ＩＶＧＧＫＶＣＰＫＧＥＣＰＷＱＶＬＬＬＶＮＧＡＱＬＣＧＧＴＬＩＮＴＩＷＶＶＳＡＡＨＣＦＤＫＩＫＮＷＲＮＬＩＡＶＬＧＥＨＤＬＳＥＨＤＧＤＥＱＳＲＲＶＡＱＶＩＩＰＳＴＹＶＰＧＴＴＮＨＤＩＡＬＬＲＬＨＱＰＶＶＬＴＤＨＶＶＰＬＣＬＰＥＲＴＦＳＥＲＴＬＡＦＶＲＦＳＬＶＳＧＷＧＱＬＬＤＲＧＡＴＡＬＥＬＭＶＬＮＶＰＲＬＭＴＱＤＣＬＱＱＳＲＫＶＧＤＳＰＮＩＴＥＹＭＦＣＡＧＹＳＤＧＳＫＤＳＣＫＧＤＳＧＧＰＨＡＴＨＹＲＧＴＷＹＬＴＧＩＶＳＷＧＱＧＣＡＴＶＧＨＦＧＶＹＴＲＶＳＱＹＩＥＷＬＱＫＬＭＲＳＥＰＲＰＧＶＬＬＲＡＰＦＰＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳＬＰＳＰＳＲＬＰＧＰＳＤＴＰＩＬＰＱＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳＬＰＳＰＳＲＬＰＧＰＳＤＴＰＩＬＰＱＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳＬＰＳＰＳＲＬＰＧＰＳＤＴＰＩＬＰＱ（配列番号９）。

【００５７】

別の実施形態では、フーリンが、本開示の凝固因子－ＣＴＰを発現する細胞に添加される。別の実施形態では、フーリンは、細胞中の本開示の凝固因子－ＣＴＰの生成効率を増大する。別の実施形態では、フーリンは、本開示の凝固因子－ＣＴＰのコード配列を含むベクターを用いて同時遺伝子導入される。別の実施形態では、フーリンは、別のベクターによりコードされる。別の実施形態では、フーリンおよび凝固因子－ＣＴＰは、１個のベクターによって、コードされる。別の実施形態では、フーリンのコード配列が、ｐＣＩ－ＤＨＦＲに挿入される。別の実施形態では、フーリンのコード配列は、ｐＣＩ－ｄｈｆｒ／ｓｍａＩ＋ＮｏｔＩ、フーリン／ＡｓｉｓＩ　Ｆ．Ｉ．＋ＮｏｔＩ中で操作される。

【００５８】

別の実施形態では、フーリンをコードする核酸配列は、以下の核酸配列を含む：ｔｃｔａｇａｇｔｃｇａｃｃｃｃｇｃｃａｔｇｇａｇｃｔｇａｇｇｃｃｃｔｇｇｔｔｇｃｔａｔｇｇｇｔｇｇｔａｇｃａｇｃａａｃａｇｇａａｃｃｔｔｇｇｔｃｃｔｇｃｔａｇｃａｇｃｔｇａｔｇｃｔｃａｇｇｇｃｃａｇａａｇｇｔｃｔｔｃａｃｃａａｃａｃｇｔｇｇｇｃｔｇｔｇｃｇｃａｔｃｃｃｔｇｇａｇｇｃｃｃａｇｃｇｇｔｇｇｃｃａａｃａｇｔｇｔｇｇｃａｃｇｇａａｇｃａｔｇｇｇｔｔｃｃｔｃａａｃｃｔｇｇｇｃｃａｇａｔｃｔｔｃｇｇｇｇａｃｔａｔｔａｃｃａｃｔｔｃｔｇｇｃａｔｃｇａｇｇａｇｔｇａｃｇａａｇｃｇｇｔｃｃｃｔｇｔｃｇｃｃｔｃａｃｃｇｃｃｃｇｃｇｇｃａｃａｇｃｃｇｇｃｔｇｃａｇａｇｇｇａｇｃｃｔｃａａｇｔａｃａｇｔｇｇｃｔｇｇａａｃａｇｃａｇｇｔｇｇｃａａａｇｃｇａｃｇｇａｃｔａａａｃｇｇｇａｃｇｔｇｔａｃｃａｇｇａｇｃｃｃａｃａｇａｃｃｃｃａａｇｔｔｔｃｃｔｃａｇｃａｇｔｇｇｔａｃｃｔｇｔｃｔｇｇｔｇｔｃａｃｔｃａｇｃｇｇｇａｃｃｔｇａａｔｇｔｇａａｇｇｃｇｇｃｃｔｇｇｇｃｇｃａｇｇｇｃｔａｃａｃａｇｇｇｃａｃｇｇｃａｔｔｇｔｇｇｔｃｔｃｃａｔｔｃｔｇｇａｃｇａｔｇｇｃａｔｃｇａｇａａｇａａｃｃａｃｃｃｇｇａｃｔｔｇｇｃａｇｇｃａａｔｔａｔｇａｔｃｃｔｇｇｇｇｃｃａｇｔｔｔｔｇａｔｇｔｃａａｔｇａｃｃａｇｇａｃｃｃｔｇａｃｃｃｃｃａｇｃｃｔｃｇｇｔａｃａｃａｃａｇａｔｇａａｔｇａｃａａｃａｇｇｃａｃｇｇｃａｃａｃｇｇｔｇｔｇｃｇｇｇｇｇａａｇｔｇｇｃｔｇｃｇｇｔｇｇｃｃａａｃａａｃｇｇｔｇｔｃｔｇｔｇｇｔｇｔａｇｇｔｇｔｇｇｃｃｔａｃａａｃｇｃｃｃｇｃａｔｔｇｇａｇｇｇｇｔｇｃｇｃａｔｇｃｔｇｇａｔｇｇｃｇａｇｇｔｇａｃａｇａｔｇｃａｇｔｇ

ｇａｇｇｃａｃｇｃｔｃｇｃｔｇｇｇｃｃｔｇａａｃｃｃｃａａｃｃａｃａｔｃｃａｃａ
ｔｃｔａｃａｇｔｇｃｃａｇｃｔｇｇｇｇｃｃｃｃｇａｇｇａｔｇａｃｇｇｃａａｇａｃ
ａｇｔｇｇａｔｇｇｇｃｃａｇｃｃｃｇｃｃｔｃｇｃｃｇａｇｇａｇｇｃｃｔｔｃｔｔｃ
ｃｇｔｇｇｇｇｔｔａｇｃｃａｇｇｇｃｃｇａｇｇｇｇｇｇｃｔｇｇｇｃｔｃｃａｔｃｔ
ｔｔｇｔｃｔｇｇｇｃｃｔｃｇｇｇｇａａｃｇｇｇｇｇｇｃｃｇｇｇａａｃａｔｇａｃａｇ
ｃｔｇｃａａｃｔｇｃｇａｃｇｇｃｔａｃａｃｃａａｃａｇｔａｔｃｔａｃａｃｇｃｔｇ
ｔｃｃａｔｃａｇｃａｇｃｇｃｃａｃｇｃａｇｔｔｔｇｇｃａａｃｇｔｇｃｃｇｔｇｇｔ
ａｃａｇｃｇａｇｇｃｃｔｇｃｔｃｇｔｃｃａｃａｃｔｇｇｃｃａｃｇａｃｃｔａｃａｇ
ｃａｇｔｇｇｃａａｃｃａｇａａｔｇａｇａａｇｃａｇａｔｃｇｔｇａｃｇａｃｔｇａｃ
ｔｔｇｃｇｇｃａｇａａｇｔｇｃａｃｇｇａｇｔｃｔｃａｃａｃｇｇｇｃａｃｃｔｃａｇ
ｃｃｔｃｔｇｃｃｃｃｃｔｔａｇｃａｇｃｃｇｇｃａｔｃａｔｔｇｃｔｃｔｃａｃｃｃｔ
ｇｇａｇｇｃｃａａｔａａｇａａｃｃｔｃａｃａｔｇｇｃｇｇｇａｃａｔｇｃａａｃａｃ
ｃｔｇｇｔｇｇｔａｃａｇａｃｃｔｃｇａａｇｃｃａｇｃｃｃａｃｃｔｃａａｔｇｃｃａ
ａｃｇａｃｔｇｇｇｃｃａｃｃａａｔｇｇｔｇｔｇｇｇｃｃｇｇａａａｇｔｇａｇｃｃａ
ｃｔｃａｔａｔｇｇｃｔａｃｇｇｇｃｔｔｔｔｇｇａｃｇｃａｇｇｃｇｃｃａｔｇｇｔｇ
ｇｃｃｃｔｇｇｃｃｃａｇａａｔｔｇｇａｃｃａｃａｇｔｇｇｃｃｃｃｃｃａｇｃｇｇａ
ａｇｔｇｃａｔｃａｔｃｇａｃａｔｃｃｔｃａｃｃｇａｇｃｃｃａａａｇａｃａｔｃｇｇ
ｇａａａｃｇｇｃｔｃｇａｇｇｔｇｃｇｇａａｇａｃｃｇｔｇａｃｃｇｃｇｔｇｃｃｔｇ
ｇｇｃｇａｇｃｃｃａａｃｃａｃａｔｃａｃｔｃｇｇｃｔｇｇａｇｃａｃｇｃｔｃａｇｇ
ｃｇｃｇｇｃｔｃａｃｃｃｔｇｔｃｃｔａｔａａｔｃｇｃｃｇｔｇｇｃｇａｃｃｔｇｇｃ
ｃａｔｃｃａｃｃｔｇｇｔｃａｇｃｃｃｃａｔｇｇｇｃａｃｃｃｇｃｔｃｃａｃｃｃｔｇ
ｃｔｇｇｃａｇｃｃａｇｇｃｃａｃａｔｇａｃｔａｃｔｃｃｇｃａｇａｔｇｇｇｔｔｔａ
ａｔｇａｃｔｇｇｇｃｃｔｔｃａｔｇａｃａａｃｔｃａｔｔｃｃｔｇｇｇａｔｇａｇｇａ
ｔｃｃｃｔｃｔｇｇｃｇａｇｔｇｇｇｔｃｃｔａｇａｇａｔｔｇａａａａｃａｃｃａｇｃ
ｇａａｇｃｃａａｃａａｃｔａｔｇｇｇａｃｇｃｔｇａｃｃａａｇｔｔｃａｃｃｃｔｃｇ
ｔａｃｔｃｔａｔｇｇｃａｃｃｇｃｃｃｃｔｇａｇｇｇｇｃｔｇｃｃｃｇｔａｃｃｔｃｃ
ａｇａａａｇｃａｇｔｇｇｃｔｇｃａａｇａｃｃｃｔｃａｃｇｔｃｃａｇｔｃａｇｇｃｃ
ｔｇｔｇｔｇｇｔｇｔｇｃｇａｇｇａａｇｇｃｔｔｃｔｃｃｃｔｇｃａｃｃａｇａａｇａ
ｇｃｔｇｔｇｔｃｃａｇｃａｃｔｇｃｃｃｔｃｃａｇｇｃｔｔｃｇｃｃｃｃｃｃａａｇｔ
ｃｃｔｃｇａｔａｃｇｃａｃｔａｔａｇｃａｃｃｇａｇａａｔｇａｃｇｔｇｇａｇａｃｃ
ａｔｃｃｇｇｇｃｃａｇｃｇｔｃｔｇｃｇｃｃｃｃｃｔｇｃｃａｃｇｃｃｔｃａｔｇｔｇ
ｃｃａｃａｔｇｃｃａｇｇｇｇｃｃｇｇｃｃｃｔｇａｃａｇａｃｔｇｃｃｔｃａｇｃｔｇ
ｃｃｃｃａｇｃｃａｃｇｃｃｔｃｃｔｔｇｇａｃｃｃｔｇｔｇｇａｇｃａｇａｃｔｔｇｃ
ｔｃｃｃｇｇｃａａａｇｃｃａｇａｇｃａｇｃｃｇａｇａｇｔｃｃｃｃｇｃｃａｃａｇｃ
ａｇｃａｇｃｃａｃｃｔｃｇｇｃｔｇｃｃｃｃｃｇｇａｇｇｔｇｇａｇｇｃｇｇｇｇｃａ
ａｃｇｇｃｔｇｃｇｇｇｃａｇｇｇｃｔｇｃｔｇｃｃｃｔｃａｃａｃｃｔｇｃｃｔｇａｇ
ｇｔｇｇｔｇｇｃｃｇｇｃｃｔｃａｇｃｔｇｃｇｃｃｔｔｃａｔｃｇｔｇｃｔｇｇｔｃｔ
ｔｃｇｔｃａｃｔｇｔｃｔｔｃｃｔｇｇｔｃｃｔｇｃａｇｃｔｇｃｇｃｔｃｔｇｇｃｔｔ
ｔａｇｔｔｔｔｃｇｇｇｇｇｇｇｔｇａａｇｇｔｇｔａｃａｃｃａｔｇｇａｃｃｇｔｇｇｃ
ｃｔｃａｔｃｔｃｃｔａｃａａｇｇｇｇｃｔｇｃｃｃｃｃｔｇａａｇｃｃｔｇｇｃａｇｇ
ａｇｇａｇｔｇｃｃｃｇｔｃｔｇａｃｔｃａｇａａｇａｇｇａｃｇａｇｇｇｃｃｇｇｇｇ
ｃｇａｇａｇｇａｃｃｇｃｃｔｔｔａｔｃａａａｇａｃｃａｇａｇｃｇｃｃｃｔｃｔｇａ
ａｃｇｃｇｇｃｃｇｃ（配列番号１０）。

【００５９】

別の実施形態では、フーリンのアミノ酸配列は、以下のアミノ酸配列を含む：ＭＥＬＲ
ＰＷＬＬＷＶＶＡＡＴＧＴＬＶＬＬＡＡＤＡＱＧＱＫＶＦＴＮＴＷＡＶＲＩＰＧＧＰＡＶ
ＡＮＳＶＡＲＫＨＧＦＬＮＬＧＱＩＦＧＤＹＹＨＦＷＨＲＧＶＴＫＲＳＬＳＰＨＲＰＲＨ
ＳＲＬＱＲＥＰＱＶＱＷＬＥＱＱＶＡＫＲＲＴＫＲＤＶＹＱＥＰＴＤＰＫＦＰＱＱＷＹＬ
ＳＧＶＴＱＲＤＬＮＶＫＡＡＷＡＱＧＹＴＧＨＧＩＶＶＳＩＬＤＤＧＩＥＫＮＨＰＤＬＡ
ＧＮＹＤＰＧＡＳＦＤＶＮＤＱＤＰＤＰＱＰＲＹＴＱＭＮＤＮＲＨＧＴＲＣＡＧＥＶＡＡ

ＶＡＮＮＧＶＣＧＶＧＶＡＹＮＡＲＩＧＧＶＲＭＬＤＧＥＶＴＤＡＶＥＡＲＳＬＧＬＮＰ
ＮＨＩＨＩＹＳＡＳＷＧＰＥＤＤＧＫＴＶＤＧＰＡＲＬＡＥＥＡＦＦＲＧＶＳＱＧＲＧＧ
ＬＧＳＩＦＶＷＡＳＧＮＧＧＲＥＨＤＳＣＮＣＤＧＹＴＮＳＩＹＴＬＳＩＳＳＡＴＱＦＧ
ＮＶＰＷＹＳＥＡＣＳＳＴＬＡＴＴＹＳＳＧＮＱＮＥＫＱＩＶＴＴＤＬＲＱＫＣＴＥＳＨ
ＴＧＴＳＡＳＡＰＬＡＡＧＩＩＡＬＴＬＥＡＮＫＮＬＴＷＲＤＭＱＨＬＶＶＱＴＳＫＰＡ
ＨＬＮＡＮＤＷＡＴＮＧＶＧＲＫＶＳＨＳＹＧＹＧＬＬＤＡＧＡＭＶＡＬＡＱＮＷＴＴＶ
ＡＰＱＲＫＣＩＩＤＩＬＴＥＰＫＤＩＧＫＲＬＥＶＲＫＴＶＴＡＣＬＧＥＰＮＨＩＴＲＬ
ＥＨＡＱＡＲＬＴＬＳＹＮＲＲＧＤＬＡＩＨＬＶＳＰＭＧＴＲＳＴＬＬＡＡＲＰＨＤＹＳ
ＡＤＧＦＮＤＷＡＦＭＴＴＨＳＷＤＥＤＰＳＧＥＷＶＬＥＩＥＮＴＳＥＡＮＮＹＧＴＬＴ
ＫＦＴＬＶＬＹＧＴＡＰＥＧＬＰＶＰＰＥＳＳＧＣＫＴＬＴＳＳＱＡＣＶＶＣＥＥＧＦＳ
ＬＨＱＫＳＣＶＱＨＣＰＰＧＦＡＰＱＶＬＤＴＨＹＳＴＥＮＤＶＥＴＩＲＡＳＶＣＡＰＣ
ＨＡＳＣＡＴＣＱＧＰＡＬＴＤＣＬＳＣＰＳＨＡＳＬＤＰＶＥＱＴＣＳＲＱＳＱＳＳＲＥ
ＳＰＰＱＱＱＰＰＲＬＰＰＥＶＥＡＧＱＲＬＲＡＧＬＬＰＳＨＬＰＥＶＶＡＧＬＳＣＡＦ
ＩＶＬＶＦＶＴＶＦＬＶＬＱＬＲＳＧＦＳＦＲＧＶＫＶＹＴＭＤＲＧＬＩＳＹＫＧＬＰＰ
ＥＡＷＱＥＥＣＰＳＤＳＥＥＤＥＧＲＧＥＲＴＡＦＩＫＤＱＳＡＬ（配列番号１１）。

【００６０】

一実施形態では、凝固因子という用語はさらに、既知の凝固因子の相同体を含む。一実施形態では、この相同体は、凝固活性を有する。いくつかの実施形態では、本発明による相同性はまた、欠失、挿入または置換バリアントを含み、これには、そのアミノ酸置換、およびその生物学的に活性なポリペプチド断片を含む。一実施形態では、このバリアントは、凝固因子の保存的置換、または凝固因子の三次元構造を大きく変更しない欠失、挿入もしくは置換を含む。別の実施形態では、この欠失、挿入または置換は、凝固因子の目的の機能、一実施形態では、特定の結合パートナーに対する結合機能、を変更しない。

【００６１】

別の実施形態では、本開示は、凝固因子の相同体を含む。別の実施形態では、本開示は、凝固活性を有する凝固因子の相同体を含む。別の実施形態では、本開示は、機能的結合を有する凝固因子の相同体を含む。別の実施形態では、本開示は、凝固活性を有している本明細書に記載の凝固因子の相同体を含む。別の実施形態では、本開示は、機能的結合を有している本明細書に記載の凝固因子の相同体を含む。別の実施形態では、相同体は、例えば、デフォルトパラメーターを用いて、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｏｆ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）のＢｌａｓｔＰソフトウェアを用いて決定して、凝固因子に対して、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも８７％、少なくとも８９％、少なくとも９１％、少なくとも９３％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％相同であるポリペプチドである。

【００６２】

別の実施形態では、本明細書に記載された［（ＣＴＰ）ｎ＞１－凝固因子］は、カルボキシ末端のペプチド結合を介して少なくとも１個のＣＴＰ単位に連結され、アミノ末端にはＣＴＰを有さない、完全長凝固因子またはその活性断片を含む。別の実施形態では、本明細書に記載された［（ＣＴＰ）ｎ＞１－凝固因子］は、ペプチド結合を介して少なくとも１個のＣＴＰ単位に連結され、ペプチド結合を介してさらなるＣＴＰ単位に連結され、アミノ末端にはＣＴＰを有さない、凝固因子またはその活性断片を含む。別の実施形態では、１個の核酸分子は、そのＣ末端に結合された少なくとも１個のＣＴＰを含み、そのアミノ末端にはＣＴＰを含まない操作された凝固因子をコードする。

【００６３】

別の実施形態では、ＣＴＰは、リンカーを介して凝固因子に結合される。別の実施形態では、凝固因子に対してＣＴＰ配列を連結するリンカーの結合は、共有結合である。別の実施形態では、凝固因子に対してＣＴＰ配列を連結するリンカーの結合は、ペプチド結合である。別の実施形態では、凝固因子に対してＣＴＰ配列を連結するリンカーの結合は、

置換ペプチド結合である。別の実施形態では、ＣＴＰ配列は、ＤＰＲＦＱＤＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳＬＰＳＰＳＲＬＰＧＰＳＤＴＰＩＬ（配列番号１２）を含む。別の実施形態では、ＣＴＰ配列は、ＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳＬＰＳＰＳＲＬＰＧＰＳＤＴＰＩＬＰＱ（配列番号１３）を含む。別の実施形態では、ＣＴＰ配列は、配列番号１２および配列番号１３で示される配列から選択されるアミノ酸配列を含む。

【００６４】

別の実施形態では、本明細書で開示のカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）ペプチドは、配列番号１２で示されるヒト絨毛性ゴナドトロピンのアミノ酸位置１１２～１４５のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰ配列は、配列番号１３に示す、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのアミノ酸位置１１８～１４５のアミノ酸配列を含む。別の実施形態ではまた、ＣＴＰ配列は、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのアミノ酸１１２～１１８の任意の位置から始まり、１４５の位置で終わる。いくつかの実施形態では、このＣＴＰ配列のペプチドは、２８、２９、３０、３１、３２、３３または３４アミノ酸長であり、ＣＴＰアミノ酸配列の位置１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７または１１８で開始する。

【００６５】

別の実施形態では、ＣＴＰペプチドは、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第５，７１２，１２２号に記載の１～５個の保存的アミノ酸置換が天然のＣＴＰとは異なる絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰのバリアントである。別の実施形態では、ＣＴＰペプチドは、１個の保存的アミノ酸置換が天然型ＣＴＰと異なる、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰのバリアントである。別の実施形態では、ＣＴＰペプチドは、２個の保存的アミノ酸置換が天然型ＣＴＰと異なる、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰのバリアントである。別の実施形態では、ＣＴＰペプチドは、３個の保存的アミノ酸置換が天然型ＣＴＰと異なる、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰのバリアントである。別の実施形態では、ＣＴＰペプチドは、４個の保存的アミノ酸置換が天然型ＣＴＰと異なる、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰの変異体である。別の実施形態では、ＣＴＰペプチドは、５個の保存的アミノ酸置換が天然型ＣＴＰと異なる、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰの変異体である。

【００６６】

別の実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰペプチドアミノ酸配列は、天然のＣＴＰアミノ酸配列またはそのペプチドに対して少なくとも７０％相同である。別の実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰペプチドアミノ酸配列は、天然のＣＴＰアミノ酸配列またはそのペプチドに対して少なくとも８０％相同である。別の実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰペプチドアミノ酸配列は、天然のＣＴＰアミノ酸配列またはそのペプチドに対して少なくとも９０％相同である。別の実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰペプチドアミノ酸配列は、天然のＣＴＰアミノ酸配列またはそのペプチドに対して少なくとも９５％相同である。別の実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰペプチドアミノ酸配列は、天然のＣＴＰアミノ酸配列またはそのペプチドに対して少なくとも９８％相同である。

【００６７】

別の実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰペプチドをコードするポリヌクレオチドは、天然のヒトＣＴＰのＤＮＡ配列またはそのペプチドに対して少なくとも７０％相同である。別の実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰペプチドをコードするポリヌクレオチドは、天然のヒトＣＴＰのＤＮＡ配列またはそのペプチドに対して少なくとも８０％相同である。別の実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰペプチドをコードするポリヌクレオチドは、天然のヒトＣＴＰのＤＮＡ配列またはそのペプチドに対して少なくとも９０％相同である。別の実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰペプチドをコードするポリヌクレオチドは、天然のヒトＣＴＰのＤＮＡ配列またはそのペプチドに対して少なくとも９５％相同である。別の実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰペプチドをコードするポリヌクレオチドは、天然のヒトＣＴＰのＤＮＡ配列またはそのペプチドに対して少なくとも９８％相同である。

【００６８】

一実施形態では、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列の少なくとも１個が切断される。別の実施形態では、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列の両方が切断される。別の実施形態では、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列の２個が切断される。別の実施形態では、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列の３個が切断される。別の実施形態では、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列の４個が切断される。別の実施形態では、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列の５個が切断される。別の実施形態では、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列の内の２個以上が切断される。別の実施形態では、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列の全てが切断される。一実施形態では、切断されたＣＴＰは、配列番号１４の最初の１０個のアミノ酸を含む。別の実施形態では、配列番号１４は、ＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳＬＰのアミノ酸（ＡＡ）配列を含む。別の実施形態では、配列番号１４の最初の１０個のアミノ酸は、配列番号１５：ＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳに示されるものである。

【００６９】

一実施形態では、切断されたＣＴＰは、配列番号１３の最初の１０個のアミノ酸を含む。

【００７０】

一実施形態では、切断されたＣＴＰは、配列番号１３の最初の１１個のアミノ酸を含む。一実施形態では、切断されたＣＴＰは、配列番号１３の最初の１２個のアミノ酸を含む。一実施形態では、切断されたＣＴＰは、配列番号１３または配列番号１４の最初の８個のアミノ酸を含む。一実施形態では、切断されたＣＴＰは、配列番号１３の最初の１３個のアミノ酸を含む。一実施形態では、切断されたＣＴＰは、配列番号１３の最初の１４個のアミノ酸を含む。一実施形態では、切断されたＣＴＰは、配列番号１３または配列番号１４の最初の６個のアミノ酸を含む。一実施形態では、切断されたＣＴＰは、配列番号１３または配列番号１４の最初の５個のアミノ酸を含む。

【００７１】

一実施形態では、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰのアミノ酸配列の少なくとも１個が、グリコシル化されている。別の実施形態では、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列の２個が、グリコシル化されている。別の実施形態では、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列の３個が、グリコシル化されている。別の実施形態では、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列の４個が、グリコシル化されている。別の実施形態では、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列の５個が、グリコシル化されている。別の実施形態では、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列の２個以上が、グリコシル化されている。別の実施形態では、絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列の全てがグリコシル化されている。

【００７２】

一実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰ配列は、少なくとも１個のグリコシル化部位を含む。一実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰ配列は、２個のグリコシル化部位を含む。一実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰ配列は、３個のグリコシル化部位を含む。一実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰ配列は、４個のグリコシル化部位を含む。一実施形態では、１個または複数の絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列は、完全にグリコシル化されている。別の実施形態では、１個または複数の絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰアミノ酸配列は、部分的にグリコシル化されている。一実施形態では、部分的にグリコシル化されたとは、ＣＴＰグリコシル化部位の内の１個がグリコシル化されていることを示す。別の実施形態では、ＣＴＰグリコシル化部位の内の２個がグリコシル化されている。別の実施形態では、ＣＴＰグリコシル化部位の内の３個がグリコシル化されている。

【００７３】

いくつかの実施形態では、ＣＴＰ配列修飾は、低い投与量の使用を可能にする点で有利である。いくつかの実施形態では、ＣＴＰ配列修飾は、より少ない投与量を可能にする点で有利である。いくつかの実施形態では、ＣＴＰ配列修飾は、安全で長時間作用型効果を可能にする点で有利である。

【００７４】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」、「操作された凝固因子」、または「タンパク質」という用語は、本来のポリペプチド（分解生成物、人工的に合成されたポリペプチドまたは組み換えポリペプチド）およびペプチド模倣物（典型的には、人工的に合成されたポリペプチド）、ならびにペプトイドおよびセミペプトイド（ポリペプチドアナログである）を包含し、これが、いくつかの実施形態では、凝固因子を含むポリペプチドを、身体内にある間より安定にするか、または細胞内へより浸透可能とする修飾を有する。

【００７５】

いくつかの実施形態では、修飾としては、限定されないが、Ｃ末端修飾、ポリペプチド結合修飾、例えば、限定されないがＣＨ２－ＮＨ、ＣＨ２－Ｓ、ＣＨ２－Ｓ＝Ｏ、Ｏ＝Ｃ－ＮＨ、ＣＨ２－Ｏ、ＣＨ２－ＣＨ２、Ｓ＝Ｃ－ＮＨ、ＣＨ＝ＣＨ、またはＣＦ＝ＣＨなど、骨格修飾、および残基修飾が挙げられる。ペプチド模倣化合物を調製するための方法は、当技術分野で周知であり、例えば、Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ，Ｃ．Ａ．Ｒａｍｓｄｅｎ Ｇｄ．，Ｃｈａｐｔｅｒ １７．２，Ｆ．Ｃｈｏｐｌｉｎ Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ（１９９２）に記載されており、同文献は、本明細書に全体を記載したかのように、参照により組み込まれる。この点に関するさらなる詳細は以下に提供される。

【００７６】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド内のポリペプチド結合（－ＣＯ－ＮＨ－）は置換される。いくつかの実施形態では、ポリペプチド結合は、Ｎ－メチル化結合（－Ｎ（ＣＨ３）－ＣＯ－）により置換される。いくつかの実施形態では、ポリペプチド結合は、エステル結合（－Ｃ（Ｒ）Ｈ－Ｃ－Ｏ－Ｏ－Ｃ（Ｒ）－Ｎ－）により置換される。いくつかの実施形態では、ポリペプチド結合は、ケトメチレン結合（－ＣＯ－ＣＨ２－）により置換される。いくつかの実施形態では、ポリペプチド結合は、α－アザ結合（－ＮＨ－Ｎ（Ｒ）－ＣＯ－）により置換され、ここでＲは、任意のアルキル、例えば、メチル、カルバ結合（－ＣＨ２－ＮＨ－）である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド結合は、ヒドロキシエチレン結合（－ＣＨ（ＯＨ）－ＣＨ２－）により置換される。いくつかの実施形態では、ポリペプチド結合は、チオアミド結合（－ＣＳ－ＮＨ－）により置換される。いくつかの実施形態では、ポリペプチド結合は、オレフィン二重結合（－ＣＨ＝ＣＨ－）により置換される。いくつかの実施形態では、ポリペプチド結合は、レトロアミド結合（－ＮＨ－ＣＯ－）により置換される。いくつかの実施形態では、このポリペプチド結合は、ポリペプチド誘導体（－Ｎ（Ｒ）－ＣＨ２－ＣＯ－）により置換され、ここでＲは、炭素原子上に天然に存在する「正常な」側鎖である。いくつかの実施形態では、これらの修飾は、ポリペプチド鎖に沿って任意の結合で起こり、一実施形態では、同時にいくつか（２～３結合）存在する。

【００７７】

いくつかの実施形態では、Ｔｒｐ、ＴｙｒおよびＰｈｅなどのポリペプチドの天然の芳香族アミノ酸は、合成の非天然の酸、例えば、フェニルグリシン、ＴＩＣ、ナフチルエラニン（Ｎｏｌ）、Ｐｈｅの環－メチル化誘導体、Ｐｈｅのハロゲン化誘導体またはｏ－メチル－Ｔｙｒで置換される。いくつかの実施形態では、本明細書で開示のポリペプチドは、１個または複数の修飾アミノ酸または１個または複数の非アミノ酸モノマー（例えば、脂肪酸、複合糖質など）を含む。

【００７８】

いくつかの実施形態では、天然アミノ酸のグルタミン酸（Ｇｌｕ）は、翻訳後カルボキシル化され、カルボキシグルタミン酸（Ｇｌａ）の存在下で、本明細書に記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩまたはＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａを生ずる。

【００７９】

一実施形態では、「アミノ酸」または「アミノ酸配列」は、２０種の天然アミノ酸；例えば、ヒドロキシプロリン、ホスホセリンおよびホスホトレオニンを含む、多くはインビボで翻訳後修飾されたそれらのアミノ酸；ならびに限定されないが、２－アミノアジピン

酸、ヒドロキシルリシン、イソデスモシン、ノルバリン、ノルロイシンおよびオルニチンを含む他の異常アミノ酸；を包含すると理解される。一実施形態では、「アミノ酸」は、Ｄ－およびＬ－アミノ酸の両方を含む。

【００８０】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示のポリペプチドは、凝固因子を含むポリペプチドが可溶型であること必要とする治療薬に利用される。いくつかの実施形態では、本明細書で開示のポリペプチドは、１個または複数の非天然または天然の極性アミノ酸を含み、これには、限定されないが、ヒドロキシル含有側鎖に起因してポリペプチド溶解度を増大させ得るセリンおよびトレオニンが挙げられる。

【００８１】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示の操作された凝固因子は、直鎖型で利用されるが、環化が操作された凝固因子の特徴を大きく妨害しない場合、この操作された凝固因子の環型も利用可能であることが当業者には理解されよう。

【００８２】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示の操作された凝固因子は、例えば、標準の固相技術を用いることにより、生化学的に合成される。いくつかの実施形態では、これらの生化学的な方法としては、完全固相合成法、部分的固相合成法、フラグメント縮合法、または古典的な溶液合成法が挙げられる。

【００８３】

いくつかの実施形態では、組み換えタンパク質技術を用いて、本明細書で開示の操作された凝固因子が生成される。いくつかの実施形態では、組み換えタンパク質技術は、比較的長いポリペプチド（例えば、１８－２５アミノ酸より長い）の生成に用いられる。いくつかの実施形態では、組み換えタンパク質技術は、大量の本明細書で開示の操作された凝固因子の生成に用いられる。いくつかの実施形態では、組み換え技術は、Ｂｉｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５３：５１６－５４４，Ｓｔｕｄｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，（１９９０）Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８５：６０－８９，Ｂｒｉｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，（１９８４）Ｎａｔｕｒｅ ３１０：５１１－５１４，Ｔａｋａｍａｔｓｕ ｅｔ ａｌ．，（１９８７）ＥＭＢＯ Ｊ．６：３０７－３１１，Ｃｏｒｕｚｚｉ ｅｔ ａｌ．，（１９８４）ＥＭＢＯ Ｊ．３：１６７１－１６８０およびＢｒｏｇｌｉ ｅｔ ａｌ．，（１９８４）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２４：８３８－８４３，Ｇｕｒｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，（１９８６）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．６：５５９－５６５、およびＷｅｉｓｓｂａｃｈ ＆ Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ，１９８８，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ，Ｓｅｃｔｉｏｎ ＶＩＩＩ，ｐｐ４２１－４６３（これらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【００８４】

別の実施形態では、本開示は、本明細書において上記されるように、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合したゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドをコードする遺伝子のコード部分を含むポリヌクレオチド分子を提供する。別の実施形態では、本開示は、本明細書において上記されるように、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合したゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドをコードする遺伝子のコード部分からなるポリヌクレオチド分子を提供する。別の実施形態では、本開示は、本明細書において上記されるように、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合したゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドをコードする遺伝子のコード部分から本質的になるポリヌクレオチド分子を提供する。

【００８５】

別の実施形態では、本開示は、本明細書において上記されるように、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合した３個のゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。別の実施形態では、本開示は、本明細書において上記されるように、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合し

た３個のゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドからなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。別の実施形態では、本開示は、本明細書において上記されるように、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合した３個のゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドから本質的になるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド配列である。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド分子である。

【００８６】

別の実施形態では、本開示は、本明細書で記載のポリヌクレオチド分子を含む発現ベクターを提供する。別の実施形態では、第ＶＩＩ因子ポリペプチドおよび前記ＦＶＩＩポリペプチドのカルボキシ末端に結合した３個のゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）からなるＣＴＰ修飾ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが本明細書で開示される。別の実施形態では、本明細書に記載の発現ベクターから発現したＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、発現後のいくつかの時点で活性化され、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａを生じ得る。

【００８７】

別の実施形態では、本開示は、本明細書に記載の発現ベクターを含む細胞を提供する。別の実施形態では、第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）ポリペプチドおよび前記ＦＶＩＩａポリペプチドのカルボキシ末端に結合した３個のゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）からなるＣＴＰ修飾ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む細胞が本明細書で開示される。別の実施形態では、本明細書に記載の発現ベクターから発現し、細胞内に含まれるＣＴＰ－ＦＶＩＩは、細胞から分泌後に活性化され得る。

【００８８】

別の実施形態では、本開示は、本明細書に記載の発現ベクターを含む組成物を提供する。別の実施形態では、第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）ポリペプチドおよび前記ＦＶＩＩａポリペプチドのカルボキシ末端に結合した３個のゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）からなるＣＴＰ修飾ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む組成物が本明細書で開示される。

【００８９】

別の実施形態では、本開示は、本明細書に記載の細胞を含む組成物を提供する。別の実施形態では、細胞は、真核細胞である。別の実施形態では、細胞は、原核細胞である。

【００９０】

一実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを製造する方法が本明細書で開示され、該方法は、前記ＦＶＩＩのカルボキシ末端に３個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）を結合し、それにより、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを製造するステップを含む。

【００９１】

別の実施形態では、本明細書で開示の操作された凝固因子は、本明細書で開示のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を用いて合成される。いくつかの実施形態では、操作された凝固因子をコードするポリヌクレオチド分子は、シス調節配列（例えば、プロモーター配列）の転写制御を含む、発現ベクターに連結される。いくつかの実施形態では、シス調節配列は、本明細書で開示の操作された凝固因子の構成的発現を誘導するのに好適する。いくつかの実施形態では、シス調節配列は、操作された凝固因子の組織特異的な発現を誘導するのに好適する。いくつかの実施形態では、シス調節配列は、操作された凝固因子の誘導性発現を行わせるのに好適する。

【００９２】

いくつかの実施形態では、本開示での使用に好適する組織特異的プロモーターとしては、１個または複数の特定の細胞集団中で機能的である配列が挙げられる。例としては、限定されないが、肝臓特異的であるアルブミンなどのプロモーター［Ｐｉｎｋｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，（１９８７）Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１：２６８－２７７］、リンパ系特異的プロモーター［Ｃａｌａｍｅ ｅｔ ａｌ．，（１９８８）Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３：２３５－２７５］、特に、Ｔ細胞受容体のプロモーター［Ｗｉｎｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，（１

９８９）ＥＭＢＯ Ｊ．８：７２９－７３３］および免疫グロブリン、［Ｂａｎｅｒｊｉ ｅｔ ａｌ．，（１９８３）Ｃｅｌｌ ３３７２９－７４０］、ニューロン特異的プロモーター、例えば、神経フィラメントプロモーター［Ｂｙｒｎｅ ｅｔ ａｌ．，（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：５４７３－５４７７］、膵臓特異的プロモーター［Ｅｄｌｕｎｃｈ ｅｔ ａｌ．，（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：９１２－９１６］または乳腺特異的プロモーター、例えば、乳清プロモーター（米国特許第４，８７３，３１６号および欧州特許出願公開第２６４，１６６号）が挙げられる。本発明での使用に適切な誘導性プロモーターとしては、例えば、テトラサイクリン誘導性プロモーター（Ｓｒｏｕｒ，Ｍ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，２００３．Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈａｅｍｏｓｔ．９０：３９８－４０５）が挙げられる。

【００９３】

一実施形態では、「ポリヌクレオチド分子」という語句は、一本鎖または二本鎖の核酸配列を意味し、これは、ＲＮＡ配列、相補性ポリヌクレオチド配列（ｃＤＮＡ）、ゲノムポリヌクレオチド配列および／または複合ポリヌクレオチド配列（例えば、上記の組み合わせ）の形態で単離および提供される。

【００９４】

一実施形態では、「相補性ポリヌクレオチド配列」は、逆転写酵素または任意の他のＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼを用いてメッセンジャーＲＮＡの逆転写から生じる配列を意味する。一実施形態では、この配列は、ＤＮＡポリメラーゼを用いてインビボまたはインビトロで引き続き増幅できる。

【００９５】

一実施形態では、「ゲノムのポリヌクレオチド配列」は、染色体に由来する（単離された）配列を意味し、従って、これは、染色体の連続部分に相当する。

【００９６】

一実施形態では、「複合ポリヌクレオチド配列」とは、少なくとも部分的に相補性があり、少なくとも部分的にゲノムである配列を指す。一実施形態では、複合配列は、本明細書で開示のポリペプチドをコードするのに必要ないくつかのエキソン配列、およびその間に介在するいくつかのイントロン配列を包含し得る。一実施形態では、イントロン配列は、他の遺伝子を含む、任意の供給源のものであり得、典型的には、保存されたスプライシングシグナル配列を含む。一実施形態では、イントロンの配列は、シス作用性の発現調節エレメントを含む。

【００９７】

一実施形態では、発現後および分泌の前に、シグナルペプチドを、操作された前駆体凝固因子から切断して、シグナルペプチドを欠いた操作された成熟凝固因子をもたらす。別の実施形態では、分泌後に前記操作された成熟凝固因子が活性化される。

【００９８】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示のポリヌクレオチドは、ＰＣＲ技術、または当業者に既知の任意の他の方法もしくは手順を用いて調製される。いくつかの実施形態では、この手順は、２つの異なるＤＮＡ配列の連結反応を含む（例えば、"Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ", ｅｄｓ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．, Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ, １９９２、を参照されたい）。

【００９９】

一実施形態では、操作された凝固因子をコードする、本明細書で開示のポリヌクレオチドを、発現ベクター（すなわち、核酸構築物）に挿入して、組み換えポリペプチドの発現を可能にする。一実施形態では、本明細書で開示の発現ベクターは、このベクターを原核生物中での複製および組込みを好適にする追加の配列を含む。一実施形態では、本明細書で開示の発現ベクターは、このベクターを真核生物中での複製および組込みを好適にする追加の配列を含む。一実施形態では、本明細書で開示の発現ベクターは、このベクターを原核生物および真核生物の両方での複製および組込みを好適にするシャトルベクターを含む。いくつかの実施形態では、クローニングベクターは、転写および翻訳開始配列（例え

ば、プロモーター、エンハンサー）および転写および翻訳のターミネーター（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含む。

【０１００】

一実施形態では、種々の原核または真核細胞を宿主発現系として用いて、本明細書で開示の凝固因子を発現させることができる。いくつかの実施形態では、これらには、ポリペプチドコード配列を含む組換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡまたはコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換した細菌などの微生物；ポリペプチドコード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母；組換えウィルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウィルス、ＣａＭＶ；タバコモザイクウィルス、ＴＭＶ）で感染させた植物細胞系またはポリペプチドコード配列を含むＴｉプラスミドなどの組換えプラスミド発現ベクターで形質転換した植物細胞系が含まれるが、これらに限定されない。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、非細菌の発現系を用いて（例えば、ＣＨＯ細胞などの哺乳動物発現系）本明細書で開示の凝固因子を発現させる。一実施形態では、哺乳動物細胞において本明細書で開示のポリヌクレオチドを発現させるために用いられる発現ベクターは、ＣＭＶプロモーターおよびネオマイシン耐性遺伝子を含むｐＣＩ－ＤＨＦＲベクターである。ｐＣＩ－ｄｈｆｒベクターの構築は、国際出願第ＰＣＴ／ＩＬ２０１６／０５０６４５号中の一実施形態により記載される。この特許出願は、その全体が本明細書に組み込まれる。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示の細菌系で、いくつかの発現ベクターを、発現されるポリペプチドのための用途に応じて有利に選択できる。一実施形態では、大量のポリペプチドが所望される。一実施形態では、おそらく、タンパク質産物の精製が容易な細菌の周辺質中または培地中に発現産物を導く疎水性シグナル配列との融合物として、高レベルのタンパク質産物の発現を指示するベクターが望まれる。一実施形態では、特定の融合タンパク質は、ポリペプチドの回収に役立たせるように、特定の切断部位を用いて設計される。一実施形態では、このような操作に適合可能なベクターとしては、限定されないが、ｐＥＴシリーズのＥ．ｃｏｌｉ発現ベクターが挙げられる［Ｓｔｕｄｉｅｒ ｅｔａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８５：６０－８９（１９９０）］。

【０１０３】

一実施形態では、酵母発現系が使用される。一実施形態では、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含む多数のベクターを、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願第５，９３２，４４７号に開示の酵母で使用できる。別の実施形態では、酵母染色体への外来ＤＮＡ配列の組込みを促進するベクターが使用される。

【０１０４】

一実施形態では、本明細書で開示の発現ベクターはさらに、例えば、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）およびプロモーター－キメラポリペプチドのゲノム組込みのための配列などの単一のｍＲＮＡ由来のいくつかのタンパク質の翻訳を可能にする追加のポリヌクレオチド配列を含み得る。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、組み換えウィルスベクターは、本明細書で開示の凝固因子のインビボ発現に有用である。この理由は、組み換えウィルスベクターは、水平感染および標的特異性などの利点を提供するからである。一実施形態では、水平感染は、例えば、レトロウィルスのライフサイクルでは固有であり、単一の感染した細胞が多くの子孫ビリオンを生成する（分離して近隣の細胞に感染する）プロセスである。一実施形態では、結果として、広い領域が急速に感染され、そのほとんどがもとのウィルス粒子で最初に感染されたのではなかった。一実施形態では、外部に伝染できないウィルスベクターが生成される。一実施形態では、この特徴は、望ましい目的が、限られた数の標的細胞にのみ特定の遺伝子を導入することである場合に有用であり得る。

【０１０６】

一実施形態では、種々の方法を用いて、本明細書で開示の発現ベクターを細胞に導入できる。このような方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇｓ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９，１９９２），ｉｎ Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍｄ．（１９８９），Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｓｏｍａｔｉｃ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ，Ｍｉｃｈ．（１９９５），Ｖｅｇａ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ Ｍｉｃｈ．（１９９５），Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ Ｓｕｒｖｅｙ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｖｅｃｔｏｒｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｕｓｅｓ，Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ，Ｂｏｓｔｏｎ Ｍａｓｓ．（１９８８）およびＧｉｌｂｏａ ｅｔ ａｔ．［Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ４（６）：５０４－５１２，１９８６］に一般的に記載されており、例えば、組換えウィルスベクターによる安定なまたは一時的な遺伝子導入、リポフェクション、電気穿孔および感染を含む。さらに、ポジティブ－ネガティブ選択法に関する米国特許第５，４６４，７６４号および同第５，４８７，９９２号を参照されたい。これらの特許は参照により本明細書に組み込まれる。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、ウィルス感染による核酸の導入は、リポフェクションおよび電気穿孔などの他の方法を上回るいくつかの利点を提供する。この理由は、ウィルスの感染性の性質に起因して、より高い遺伝子導入効率が得られる可能性があるためである。

【０１０８】

一実施形態では、本明細書で開示の操作された凝固因子はまた、本明細書において、上記で記載された、任意の適切な投与方式を使用して個体に投与される核酸構築物から発現され得る（すなわち、インビボの遺伝子療法）ことが理解されよう。一実施形態では、この核酸構築物は、適切な細胞中へ、適切な遺伝子送達ビークル／方法（遺伝子導入、形質導入、相同組み換えなど）を介して、および必要に応じて発現系に導入され、次いで修飾された細胞が、培養により増殖されて、個体に戻される（すなわち、エキソビボの遺伝子療法）。

【０１０９】

一実施形態では、植物発現ベクターが使用される。一実施形態では、ポリペプチドコード配列の発現は、いくつかのプロモーターにより推進される。いくつかの実施形態では、ウィルスプロモーター、例えば、ＣａＭＶの３５Ｓ ＲＮＡおよび１９Ｓ ＲＮＡプロモーター［Ｂｒｉｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３１０：５１１－５１４（１９８４）］、またはＴＭＶに対するコートタンパク質プロモーター［Ｔａｋａｍａｔｓｕ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．６：３０７－３１１（１９８７）］を用いる。別の実施形態では、例えば、ＲＵＢＩＳＣＯの小サブユニット［Ｃｏｒｕｚｚｉ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．３：１６７１－１６８０（１９８４）およびＢｒｏｇｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２４：８３８－８４３（１９８４）］またはヒートショックプロモーター、例えば、大豆ｈｓｐ１７．５－Ｅまたはｈｓｐ１７．３－Ｂ［Ｇｕｒｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．６：５５９－５６５（１９８６）］などの植物プロモーターが使用される。一実施形態では、構築物は、Ｔｉプラスミド、Ｒｉプラスミド、植物ウィルスベクター、直接ＤＮＡ形質転換、微量注入、電気穿孔、および当業者に公知の他の技術を用いて植物細胞に導入される。例えば、Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ ＆ Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ［Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ，Ｓｅｃｔｉｏｎ ＶＩＩＩ，ｐｐ ４２１－４６３（１９８８）］を参照されたい。当技術分野で公知である昆虫および哺乳動物宿主細胞系などの他の発現系も本発明で使用することができる。

【０１１０】

挿入されたコード配列（ポリペプチドをコードする）の転写および翻訳のための必須の

エレメントを含む以外に、本明細書で開示の発現構築物はまた、発現されたポリペプチドの安定性、産生、精製、収率または活性を最適化するように操作された配列を含むことができることは理解されよう。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、形質転換細胞を、効果的な条件下で培養し、それにより、大量の組み換え操作された凝固因子の発現を可能にする。いくつかの実施形態では、効果的な培養条件としては、限定されないが、タンパク質生成を可能にする有効な培地、バイオリアクター、温度、ｐＨおよび酸素条件が挙げられる。一実施形態では、有効培地とは、細胞が培養されて本明細書で開示の組み換えポリペプチドが産生される任意の培地を指す。いくつかの実施形態では、培地は典型的には、同化可能な炭素、窒素およびリン酸源、ならびに適切な塩、鉱物、金属、および他の栄養素、例えばビタミンを有する水溶液を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で開示の細胞は、従来の発酵バイオリアクター、振盪フラスコ、試験管、マイクロタイターディッシュおよびペトリ皿中で培養できる。いくつかの実施形態では、培養は、組み換え細胞に適切な温度、ｐＨおよび酸素含量で行われる。いくつかの実施形態では、培養条件の決定は、当業者の専門知識の範囲内である。

【０１１２】

いくつかの実施形態では、産生のために用いられるベクターおよび宿主系に応じて、得られた本明細書で開示の操作された凝固因子は、組み換え細胞内に残るか、発酵培地中に分泌されるか、Ｅ．ｃｏｌｉ中の細胞周辺腔などの２つの細胞膜の間の空間に分泌されるか、または細胞もしくはウィルス膜の外表面上に保持される。

【０１１３】

一実施形態では、培養の所定の時間後に、組み換え操作された凝固因子の回収が実施される。

【０１１４】

一実施形態では、本明細書で用いられる「組み換え操作された凝固因子を回収する」という語句は、ポリペプチドを含有する発酵培地全体を収集することを指すものであって、分離または精製の追加のステップを意味する必要はない。

【０１１５】

一実施形態では、本明細書で開示の操作された凝固因子は、限定されないが、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、濾過、電気泳動、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、コンカナバリンＡクロマトグラフィー、等電点電気泳動および示差的可溶化などの種々の標準的なタンパク質精製技術を用いて精製される。

【０１１６】

一実施形態では、疎水性相互作用カラムの種類は、Ｃａｐｔｏ　Ｐｈｅｎｉｌ　Ｉｍｐｒｅｓｓ（ＣＩＰ）カラムである。

【０１１７】

一実施形態では、回収を容易にするために、発現されるコード配列を、本明細書で開示の操作された凝固因子および融合された切断可能部分をコードするように設計できる。一実施形態では、ポリペプチドがアフィニティクロマトグラフィーによって、（例えば、切断可能な部分に特異的なカラム上への固定によって、）容易に単離されるように、融合タンパク質を設計できる。一実施形態では、切断部位が、操作された凝固因子と切断可能部分との間となるように設計し、この部位で融合タンパク質を特異的に切断する適切な酵素または薬剤での処理によって、ポリペプチドが、クロマトグラフィーカラムから放出され得る［例えば、Ｂｏｏｔｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｌｅｔｔ．１９：６５－７０（１９８８）、およびＧａｒｄｅｌｌａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６５：１５８５４－１５８５９（１９９０）を参照］。

【０１１８】

一実施形態では、本明細書で開示の操作された凝固因子は、「実質的に純粋な」形態で回収される。別の実施形態では、実質的に純粋な操作された凝固因子は、活性型の凝固因

子をさらに含み得る。別の実施形態では、実質的に純粋な型は、少なくとも９０％純粋である。別の実施形態では、実質的に純粋な型は、少なくとも９５～９９％純粋である。

【０１１９】

一実施形態では、本明細書で開示の操作された凝固因子はまた、インビトロの発現系を用いても合成できる。一実施形態では、インビトロの合成方法は、当該分野で周知であり、この系の構成成分は、市販されている。

【０１２０】

いくつかの実施形態では、組み換え操作された凝固因子は、合成および精製され、それらの治療効力は、インビボまたはインビトロのいずれかでアッセイし得る。一実施形態では、本明細書で開示の組み換え操作された凝固因子の結合活性は、当業者に既知の種々のアッセイを用いて確認できる。

【０１２１】

本明細書に記載される構成要素またはステップを含む本明細書で開示のポリペプチド、組成物、製剤および方法は、別の実施形態では、それらの構成要素もしくはステップからなってもよく、または別の実施形態では、それらの構成要素もしくはステップから本質的になってもよいことを理解されたい。いくつかの実施形態では、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」という用語は、ＣＴＰ修飾凝固因子などの、示された活性薬剤の包含、ならびに製薬産業で既知であるような他の活性剤、および薬学的に許容可能なキャリア、賦形剤、エモリエント、安定剤などの包含を意味する。いくつかの実施形態では、「本質的に～からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」という用語は、その唯一の有効成分が示された有効成分である組成物であって、示された有効成分の治療効果には直接関与せずに、製剤を安定化、保存などするための他の化合物が含まれてもよい組成物を意味する。いくつかの実施形態では、「本質的に～からなる」という用語は、有効成分の放出を容易にする成分を意味してもよい。いくつかの実施形態では、「～からなる」という用語は、有効成分、および薬学的に許容可能なキャリア、または賦形剤を含む組成物を意味する。

【０１２２】

別の実施形態では、第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）ポリペプチドおよび前記ＦＶＩＩポリペプチドのカルボキシ末端に結合した３個のゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）からなるＣＴＰ修飾ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが本明細書で開示される。別の実施形態では、第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）ポリペプチドおよび前記ＦＶＩＩａポリペプチドのカルボキシ末端に結合した３個のゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む組成物が本明細書で開示される。一実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、シグナルペプチドを含む。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、シグナルペプチドを含まない。

【０１２３】

一実施形態では、本明細書で上記した組み換え凝固因子が本明細書で開示される。一実施形態では、本明細書で上記した操作された凝固因子が本明細書で開示される。一実施形態では、本明細書で上記した操作された凝固因子は、ＣＴＰ修飾凝固因子と呼ばれる。

【０１２４】

一実施形態では、凝固因子のカルボキシ末端に結合されるＣＴＰは、カルボキシ末端に直列に結合される。

【０１２５】

一実施形態では、本明細書に記載の操作された凝固因子は、非ＣＴＰ修飾凝固因子と比較して、同等であるか、または改善された生物学的活性を有する。別の実施形態では、本明細書に記載の操作された凝固因子は、非ＣＴＰ修飾凝固因子と比較して同等または改善された薬理学的評価値を有する。別の実施形態では、本明細書に記載の操作された凝固因子は、非ＣＴＰ修飾凝固因子と比較して同等または改善された薬物動態を有する。別の実施形態では、本明細書に記載の操作された凝固因子は、非ＣＴＰ修飾凝固因子と比較して、同等または改善された薬力学を有する。

【０１２６】
別の実施形態では、用語の「ＣＴＰペプチド」、「カルボキシ末端ペプチド」および「ＣＴＰ配列」は、本明細書において同義に用いられる。別の実施形態では、カルボキシ末端ペプチドは、完全長ＣＴＰである。
【０１２７】
他の実施形態では、操作された凝固因子という用語は、成熟した凝固因子のアミノ酸配列を意味する。他の実施形態では、操作された凝固因子という用語は、シグナル配列またはシグナルペプチドを含む凝固因子のアミノ酸配列を意味する。
【０１２８】
別の実施形態では、「シグナル配列」および「シグナルペプチド」は本明細書では同義に用いられ、全く同じ特性および意味を有する。別の実施形態では、「配列」は、ポリヌクレオチド分子に関連するときには、コード部分を指す場合がある。別の実施形態では、本明細書に記載の少なくとも１個のＣＴＰを含む操作された凝固因子は、少なくとも１個のＣＴＰを含まない同じ凝固因子と比較して、増強されたインビボ生物学的活性を有する。一実施形態では、この生物学的活性の増強は、少なくともいくつかの生物学的活性を維持すると同時に、操作された凝固因子がより長い半減期であることから生じる。別の実施形態では、この生物学的活性の増強は、ＣＴＰ修飾から生じる生物学的活性の増強から生じる。別の実施形態では、この生物学的活性の増強は、ＣＴＰ修飾凝固因子のより長い半減期と、増強された機能との両方から生じる。
【０１２９】
いくつかの実施形態では、凝固因子のカルボキシ末端の少なくとも１個のＣＴＰ配列は、凝固因子の分解に対する増強された保護を可能とする。いくつかの実施形態では、凝固因子のカルボキシ末端の少なくとも１個のＣＴＰ配列は、クリアランスに対する増強された保護を可能とする。いくつかの実施形態では、凝固因子のカルボキシ末端の少なくとも１個のＣＴＰ配列は、クリアランス時間の延長を可能とする。いくつかの実施形態では、凝固因子のカルボキシ末端の少なくとも１個のＣＴＰ配列は、そのＣｍａｘを高める。いくつかの実施形態では、凝固因子のカルボキシ末端の少なくとも１個のＣＴＰ配列は、そのＴｍａｘを高める。いくつかの実施形態では、凝固因子のカルボキシ末端の少なくとも１個のＣＴＰ配列は、そのＴ$_{1/2}$を延長させる。
【０１３０】
別の実施形態では、本発明の複合体化凝固因子を、非修飾の複合体化凝固因子と同じ方式で用いる。別の実施形態では、本発明の複合体化凝固因子は、循環半減期および血漿中滞留時間の延長、クリアランスの低下、およびインビボでの臨床活性の増大をもたらす。別の実施形態では、本明細書に記載の複合体化凝固因子の特性の改善に起因して、この複合体は、同じ凝固因子の非修飾型よりも低頻度で投与される。
【０１３１】
別の実施形態では、投与頻度の低下により、治療計画の改善がもたらされ、これは一実施形態では、患者の服薬遵守を向上させ、治療の転帰の改善、ならびに患者の生活の質の改善につながる。別の実施形態では、従来の凝固因子の複合体と比較して、本発明の複合体の分子量とリンカー構造とを有する複合体は、効力の改善、安定性の改善、ＡＵＣレベルの上昇、および循環半減期の延長がもたらされることが明らかになった。
【０１３２】
組成物および使用方法
【０１３３】
別の実施形態では、本明細書で開示の操作された凝固因子は、それ自体個々に提供し得る。一実施形態では、本明細書で開示の操作された凝固因子は、薬学的に許容可能なキャリアと混合された医薬組成物の一部として個体に提供できる。
【０１３４】
一実施形態では、「医薬組成物」または「医薬製剤」は、生理学的に適切なキャリアおよび賦形剤などの他の化学成分を含む、本明細書で記載の１種または複数の有効成分の配

合物を意味する。医薬組成物または「医薬製剤」の目的は、生物に対する化合物の投与を容易にすることである。特定の実施形態では、「医薬組成物」または「医薬製剤」は、医薬品剤形の薬物を提供する。特定の実施形態では、「医薬組成物」または「医薬製剤」は、持続放出技術、経皮貼付剤、または当該技術分野において既知の任意の剤形を含む。

【０１３５】

別の実施形態では、「有効成分」とは、生物学的効果を説明可能な、目的のポリペプチド配列を意味する。

【０１３６】

別の実施形態では、本明細書で開示の任意の組成物は、任意の形態で、目的の操作された凝固因子のカルボキシ末端にのみ結合する少なくとも１個のＣＴＰ配列を含む。一実施形態では、混合製剤が本明細書で開示される。一実施形態では、「混合製剤」は、上記で定義した組み合わせ相手が、独立して投与されるか、または特徴量の組み合わせ相手との異なる一定の組み合わせの使用により、すなわち、同時に、並行して、別々にまたは順次投与され得るという意味において、特に「パーツキット」を定義する。いくつかの実施形態では、パーツキットのパーツは、その後、例えば、同時にまたは経時的に交互に、すなわち、異なる時点でおよびパーツキットの任意のパーツについて等しい時間間隔または異なる時間間隔で投与することができる。いくつかの実施形態では、合計量に対する一定比率の組み合わせ相手を、混合製剤として投与することができる。一実施形態では、例えば、治療される患者の亜集団のニーズまたは異なるニーズが特定の疾患、疾患の重症度、年齢、性別、または体重によるものであり得る単一患者のニーズに対処するために、混合製剤を変更することができ、これは当業者が容易に行うことができる。

【０１３７】

別の実施形態では、ＦＶＩＩａポリペプチドおよび前記ＦＶＩＩａのカルボキシ末端に結合した３個のゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）からなるＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドを含む医薬組成物または医薬製剤が本明細書で開示される。

【０１３８】

別の実施形態では、本明細書において、本明細書に記載の複合体化凝固因子を含む組成物が提供される。別の実施形態では、本明細書において、本明細書に記載の複合体化凝固因子を含む医薬組成物が提供される。別の実施形態では、本明細書において、治療有効量の、本明細書に記載の複合体化凝固因子を含む医薬組成物が提供される。一実施形態では、複合体化凝固因子の治療有効量は、治療される特定の状態、治療される患者の状態、および組成物中の他の成分などの因子に応じて決定される。

【０１３９】

一実施形態では、本開示は、本開示の組成物、処方、および方法での使用のための医薬製剤を提供する。別の実施形態では、本開示は、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合した３個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドからなるポリペプチドを含む医薬製剤を提供する。別の実施形態では、医薬製剤は、緩衝液および等張化剤をさらに含む。別の実施形態では、緩衝液は２０ｍＭのクエン酸塩および１３．３ｍＭのグリシンであり、等張化剤は１５０ｍＭのＮａＣｌである。別の実施形態では、製剤は約６．４のｐＨである。別の実施形態では、緩衝液は２０ｍＭのクエン酸塩および１３．３ｍＭのグリシンであり、等張化剤は１５０ｍＭのＮａＣｌで、ｐＨは６．４である。別の実施形態では、緩衝液は２０ｍＭのクエン酸塩および１００ｍＭのアルギニン、２％トレハロースであり、ｐＨは６．２である。別の実施形態では、製剤は液体製剤である。別の実施形態では、製剤は凍結乾燥製剤である。別の実施形態では、液体製剤は、凍結乾燥したＣＴＰ修飾凝固因子を使って形成し得る。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子は、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子は、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３である。

【０１４０】

別の実施形態では、本明細書で提供される医薬製剤を含む週１回剤形が本明細書で提供

される。別の実施形態では、本明細書で提供される医薬製剤を含む１日１回剤形が本明細書で提供される。別の実施形態では、本明細書で提供される医薬製剤を含む１日おきの剤形が本明細書で提供される。別の実施形態では、本明細書で提供される医薬製剤を含む３日毎の剤形が本明細書で提供される。別の実施形態では、本明細書で提供される医薬製剤を含む週２回剤形が本明細書で提供される。別の実施形態では、本明細書で提供される医薬製剤を含む週２回剤形が本明細書で提供される。別の実施形態では、本明細書で提供される医薬製剤を含む毎週１回剤形が本明細書で提供される。別の実施形態では、本明細書で提供される医薬製剤を含む２週１回（２週毎）剤形が本明細書で提供される。

【０１４１】

別の実施形態では、凝固因子および前記凝固因子のカルボキシ末端に結合した３個の絨毛性ゴナドトロピンＣＴＰからなるポリペプチドを含む製剤が本明細書で開示され、前記ポリペプチドは、必要に応じて、シグナルペプチドからなり、前記製剤は安定性が増加している。一実施形態では、製剤は少なくとも１年間は安定である。別の実施形態では、製剤は少なくとも２年間は安定である。

【０１４２】

一実施形態では、ＣＴＰで修飾された凝固因子は、液体製剤に処方される。別の実施形態では、ＣＴＰで修飾された第ＶＩＩ因子は、液体製剤に処方される。別の実施形態では、ＣＴＰで修飾された第ＶＩＩａ因子は、液体製剤に処方される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、鼻腔内用の剤形に処方される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、注入可能剤形に処方される。

【０１４３】

別の実施形態では、本開示の方法は、凝固因子療法の使用において、服薬遵守を向上させることを含み、該方法は、ＣＴＰにより修飾された凝固因子を、それを必要としている対象に提供し、それにより、凝固因子治療薬の使用において、服薬遵守を向上させることを含む。

【０１４４】

別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に１日１回投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子を含むポリペプチドは、対象に２日毎に１回投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に３日毎に１回投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に４日毎に１回投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に５日毎に１回投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に６日毎に１回投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に１週１回投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に７～１４日毎に１回投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に１０～２０日毎に１回投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に５～１５日毎に１回投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に１５～３０日毎に１回投与される。

【０１４５】

一実施形態では、本明細書で開示の製剤は、シリンジまたはペン型デバイスを介した注入用の液体製剤に処方される。

【０１４６】

一実施形態では、本明細書で提供される製剤は、塩化ベンザルコニウムおよびチメロサールなどの防腐剤；エデト酸ナトリウムなどのキレート剤；リン酸、クエン酸および酢酸などの緩衝剤；塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、およびマンニトールなどの等張化剤；アスコルビン酸、アセチルシステン、メタ重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；芳香剤；セルロースおよびその誘導体を含むポリマーなどの粘度調整剤；ポリビニルアルコール、ならびに必要に応じてこれらの水性組成物のｐＨを調整するための酸および塩基も含む。組成物は、局所麻酔薬、または他の活性物質も含む。組成物はスプレー、ミスト、および点滴薬などとして使用することができる。

【０１４７】
一実施形態では、本明細書に記載の凝固因子は、ヒト凝固因子である。
【０１４８】
別の実施形態では、本明細書に記載の複合体化凝固因子は、血液凝固異常または血液凝固障害に罹患している対象の治療に有用である。別の実施形態では、血液凝固異常または血液凝固障害は血友病である。別の実施形態では、本明細書に記載の複合体化凝固因子は、血友病の予防的治療に有用であり、従って、出血および関連の合併症のリスクを低減させるのに有用である。別の実施形態では、出血および関連合併症のリスクの低減は、自然発生的出血のリスクを減らす。別の実施形態では、出血および関連合併症のリスクの低減は、過度の出血のリスクを減らす。別の実施形態では、本明細書に記載の複合体化凝固因子は、外因的に投与された凝固因子に対して阻害性の抗体を発生させるリスクを低減させながら、血友病に罹患している対象を治療するのに有用である。別の実施形態では、本明細書に記載の複合体化凝固因子は、血友病に罹患している対象を治療するのに、従って、恒常性を誘導するのに有用である。
【０１４９】
一実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰ修飾凝固因子は、いくつかの治療用途を有する。別の実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰ修飾凝固因子は、いくつかの予防的用途を有する。
【０１５０】
別の実施形態では、本明細書に記載の複合化凝固因子は、過剰な出血もしくは内出血を受けた対象、または長いプロトロンビン時間（ＰＴ）もしくは部分トロンボプラスチン時間（ＰＴＴ）を有する対象の治療に有用である。別の実施形態では、本明細書に記載の複合体化凝固因子は、ビタミンＫ欠乏または肝疾患などの出血の原因となる後天性の状態を有する対象の治療に有用である。別の実施形態では、本明細書に記載の複合体化凝固因子は、後天性（他の疾患に起因する）または遺伝性、軽度または重度、継続的または一時的な凝固因子の欠損がある対象の治療に有用である。別の実施形態では、本明細書に記載の複合体化凝固因子は、血友病Ａに罹患している対象の治療に有用である。別の実施形態では、本明細書に記載の複合体化凝固因子は、血友病Ｂに罹患している対象の治療に有用である。別の実施形態では、本明細書に記載の複合体化凝固因子は、肝疾患もしくは癌などの慢性疾患、急速に凝固因子を使い果たす播種性血管内凝固症候群（ＤＩＣ）などの急性状態、またはビタミンＫ欠乏症、もしくはワーファリンなどのビタミンＫアンタゴニストによる治療（第ＩＩ因子、第ＶＩＩ因子、第ＩＸ因子、および第Ｘ因子の産生には、ビタミンＫを要する）に起因する後天性の欠陥がある対象の治療に有用である。別の実施形態では、本明細書に記載の複合体化凝固因子は、限定するものではないが、肝疾患、尿毒症、癌、骨髄障害、ヘビ毒に対する暴露、ビタミンＫ欠乏、抗凝固療法、抗凝固剤ワーファリンの偶発的摂取、複数回輸血（貯蔵血液単位は、その凝固因子の一部を失う）、またはそれらの組み合わせなどの凝固の不均衡を生じる疾患に罹患している対象の治療に有用である。別の実施形態では、対象の深部静脈血栓症を治療する方法が本明細書で開示され、該方法は、本明細書で開示のＣＴＰ修飾凝固因子を投与することを含む。別の実施形態では、血友病の対象の無制御出血を防ぐ方法が本明細書で開示され、該方法は、本明細書で開示のＣＴＰ修飾凝固因子を投与することを含む。別の実施形態では、血友病の対象の出血症状を防ぐ方法が本明細書で開示され、該方法は、本明細書で開示のＣＴＰ修飾凝固因子を投与することを含む。別の実施形態では、血友病Ｂ（先天性の第ＩＸ因子欠損）の対象の出血症状を制御する方法が本明細書で開示される。
【０１５１】
一実施形態では、本発明の組成物は、本明細書に記載の製剤を含む。別の実施形態では、本発明の方法は、本明細書に記載の製剤を投与することを含む。別の実施形態では、本発明の方法は、本明細書に記載の製剤を含む組成物を投与することを含む。
【０１５２】
一実施形態では、血液凝固障害または血液凝固異常を予防または治療する方法が本明細

書で開示される。別の実施形態では、対象の血友病を予防または治療する方法が本明細書で開示され、該方法は、本明細書で開示のＣＴＰ修飾凝固因子を投与することを含む。別の実施形態では、対象の血友病を予防および治療する方法が本明細書で開示され、該方法は、本明細書で開示のＣＴＰ修飾凝固因子を投与することを含む。別の実施形態では、対象の血友病を治療する方法が本明細書で開示され、該方法は、本明細書で開示のＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子を投与することを含む。

【０１５３】

一実施形態では、血友病は、血友病Ａである。別の実施形態では、血友病は、血友病Ｂである。別の実施形態では、血液凝固障害または血液凝固異常を予防または治療する本発明の方法は、ＦＶＩＩＩまたはＦＩＸに対する阻害物質を伴うそれぞれ血友病ＡまたはＢの患者の血友病を予防または治療する。別の実施形態では、本発明の方法は、後天性血友病（阻害物質を伴わない血友病）の患者を予防または治療するための方法である。別の実施形態では、血液凝固障害または血液凝固異常を予防または治療する本発明の方法は、阻害物質を伴わない血友病ＡまたはＢを予防または治療する。別の実施形態では、血友病は、重篤な血友病である。別の実施形態では、血友病は、中等度の血友病である。別の実施形態では、血友病は、阻害物質を伴うまたは伴わない、中等度から重篤までの血友病である。用語の「中程度から重篤までの血友病」は、３％以下のＦＶＩＩＩまたはＦＩＸを有する対象を意味することは、当業者には理解されよう。別の実施形態では、重篤な血友病は、約０～１％に相当する凝固因子レベルを包含し得る。別の実施形態では、血友病は、中等度の血友病であり、これは、別の実施形態では、凝固因子のレベルが１～５％である血友病を表す。別の実施形態では、血友病は、軽度の血友病であり、これは、別の実施形態では、凝固因子のレベルが５～５０％である血友病を表す。

【０１５４】

別の実施形態では、対象の血液凝固障害または血液凝固異常を予防または治療する方法が本明細書で開示され、該方法は、ＦＶＩＩａポリペプチドおよび前記ＦＶＩＩａポリペプチドのカルボキシ末端に結合した３個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）を含むＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩ）ポリペプチドを前記対象に投与し、それにより、前記対象の血液凝固障害または血液凝固異常を予防または治療することを含む。

【０１５５】

別の実施形態では、対象の血友病を予防または治療する方法が本明細書で開示され、該方法は、ＦＶＩＩａポリペプチドおよび前記ＦＶＩＩａポリペプチドのカルボキシ末端に結合した３個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）を含むＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドを、前記対象に投与し、それにより、前記対象の血友病を予防または治療することを含む。

【０１５６】

別の実施形態では、対象の血友病を血友病する方法が本明細書で開示され、該方法は、本明細書に記載の１個または複数のＣＴＰ修飾凝固因子を前記対象に投与することを含む。したがって、一実施形態では、対象の血友病を治療する方法が本明細書で開示され、該方法は、ＦＶＩＩａポリペプチドおよび前記ＦＶＩＩａポリペプチドのカルボキシ末端に結合した３個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）を含むＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドを、前記対象に投与し、それにより、前記対象の血友病を治療することを含む。一実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは、同じ組成物中で同時に投与される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは、別々の組成物として、同時に投与される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは、別々の組成物として、別々の時点に投与される。

【０１５７】

別の実施形態では、対象の血友病を予防または治療する方法が本明細書で開示され、該方法は、ＦＶＩＩａポリペプチドおよび前記ＦＶＩＩａポリペプチドのカルボキシ末端に結合した３個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）を前記対象に投

与し、それにより、前記対象の血友病を予防または治療することを含む。

【０１５８】

別の実施形態では、対象の血友病を予防または治療する方法が本明細書で開示され、該方法は、ＦＶＩＩａポリペプチドおよび前記ＦＶＩＩａポリペプチドのカルボキシ末端に結合した３個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）を含むＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子ポリペプチドを、前記対象に皮下または静脈内投与し、それにより、前記対象の血友病を予防または治療することを含む。いくつかの実施形態では、対象の血友病を予防または治療する方法が本明細書で提供され、該方法は、対象にＣＴＰ修飾凝固因子を投与し、それにより、前記対象の血友病を防止するステップを含み、該ＣＴＰ修飾凝固因子は、前記凝固因子ポリペプチドのカルボキシ末端に結合した３～５個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）を含み、前記ＣＴＰ修飾凝固因子は、配列番号５または７からなる群より選択される。別の実施形態では、前記ＣＴＰ修飾凝固因子は、配列番号５または７からなる群から選択される。別の実施形態では、前記ＣＴＰ修飾凝固因子は、配列番号７からなる。別の実施形態では、配列番号７からなる前記ＣＴＰ修飾凝固因子は、活性化ＦＶＩＩ（ＦＶＩＩａ）を含む。

【０１５９】

別の実施形態では、対象の血友病を治療する方法が本明細書で開示され、該方法は、ＦＶＩＩａポリペプチドおよび前記ＦＶＩＩａポリペプチドのカルボキシ末端に結合した３個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）を含む活性化ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドを、前記対象に投与し、それにより、前記対象の血友病を治療することを含む。

【０１６０】

別の実施形態では、皮下（ＳＣ）投与は、組み換えＦＶＩＩと比較して、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩのより高いバイオアベイラビリティをもたらす。別の実施形態では、ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）のＳＣ投与に比較した場合、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のＳＣ投与後、半減期はより長く、バイオアベイラビリティ（ＡＵＣ　ＳＣ／ＡＵＣ　ＩＶ）はより大きい。別の実施形態では、皮下注射ＭＯＤ－５０１４は、組み換えＦＶＩＩ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標））と比較して、マウス生存の改善を示す。

【０１６１】

一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４は、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$（Ｃ末端に結合した３個のＣＴＰペプチドを有する）である。一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４は、長時間作用型凝固因子を提供する。一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４は、組換え型ヒトＦＶＩＩａと比較して、より持続性で、長期の血液凝固反応をもたらす。用語のＭＯＤ－５０１４またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$は、全く同じ特性および意味を持ち、同義に使用してよく、また、一実施形態では、アミノ酸配列番号７を含むジスルフィド結合二本鎖ヘテロダイマー構造体を意味し得ることは当業者なら理解されよう。さらに、当業者なら、本明細書での、ＣＴＰ修飾凝固因子、例えば、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$の説明において、用語のＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$は、特定の場合には、不活性形態のＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$を意味し得ることを理解するであろう。当業者なら、どの形態が活性などの関連する詳細に基づいて言及されているかを確実にわかるであろう。同様に、用語のＭＯＤ－５０１４は、用語のＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$と同義、すなわち、ＣＴＰ修飾凝固因子の活性型を表すが、特定の場合には、用語のＭＯＤ－５０１４は、ＦＶＩＩの活性型またはＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$をコードするヌクレオチド配列の意味に使用され得る。このヌクレオチド配列は、その後、細胞から発現および分泌され、精製されて、インビトロで活性化され、ＭＯＤ－５０１４分子中に存在する活性型のＦＶＩＩａを生ずる。

【０１６２】

一実施形態では、組織因子経路阻害物質（ＴＦＰＩ）によるＭＯＤ－５０１４の失活は、用量依存性である。一実施形態では、ＴＦＰＩによるＭＯＤ－５０１４の失活は、ＴＦＰＩによる組換えＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標））の用量依存性失活パターンへの類似性を示す。一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４は、抗トロンビンＩＩＩによ

り阻害される。一実施形態では、抗トロンビンＩＩＩによるＭＯＤ－５０１４の阻害は、ヘパリンの存在下で増強される。一実施形態では、抗トロンビンＩＩＩによるＭＯＤ－５０１４の阻害は、ヘパリンの存在下または非存在下で、組換えＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標））の阻害パターンとの類似性を示す。

【０１６３】

一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４は、用量依存性方式でトロンビンを生成する。一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４はトロンビン生成の誘導期を短くする。一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４は血液凝固時間を短くする。一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４は血餅形成の効率を高める。一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４の投与は対象における血液凝固時間を短くする。一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４の投与は対象における血餅形成の効率を高める。一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４によるトロンビンの生成は、組換えＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標））により産生されるものに類似である。一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４によるトロンビンの生成の誘導期の短縮は、組換えＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標））により生ずるものに類似である。一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４による血液凝固時間の短縮は、組換えＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標））によりもたらされるものに類似である。一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４による血液凝固形成効率の上昇は、組換えＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標））によりもたらされるものに類似である。

【０１６４】

本明細書にて提供される場合、血液凝固因子、例えば、ＦＶＩＩ因子へのＣＴＰの結合は、血液凝固因子の半減期を延長する。実施例は、ＣＴＰ結合、例えば、ＦＶＩＩＡに結合した３個のＣＴＰは、血液凝固活性に影響を与えるようには見えない。一実施形態では、ＦＶＩＩへのＣＴＰ結合は、血餅形成を妨害しない。一実施形態では、ＦＶＩＩへのＣＴＰ結合は、血餅形成効率の上昇を妨げない。一実施形態では、ＦＶＩＩへのＣＴＰ結合は、血液凝固時間の短縮を妨げない。一実施形態では、リン脂質のＦＶＩＩへの結合は、ＣＴＰの血液凝固因子への結合後にも維持される。一実施形態では、ＦＶＩＩＡへのＣＴＰ結合は、血餅形成を妨げない。一実施形態では、ＦＶＩＩＡへのＣＴＰ結合は、血餅形成効率の上昇を妨げない。一実施形態では、ＦＶＩＩＡへのＣＴＰ結合は、血餅形成の減少を妨げない。一実施形態では、リン脂質のＦＶＩＩＡへの結合は、ＣＴＰの血液凝固因子への結合後にも維持される。

【０１６５】

別の実施形態では、対象の血友病を治療する方法が本明細書で開示され、該方法は、本明細書に記載のＣＴＰ修飾凝固因子を前記対象に投与することを含む。

【０１６６】

他の実施形態では、操作された凝固因子は、血友病Ｂ患者の治療のためのものである。ＭＯＤ－５０１４の大きな哺乳動物（イヌ）への投与の結果。ＭＯＤ－５０１４の投与により、血液凝固のための効果的で安全な長時間作用型ＦＶＩＩａが提供された（国際出願第ＰＣＴ／ＩＬ２０１６／０５０６４５号を参照されたい。この特許は全体が本明細書に組み込まれる）。ＭＯＤ－５０１４を使用した治療は、予防型または応需型であってよい。一実施形態では、対象の血友病を治療する方法が本明細書で開示され、該方法は、ＭＯＤ－５０１４を前記対象に投与し、それにより、前記対象の血友病を治療することを含む。一実施形態では、対象の過度の出血を防止する方法が本明細書で開示され、該方法は、ＭＯＤ－５０１４を前記対象に投与し、それにより、前記対象の過度の出血を防止することを含む。一実施形態では、対象の血友病を予防的に治療する方法が本明細書で開示され、該方法は、ＭＯＤ－５０１４を前記対象に投与し、それにより、前記対象の血友病を予防的に治療することを含む。

【０１６７】

一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４による対象の血友病の治療は、組換えＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標））と比べて、ＭＯＤ－５０１４の投与頻度の低減を含む。一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４による対象の血友病の予防的治療は、組換えＦＶＩ

Ｉａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標））と比べて、ＭＯＤ－５０１４の投与頻度の低減を含む。一実施形態では、ＭＯＤ－５０１４による対象の血友病の予防は、組換えＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標））と比べて、ＭＯＤ－５０１４の投与頻度の低減を含む。

【０１６８】

一実施形態では、カルボキシ末端に３個のＣＴＰを直列に含む第ＶＩＩ凝固因子は、ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）との対比でその凝固活性を維持すると同時に、改善されたＰＫプロファイルを示す。

【０１６９】

別の実施形態では、本明細書で開示の組成物、製剤および方法は、ＦＶＩＩＩまたはＦＩＸに対する阻害物質を伴う血友病ＡまたはＢの患者における、および後天性の血友病の患者における出血症状の治療のためのものであり；ＦＶＩＩＩまたはＦＩＸに対する阻害物質を伴う血友病ＡまたはＢの患者における、および後天性の血友病の患者における、外科的介入または侵襲手術における出血の防止のためのものであり；先天性のＦＶＩＩ欠損症の患者での出血症状の治療および先天性のＦＶＩＩ欠損症の患者での外科的介入または侵襲手術における出血の防止のためのものである。後天性血友病は、以前に通常の止血であった患者で、凝固因子、大抵の場合ＦＶＩＩＩに対する、自己抗体が発生した、自然発生的自己免疫障害である。ＦＶＩＩＩに対する自己抗体の発生は、ＦＶＩＩＩ欠損に繋がり、これにより、凝固カスケードの内因性経路を介した第ＩＸａ因子および第ＶＩＩＩａ因子複合体によるトロンビンの生成が不十分になる。次の状態は、後天性血友病Ａと関連し得る：特発性、妊娠、自己免疫障害、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、皮膚疾患（例えば、乾癬、天疱瘡）、呼吸器疾患（例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患）、アレルギー性薬物反応、糖尿病、急性Ｂ型肝炎感染、急性Ｃ型肝炎感染、悪性病変－固形腫瘍（前立腺、肺、結腸、膵臓、胃、胆管、頭頸部、子宮頸部、乳房、黒色腫、腎臓）、血液系腫瘍。当業者なら、自己免疫障害は、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、側頭動脈炎、シェーグレン症候群、自己免疫性溶血性貧血、グッドパスチャー症候群、重症筋無力症、グレーブス病、自己免疫性甲状腺機能低下症を含み得ることは理解されよう。当業者なら、アレルギー反応は、ペニシリンおよびその誘導体、スルファミド、フェニトイン、クロラムフェニコール、メチルドパ、デポ・チオキサンテン、インターフェロンアルファ、フルダラビン、カルメット・ゲラン桿菌（ＢＣＧ）ワクチン接種、デスベンラファキシンから起こり得ることは理解されよう。当業者なら、血液系腫瘍には、慢性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、骨髄異形成症候群、骨髄線維症、および赤白血病を含み得ることは理解されよう。したがって、一実施形態では、対象の後天性血友病を治療する方法が本明細書で提供され、該方法は、本明細書で提供されるいずれかの組成物を対象に投与することを含む。

【０１７０】

別の実施形態では、本明細書で開示の組成物、製剤、および方法は、筋肉出血の治療または予防のためのものである。別の実施形態では、本明細書で開示の組成物、製剤、および方法は、関節出血の治療または予防のためのものである。別の実施形態では、本明細書で開示の組成物、製剤、および方法は、鼻血および歯茎出血、粘膜出血、中枢神経系への出血の治療的または予防的な処置を提供する。別の実施形態では、本明細書で開示の組成物、製剤、および方法は、消化管または脳出血の治療的または予防的な処置を提供する。別の実施形態では、本明細書で開示の組成物、製剤、および方法は、低頻度の軽度出血の治療的または予防的な処置を提供する。別の実施形態では、本明細書で開示の組成物、製剤、および方法は、低頻度の中等度の出血の治療的または予防的な処置を提供する。別の実施形態では、本明細書で開示の組成物、製剤、および方法は、高頻度の軽度出血の治療的または予防的な処置を提供する。別の実施形態では、本明細書で開示の組成物、製剤、および方法は、高頻度の中等度の出血の治療的または予防的な処置を提供する。

【０１７１】

一実施形態では、本明細書で開示の組成物、製剤、および方法は、無症候性の血友病の

治療的または予防的な処置を提供する。別の実施形態では、本明細書で開示の組成物、製剤、および方法は、軽度から中度の血友病の治療的または予防的な処置を提供する。別の実施形態では、本明細書で開示の組成物、製剤、および方法は、重篤な血友病の治療的または予防的な処置を提供する。

【０１７２】

一実施形態では、本明細書で開示の組成物、製剤、および方法は、一実施形態では、制御不能な出血であり、別の実施形態では、脳内出血である、出血の治療的または予防的な処置を提供する。別の実施形態では、本明細書で開示の組成物、製剤、および方法は、新生児凝固障害、重度の肝疾患、高リスクの外科的手術、外傷性失血、骨髄移植、血小板減少症および血小板機能障害、経口抗凝固薬の緊急逆転、第Ｖ因子、第ＶＩＩ因子、第Ｘ因子および第ＸＩ因子の先天性の欠損症、またはフォン・ヴィレブランド病、一実施形態では、フォン・ヴィレブランド因子に対する阻害物質を伴うフォン・ヴィレブランド病の治療的または予防的な処置を提供する。

【０１７３】

一実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰ修飾凝固因子は、対象における、本明細書に記載の血友病または関連の疾患の治療のためのものである。一実施形態では、対象はヒトである。別の実施形態では、対象はヒトの小児である。別の実施形態では、対象は、家畜（ｄｏｍｅｓｔｉｃａｔｅｄ　ａｎｉｍａｌ）である。別の実施形態では、対象は哺乳動物である。別の実施形態では、対象は、家畜（ｆａｒｍ　ａｎｉｍａｌ）である。別の実施形態では、対象はサルである。別の実施形態では、対象はウマである。別の実施形態では、対象は雌ウシである。別の実施形態では、対象はマウスである。別の実施形態では、対象は、ラットである。別の実施形態では、対象は、イヌである。別の実施形態では、対象は、ネコである。別の実施形態では、対象は、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、マウスまたはシカである。一実施形態では、対象は、雄性である。別の実施形態では、対象は、雌性である。一実施形態では、対象は、小児であり、別の実施形態では、青年期であり、別の実施形態では、成体であるか、または、別の実施形態では、より高齢の対象である。別の実施形態では、対象は、小児の対象であり、別の実施形態では、高齢の対象である。

【０１７４】

別の実施形態では、「生理学的に許容可能なキャリア」および「薬学的に許容可能なキャリア」という語句は同義に用いられ、生物体に対して顕著な刺激を生じず、また、投与された化合物の生物学的活性および特性を阻害しないキャリアまたは希釈剤を意味する。アジュバントはこれらの語句に包含される。一実施形態では、薬学的に許容可能なキャリアに含まれる成分の内の１つは、例えば、有機媒体および水性媒体の両方の中で広範な溶解度を有する生体適合性ポリマーであるポリエチレングリコール（ＰＥＧ）とすることができる。

【０１７５】

別の実施形態では、「賦形剤」は、有効成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加された不活性物質を意味する。一実施形態では、賦形剤としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖類および様々な種類のデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコールを挙げることができる。

【０１７６】

薬物の処方および投与のための技術は、参照により本明細書に組み込まれる、"Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ's　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，"Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ、の最新版に見られる。

【０１７７】

投薬範囲の種々の実施形態は、本発明により意図されている。本明細書で開示の操作された凝固因子の投与量は、一実施形態では、０．００５～１００ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、０．００５～５ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、０．０１～５０ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、０．１～２０ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、０．１～１０ｍｇ／日の

範囲である。別の実施形態では、投与量は、０．０１～５ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、０．００１～０．０１ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、０．００１～０．１ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、０．１～５ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、０．５～５０ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、０．２～１５ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、０．８～６５ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、１～５０ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、５～１０ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、８～１５ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、１０～２０ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、２０～４０ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、６０～１２０ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、１２～４０ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、４０～６０ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、５０～１００ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、１～６０ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、１５～２５ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、５～１０ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、５５～６５ｍｇ／日の範囲である。

【０１７８】

別の実施形態では、投与量は、５０～５００ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、５０～１５０ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、１００～２００ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、１５０～２５０ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、２００～３００ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、２５０～４００ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、３００～５００ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、３５０～５００ｍｇ／日の範囲である。

【０１７９】

一実施形態では、投与量は、２０ｍｇ／日である。一実施形態では、投与量は、３０ｍｇ／日である。一実施形態では、投与量は、４０ｍｇ／日である。一実施形態では、投与量は、５０ｍｇ／日である。一実施形態では、投与量は、０．０１ｍｇ／日である。別の実施形態では、投与量は、０．１ｍｇ／日である。別の実施形態では、投与量は、１ｍｇ／日である。別の実施形態では、投与量は、０．５３０ｍｇ／日である。別の実施形態では、投与量は、０．０５ｍｇ／日である。別の実施形態では、投与量は、５０ｍｇ／日である。別の実施形態では、投与量は、１０ｍｇ／日である。別の実施形態では、投与量は、２０～７０ｍｇ／日である。別の実施形態では、投与量は、５ｍｇ／日である。

【０１８０】

一実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子の投与量は、１～５ｍｇ／日である。一実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子の投与量は、１～３ｍｇ／日である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子の投与量は、２ｍｇ／日である。

【０１８１】

別の実施形態では、投与量は、１～９０ｍｇ／日の範囲である。別の実施形態では、投与量は、１～９０ｍｇ／２日である。別の実施形態では、投与量は、１～９０ｍｇ／３日である。別の実施形態では、投与量は、１～９０ｍｇ／４日である。別の実施形態では、投与量は、１～９０ｍｇ／５日である。別の実施形態では、投与量は、１～９０ｍｇ／６日である。別の実施形態では、投与量は、１～９０ｍｇ／週である。別の実施形態では、投与量は、１～９０ｍｇ／９日である。別の実施形態では、投与量は、１～９０ｍｇ／１１日である。別の実施形態では、投与量は、１～９０ｍｇ／１４日である。

【０１８２】

別の実施形態では、凝固因子の投与量は、１０～５０ｍｇ／日である。別の実施形態では、投与量は、１０～５０ｍｇ／２日である。別の実施形態では、投与量は、１０～５０ｍｇ／３日である。別の実施形態では、投与量は、１０～５０ｍｇ／４日である。別の実施形態では、投与量は、１０～５０マイクログラムｍｇ／５日である。別の実施形態では

、投与量は、１０～５０ｍｇ／６日である。別の実施形態では、投与量は、１０～５０ｍｇ／週である。別の実施形態では、投与量は、１０～５０ｍｇ／９日である。別の実施形態では、投与量は、１０～５０ｍｇ／１１日である。別の実施形態では、投与量は、１０～５０ｍｇ／１４日である。

【０１８３】

別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、経鼻剤形で処方される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、注射可能剤形で処方される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に、０．０００１ｍｇ～０．６ｍｇの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に０．００１ｍｇ～０．００５ｍｇの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に０．００５ｍｇ～０．０１ｍｇの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に、０．０１ｍｇ～０．３ｍｇの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に０．２ｍｇ～０．６ｍｇの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、凝固因子は、そのアミノ末端にＣＴＰを含まない。

【０１８４】

別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に１～１００マイクログラムの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に１０～８０マイクログラムの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に２０～６０マイクログラムの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に１０～５０マイクログラムの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に、４０～８０マイクログラムの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に１０～３０マイクログラムの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に３０～６０マイクログラムの範囲の用量で投与される。

【０１８５】

別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に、０．２ｍｇ～２ｍｇの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に、２ｍｇ～６ｍｇの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に、４ｍｇ～１０ｍｇの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に、５ｍｇ～１５ｍｇの範囲の用量で投与される。

【０１８６】

一実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に、１０μｇ／ｋｇ～１０００μｇ／ｋｇの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に、２５μｇ／ｋｇ～６００μｇ／ｋｇの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に、５０μｇ／ｋｇ～４００μｇ／ｋｇの範囲の用量で投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に、約２５μｇ／ｋｇの用量で投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に、約５０μｇ／ｋｇの用量で投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に、約１００μｇ／ｋｇの用量で投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に、約２００μｇ／ｋｇの用量で投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象

に、約３００μｇ／ｋｇの用量で投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に、約４００μｇ／ｋｇの用量で投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に、約５００μｇ／ｋｇの用量で投与される。別の実施形態では、ＣＴＰにより修飾された凝固因子は、対象に、約６００μｇ／ｋｇの用量で投与される。

【０１８７】

一実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａの投与量は、同じ期間にわたって患者に対して組換えＦＶＩＩａ（例えば、ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標））の推奨投与量で投与されるＦＶＩＩａの量の５０％を含む。一実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩの投与量は、同じ期間にわたって患者に対して組み換えＦＶＩＩの推奨投与量で投与されるＦＶＩＩの量の５０％を含む。例えば、ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）は、術前または術後に患者に対して２時間ごとに９０ｍｇ／ｋｇの用量（すなわち、８５ｋｇの患者には、２時間毎に７．６５ｍｇ、または１２時間にわたって６用量で４５．９ｍｇ）で投与される場合、本明細書で開示のＣＴＰ修飾凝固因子は、組み換えＦＶＩＩａの患者の１２時間用量の５０％である用量で投与されてよい（すなわち、１２時間で２３ｍｇの用量を１回に投与される）。

【０１８８】

別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子の投与量は、それが、非ＣＴＰ修飾凝固因子を用いて投与される凝固因子の量の４５％を含むような投与量である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子の投与量は、これが、非ＣＴＰ修飾凝固因子を用いて投与される凝固因子の量の１０％を含むような投与量である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子の投与量は、これが、非ＣＴＰ修飾凝固因子を用いて投与される凝固因子の量の２５％を含むような投与量である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子の投与量は、これが、非ＣＴＰ修飾凝固因子を用いて投与される凝固因子の量の３５％を含むような投与量である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子の投与量は、これが、非ＣＴＰ修飾凝固因子を用いて投与される凝固因子の量の７５％を含むような投与量である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子の投与量は、これが、非ＣＴＰ修飾凝固因子を用いて投与される凝固因子の量の１００％を含むような投与量である。しかし、この投与量が、非ＣＴＰ修飾凝固因子と同じ量の凝固因子（例えば、ＦＩＸ）を含む場合でさえ、これは、組み換え凝固因子と比較してその半減期が延長されているために低頻度で投与されると言う点で、対象にとってはやはり有利である。

【０１８９】

別の実施形態では、複合体化凝固因子の治療有効量は、ＦＶＩＩａについては、１０μｇ／Ｋｇ～５００μｇ／Ｋｇである。別の実施形態では、複合体化凝固因子の治療有効量は、１日１回投与で、体重１ｋｇあたり１５０～２５０ＩＵである。別の実施形態では、複合体化凝固因子を含む医薬組成物は、ヒト患者に対して種々の手段で投与するのに有効な製剤含量で処方される。

【０１９０】

一実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子は、対象に毎週を基本として投与される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子は、対象に週２回投与される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子は、対象に、隔週（２週毎に１回）を基本として投与される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子は、対象に、月２回投与される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子は、対象に、月１回投与される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子は、対象に、毎日を基本として投与される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固因子は、対象に２日毎に投与される。

【０１９１】

別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に、３日毎に１回投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に、４日毎に１回投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に、５日毎

に１回投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に、６日毎に１回投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に、７～１４日毎に１回投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に、１０～２０日毎に１回投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に、５～１５日毎に１回投与される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、対象に、１５～３０日毎に１回投与される。

【０１９２】

別の実施形態では、本開示の方法は、凝固因子療法の使用において、服薬遵守を向上させることを含み、該方法は、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合した少なくとも１個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）を含むポリペプチドを、それを必要としている対象に提供し、それにより、凝固因子療法の使用において服薬遵守を向上させることを含む。

【０１９３】

別の実施形態では、本開示の方法は、凝固因子療法の必要な慢性疾患に罹患している患者の服薬遵守を向上させることを含む。別の実施形態では、本開示の方法は、本明細書において上記のＣＴＰで凝固因子を修飾することによって、凝固因子の投与頻度を低減できる。

【０１９４】

別の実施形態では、服薬遵守という用語は、アドヒアランス（患者が能動的に治療に参加すること）を含む。別の実施形態では、本開示の方法は、凝固因子の投与の頻度を低減させることによって、凝固因子療法の必要な患者の服薬遵守を向上させることを含む。別の実施形態では、凝固因子の投与頻度の低減は、ＣＴＰ修飾凝固因子をより安定にするＣＴＰ修飾により達成される。別の実施形態では、凝固因子の投与頻度の低減は、凝固因子の$T_{1/2}$の増大の結果として達成される。別の実施形態では、凝固因子の投与頻度の低減は、凝固因子のクリアランス時間の増大またはクリアランス速度の低下の結果として達成される。

【０１９５】

別の実施形態では、凝固因子の投与の頻度の低下は、凝固因子のＡＵＣ値が増大する結果として達成される。

【０１９６】

別の実施形態では、本明細書において、凝固因子の投与頻度を低減させる方法が提供され、該方法は、１～１０個のＣＴＰを凝固因子のカルボキシ末端に結合し、それにより、凝固因子の投与頻度を低減させるステップを含む。別の実施形態では、本明細書において、凝固因子の投与頻度を低減させる方法が提供され、該方法は、１～５個のＣＴＰを凝固因子のカルボキシ末端に結合し、それにより、凝固因子の投与頻度を低減させるステップを含む。別の実施形態では、本明細書において、凝固因子の投与頻度を低減させる方法が提供され、該方法は、３個のＣＴＰを凝固因子のカルボキシ末端に結合し、それにより、凝固因子の投与頻度を低減させるステップを含む。別の実施形態では、本明細書において、凝固因子の投与頻度を低減させる方法が提供され、該方法は、３～５個のＣＴＰを凝固因子のカルボキシ末端に結合し、それにより、凝固因子の投与頻度を低減させるステップを含む。

【０１９７】

別の実施形態では、本明細書において、凝固因子療法の使用における服薬遵守を向上させる方法が提供され、該方法は、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合した１～１０個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドを、それを必要とする対象に提供し、それにより、凝固因子療法の使用における服薬遵守を向上させることを含む。別の実施形態では、本明細書において、凝固因子療法の使用における服薬遵守を向上させる方法が提供され、該方法は、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端

に結合した１～５個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドを、それを必要としている対象に提供し、それにより、凝固因子療法の使用における服薬遵守を向上させることを含む。別の実施形態では、本明細書において、凝固因子療法の使用における服薬遵守を向上させる方法が提供され、該方法は、凝固因子およびその凝固因子のカルボキシ末端に結合した３個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドを、それを必要としている対象に提供し、それにより、凝固因子療法の使用における服薬遵守を向上させることを含む。別の実施形態では、本明細書において、凝固因子療法の使用における服薬遵守を向上させる方法が提供され、該方法は、凝固因子およびその凝固因子のカルボキシ末端に結合した３～５個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドを、それを必要としている対象に提供し、それにより、凝固因子療法の使用における服薬遵守を向上させることを含む。

【０１９８】

別の実施形態では、本明細書において、対象における血液凝固障害または血液凝固異常を予防または治療する方法が提供され、該方法は、前記対象に、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合した１～１０個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドを提供し、それにより、前記対象の血液凝固障害または血液凝固異常を治療することを含む。別の実施形態では、本明細書において、対象における血液凝固障害または血液凝固異常を予防または治療する方法が提供され、該方法は、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合した１～５個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドを、それを必要としている対象に提供し、それにより、前記対象における血液凝固障害または血液凝固異常を予防または治療することを含む。別の実施形態では、本明細書において、対象における血液凝固障害または血液凝固異常を予防または治療する方法が提供され、該方法は、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合した３個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドを、それを必要としている対象に提供し、それにより、前記対象における血液凝固障害または血液凝固異常を予防または治療することを含む。

【０１９９】

別の実施形態では、本明細書において、対象における血友病を予防する方法が提供され、該方法は、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合した３個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドを、それを必要としている対象に提供し、それにより、前記対象における血友病を予防することを含む。別の実施形態では、本明細書において、対象における血友病を予防する方法が提供され、該方法は、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合した３～５個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドを、それを必要としている対象に提供し、それにより、前記対象における血友病を予防することを含む。

【０２００】

別の実施形態では、本明細書で提供される組成物は、意外にも、ＳＣ投与後に血流中により効果的に吸収される（国際出願第ＰＣＴ／ＩＬ２０１６／０５０６４５号を参照。この出願は、その全体が参考として本明細書に組み込まれる）。皮下にＦＶＩＩａを投与可能であることは、予防適用に用いることが可能であるので、利点として機能する。また、皮下注射は、患者にとって自己注射が遙かに容易であり、また、患者がごく若く、血管が小さく見つけるのが困難である場合に有利である。

【０２０１】

別の実施形態では、本明細書において、対象の血友病を治療する方法が提供され、該方法は、前記対象に、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合した１～１０個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドを投与し、それにより、前記対象の血友病を治療することを含む。別の実施形態では、本明細書において、対象の血友病を治療する方法が提供され、該方法は、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合した１～５個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドを、それを必要としている対象に投与し、それにより、前記対象の血友病を治療すること

を含む。別の実施形態では、本明細書において、対象の血友病を治療する方法が提供され、該方法は、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合した３個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドを、それを必要としている対象に提供し、それにより、前記対象の血友病を治療することを含む。別の実施形態では、本明細書において、対象の血友病を治療する方法が提供され、該方法は、凝固因子および凝固因子のカルボキシ末端に結合した３～５個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドを含むポリペプチドを、それを必要としている対象に提供し、それにより、前記対象の血友病を治療することを含む。

【０２０２】

一実施形態では、経口投与は、錠剤、カプセル剤、トローチ剤、チュアブル錠、懸濁剤、および乳剤などを含む単位剤形を含む。このような単位剤形は、本開示の目的の凝固因子の安全で有効な量を含み、その各々が、一実施形態では、約０．７または３．５ｍｇ～約２８０ｍｇ／７０ｋｇ、または別の実施形態では、約０．５または１０ｍｇ～約２１０ｍｇ／７０ｋｇである。経口投与用の単位剤形の調製に適する薬学的に許容可能なキャリアは、当技術分野で公知である。いくつかの実施形態では、錠剤は典型的には、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、マンニトール、ラクトースおよびセルロースなどの不活性希釈液；デンプン、ゼラチンおよびスクロースなどの結合剤；デンプン、アルギン酸およびクロスカルメロースなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸および滑石などの潤滑剤として、従来の薬学的に適合性のアジュバントを含む。一実施形態では、二酸化ケイ素などの流動促進剤を用いて、粉末混合物の流動特性を改善することができる。一実施形態では、ＦＤ＆Ｃ染料などの着色剤は、外観のために添加することができる。アスパルテーム、サッカリン、メントール、ペパーミント、およびフルーツフレーバーなどの甘味料および香味剤は、チュアブル錠に有用なアジュバントである。カプセル剤は通常、上記で開示した１種または複数の固体希釈剤を含む。いくつかの実施形態では、キャリア成分の選択は、本発明の目的にとって重要ではない味、コストおよび貯蔵安定性などの二次的考慮事項に依存し、当業者によって容易になされ得る。

【０２０３】

一実施形態では、経口剤形は、所定の放出プロファイルを含む。一実施形態では、本明細書で開示の経口剤形は、持続放出錠剤、カプセル剤、トローチ剤またはチュアブル錠を含む。一実施形態では、本明細書で開示の経口剤形は、徐放錠剤、カプセル剤、トローチ剤またはチュアブル錠を含む。一実施形態では、本明細書で開示の経口剤形は、即時放出錠剤、カプセル剤、トローチ剤またはチュアブル錠を含む。一実施形態では、経口剤形は、当業者に既知の薬学的有効成分の目的の放出プロファイルに応じて処方される。

【０２０４】

経口組成物は、いくつかの実施形態では、溶液剤、乳剤、懸濁剤などを含む。いくつかの実施形態では、このような組成物の調製に適切な薬学的に許容可能なキャリアは、当該分野で周知である。いくつかの実施形態では、液体経口組成物は、約０．００１％～約０．９３３％、または別の実施形態では、約０．０１％～約１０％の目的の化合物（単一または複数）を含む。

【０２０５】

いくつかの実施形態では、本発明の方法における使用のための組成物は、溶液または乳剤を含み、いくつかの実施形態では、これは、本明細書で開示の化合物、および必要に応じて、局所の鼻腔投与を意図する他の化合物の安全かつ有効な量を含む水性の溶液または乳剤である。いくつかの実施形態では、組成物は、約０．００１％～約１０．０％（ｗ／ｖ）の本発明の化合物、さらに好ましくは、約００．１％～約２．０の該化合物を含み、これは、経鼻投与による化合物の全身送達に用いられる。

【０２０６】

別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、筋肉に注射される（筋肉内注射）。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、皮下に注射される（皮下注射）。別の実施形態では

、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、筋肉中に注射される。別の実施形態では、凝固因子および少なくとも１個のＣＴＰ単位を含むポリペプチドは、皮膚に注射される。別の実施形態では、本明細書に記載される凝固因子は、全身投与により投与される。別の実施形態では、本明細書に記載される凝固因子は、静脈内注射により投与される。別の実施形態では、投与には、非経口、肺、経口、局所、経皮、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、経鼻、眼内、眼、硬膜外、頬側、直腸、経粘膜、腸または非経口送達であってもよく、これには、髄内注射、およびくも膜下腔内または直接の脳室内投与が挙げられる。

【０２０７】

別の実施形態では、製剤は、全身的な方法よりもむしろ局所的に、例えば、製剤の注入により患者の身体の特定の領域に直接投与される。

【０２０８】

一実施形態では、投与の経路は、腸内であってもよい。別の実施形態では、経路は、結膜、経皮、皮内、動脈内、膣、直腸、腫瘍内、癌周囲、経粘膜、筋肉内、血管内、脳室内、頭蓋内、鼻腔内、舌下、またはそれらの組み合わせであってもよい。

【０２０９】

別の実施形態では、医薬組成物および医薬製剤は、液状調製物の静脈内注射、動脈内注射または筋肉内注射により投与される。いくつかの実施形態では、液体製剤は、溶液、懸濁液、分散液、乳剤、油類などを含む。一実施形態では、医薬組成物および医薬製剤は、静脈内投与され、したがって、静脈内投与に適した形態で処方される。別の実施形態では、これらの医薬組成物および医薬製剤は動脈内投与され、したがって、動脈内投与に適した形態で処方される。別の実施形態では、これらの医薬組成物および医薬製剤は筋肉内投与され、したがって、筋肉内投与に適した形態で処方される。

【０２１０】

さらに、別の実施形態では、医薬組成物および医薬製剤は体表面に局所的に投与され、したがって、局所投与に適した形態で処方される。適切な局所製剤としては、ゲル、軟膏、クリーム、ローション、および点滴薬などを挙げることができる。局所投与のために、本明細書で開示の化合物は、医薬キャリアの有無にかかわらず、追加の適切な治療薬と組み合わされ、生理学的に許容される希釈剤中の液剤、懸濁剤、または乳剤として調製、適用される。

【０２１１】

一実施形態では、本明細書で開示の医薬組成物および医薬製剤は、例えば、従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠化、湿式粉砕、乳化、カプセル化、封入または凍結乾燥のプロセスなどの、当技術分野で公知のプロセスによって製造される。

【０２１２】

一実施形態では、本発明による使用のための医薬組成物および医薬製剤は、製薬的に用いることができる、有効成分の製剤への処理を容易にする、賦形剤および助剤を含む１種または複数の生理学的に許容可能なキャリアを用いて従来の方式で処方される。一実施形態では、製剤は、選択される投与経路に依存する。

【０２１３】

一実施形態では、本開示の注射剤は水溶液として処方される。一実施形態では、本開示の注射剤は、ハンクス溶液、リンゲル溶液、または生理的塩緩衝液などの生理的に適合する緩衝液で処方される。いくつかの実施形態では、経粘膜投与のために、透過すべき障壁に適する浸透剤が製剤に使用される。このような浸透剤は当該技術分野において一般に既知である。

【０２１４】

一実施形態では、本明細書に記載の製剤は、例えば、ボーラス注入または持続注入による非経口投与用に処方される。いくつかの実施形態では、注射のための製剤は、単位剤形で、例えば、アンプルで、または複数用量容器で、必要に応じて添加された防腐剤とともに提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、油状または水性のビークル中の、懸

濁液、溶液または乳剤であり、処方剤、例えば、懸濁剤、安定化剤および／または分散剤を含む。

【０２１５】

組成物はまた、いくつかの実施形態では、塩化ベンザルコニウムおよびチメロサールなどの防腐剤；キレート剤、例えば、エデト酸ナトリウムなど；緩衝液、例えば、リン酸塩、クエン酸塩および酢酸塩；等張化剤、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトールなど；酸化防止剤、例えば、アスコルビン酸、アセチルシステイン、メタ重亜硫酸ナトリウムなど；芳香剤；粘度調整剤、例えば、ポリマー、例えば、セルロースおよびその誘導体；ならびにポリビニルアルコールおよび酸および塩基（必要に応じてこれらの水性組成物のｐＨを調節するための）を含む。組成物はまた、いくつかの実施形態では、局所麻酔薬または他の活性成分も含む。組成物はスプレー、ミスト、および点滴薬などとして使用することができる。

【０２１６】

いくつかの実施形態では、非経口投与のための医薬組成物および医薬製剤として、水溶性型の活性調製物の水溶液が挙げられる。さらに、有効成分の懸濁液は、いくつかの実施形態では、必要に応じて、油または水ベースの注射用懸濁剤として調製される。適切な親油性溶媒またはビークルには、いくつかの実施形態では、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチル、トリグリセリドもしくはリポソームなどの合成脂肪酸エステルが含まれる。水性注射用懸濁剤は、いくつかの実施形態では、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランなどの、懸濁剤の粘度を増加させる物質を含む。別の実施形態では、懸濁液はまた、適切な安定化剤、または有効成分の溶解度を高めて、高度に濃縮された溶液の調製を可能にする薬剤を含む。

【０２１７】

別の実施形態では、活性化合物を、小胞、特に、リポソームに入れて送達できる（Ｌａｎｇｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３（１９９０）；Ｔｒｅａｔ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ｄｉｓｅａｓｅ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ，Ｌｏｐｅｚ－Ｂｅｒｅｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｆｉｄｌｅｒ（ｅｄｓ．）、Ｌｉｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．３５３－３６５（１９８９）；Ｌｏｐｅｚ－Ｂｅｒｅｓｔｅｉｎ，ｉｂｉｄ．，ｐｐ．３１７－３２７；Ｊ．Ｅ．Ｄｉｅｄｅｒｉｃｈｓら、Ｐｈａｒｍ．／ｎｄ．５６（１９９４）２６７－２７５を参照されたい）。

【０２１８】

別の実施形態では、制御放出系で送達される医薬組成物は、静脈内注入、植込み型浸透圧ポンプ、経皮パッチ、リポソーム、または他の投与方式用として処方される。一実施形態では、ポンプが使用される（Ｌａｎｇｅｒ，ｓｕｐｒａ；Ｓｅｆｔｏｎ，ＣＲＣ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｆ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．１４：２０１（１９８７）；Ｂｕｃｈｗａｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｓｕｒｇｅｒｙ ８８：５０７（１９８０）；Ｓａｕｄｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２１：５７４（１９８９）、を参照されたい）。別の実施形態では、ポリマー材料を用いることができる。さらに別の実施形態では、制御放出系は、治療標的、すなわち脳の近位に置くことができ、したがって、全身投与量の内のわずかしか必要としない（例えば、Ｇｏｏｄｓｏｎ，ｉｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，ｓｕｐｒａ，ｖｏｌ．２，ｐｐ．１１５－１３８（１９８４）を参照されたい）。他の制御放出系は、Ｌａｎｇｅｒによる概説（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３（１９９０））で考察されている。

【０２１９】

いくつかの実施形態では、有効成分は、適切なビークル、例えば、無菌の発熱物質不含水ベースの溶液を用いた使用前の構成のために、粉末形態である。組成物は、いくつかの実施形態では、霧化および吸入投与用に処方される。別の実施形態では、組成物は噴霧化手段を備えた容器に入れられる。

【０２２０】

一実施形態では、本発明の製剤は、例えば、ココアバターまたは他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を用いて、坐剤または停留浣腸などの直腸用組成物に処方される。

【０２２１】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示の状況での使用に適切な医薬組成物および医薬製剤としては、有効成分が使用目的を達成するために有効な量で含まれる組成物が挙げられる。いくつかの実施形態では、治療有効量は、疾患の症状を防止、軽減もしくは緩和するか、または治療される対象の生存を延長させるために効果的な有効成分の量を意味する。

【０２２２】

一実施形態では、治療有効量の決定は十分に当業者の能力の範囲内にある。

【０２２３】

薬学的に許容可能なキャリアまたはその成分として機能し得る物質のいくつかの例としては、ラクトース、グルコースおよびスクロースなどの糖類；トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプンなどのデンプン；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、およびメチルセルロースなどのセルロースおよびその誘導体；粉末トラガカント；麦芽、ゼラチン；タルク、ステアリン酸およびステアリン酸マグネシウムなどの固体潤滑剤；硫酸カルシウム；落花生油、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびカカオ油などの植物油；プロピレングリコール、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなどのポリオール；アルギン酸；Ｔｗｅｅｎ（商標）ブランドの乳化剤などの乳化剤；ラウリル硫酸ナトリウムなどの湿潤剤；着色剤；香味剤；錠剤化剤、安定化剤；酸化防止剤；防腐剤；発熱物質を含まない水；等張食塩水；ならびにリン酸緩衝液が挙げられる。化合物と組み合わせて使用される薬学的に許容可能なキャリアの選択は、基本的に化合物が投与される方法により決定される。化合物が注入される場合に、一実施形態では、薬学的に許容可能なキャリアは、ｐＨが約７．４に調整されている、血液適合性懸濁剤を有する無菌の生理食塩水である。

【０２２４】

加えて、組成物は、結合剤（例えば、アカシア、コーンスターチ、ゼラチン、カルボマー、エチルセルロース、グアーガム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポビドン）、崩壊剤（例えば、コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸、二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、グアーガム、デンプングリコール酸ナトリウム）、様々なｐＨおよびイオン強度の緩衝液（例えば、トリス塩酸塩、酢酸塩、リン酸塩）、表面への吸収を防ぐためのアルブミンまたはゼラチンなどの添加剤、界面活性剤（例えば、Ｔｗｅｅｎ２０、Ｔｗｅｅｎ８０、プルロニックＦ６８、胆汁酸塩）、プロテアーゼ阻害剤、界面活性剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）、透過促進剤、可溶化剤（例えば、グリセロール、ポリエチレングリセロール）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム、ブチル化ヒドロキシアニソール）、安定化剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース）、増粘剤（例えば、カルボマー、コロイド状二酸化ケイ素、エチルセルロース、グアーガム）、甘味料（例えば、アスパルテーム、クエン酸）、防腐剤（例えば、チメロサール、ベンジルアルコール、パラベン）、滑剤（例えば、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム）、流動助剤（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）、可塑剤（例えば、フタル酸ジエチル、クエン酸トリエチル）、乳化剤（例えば、カルボマー、ヒドロキシプロピルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム）、ポリマーコーティング（例えば、ポロキサマーまたはポロキサミン）、コーティング剤およびフィルム形成剤（例えば、エチルセルロース、アクリレート、ポリメタクリレート）ならびに／またはアジュバントをさらに含む。

【０２２５】

シロップ剤、エリキシル剤、乳剤および懸濁剤用のキャリアの典型的な成分としては、エタノール、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、液体スクロース、ソルビトールおよび水を挙げることができる。懸濁液については、典型的な懸濁

剤としては、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、セルロース（例えば、Ａｖｉｃｅｌ（商標）、ＲＣ－５９１）、トラガカントおよびアルギン酸ナトリウムが含まれ、典型的な湿潤剤としては、レシチンおよびポリエチレンオキシドソルビタン（例えば、ポリソルベート８０）を挙げることができる。典型的な防腐剤としては、メチルパラベンおよび安息香酸ナトリウムを挙げることができる。別の実施形態では、経口液体組成物はまた、上記に開示した甘味料、香味剤および着色剤などの１種または複数の成分も含む。

【０２２６】

これらの組成物はまた、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲルなどの高分子化合物の粒子状製剤の中もしくはその上への活性物質の取り込み、またはリポソーム、マイクロエマルジョン、ミセル、単層もしくは多層小胞、赤血球ゴースト、もしくはスフェロプラスト上への活性物質の取り込みも含む。このような組成物は、物理的状態、溶解度、安定性、インビボ除去速度、およびインビボクリアランス速度に影響を及ぼす。

【０２２７】

ポリマー（例えば、ポロキサマーまたはポロキサミン）でコーティングされた粒子組成物、および組織特異的な受容体、リガンドもしくは抗原に対する抗体に結合した化合物、または組織特異的受容体のリガンドに結合した化合物も本開示に包含される。

【０２２８】

いくつかの実施形態では、化合物は、共有結合したポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマー、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、ポリビニルピロリドンまたはポリプロリンなどの水溶性ポリマーにより修飾される。別の実施形態では、修飾された化合物は、対応する非修飾化合物よりも静脈内注射後の血中半減期が実質的に長い。一実施形態では、修飾により、水溶液中の化合物の溶解度が増加し、凝集が排除され、化合物の物理的および化学的安定性が高まり、化合物の免疫原性および反応性が著しく低下する。別の実施形態では、そのようなポリマー－化合物の付加物を、非修飾化合物よりも少ない頻度で、または低用量で投与することにより、目的のインビボ生物活性が実現される。

【０２２９】

いくつかの実施形態では、有効量または用量の調製は、最初はインビトロアッセイから推定できる。一実施形態では、動物モデルにおいて用量を処方することができ、そのような情報を用いて、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。

【０２３０】

一実施形態において、本明細書に記載の有効成分の毒性および治療効力は、インビトロ、細胞培養、または実験動物において、標準的医薬手順により決定できる。一実施形態では、これらのインビトロおよび細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータは、ヒトに使用される一連の投与量を処方するのに用いることができる。一実施形態では、投与量は、用いられる剤形および利用される投与経路に応じて変わる。一実施形態では、正確な処方、投与経路および投与量は、患者の状態を考慮して個々の医師が選択することができる［例えば、Ｆｉｎｇｌ，ｅｔ ａｌ．，（１９７５）"Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ"，Ｃｈ．１ ｐ．１、を参照されたい］。

【０２３１】

一実施形態では、治療すべき状態の重症度および応答性に応じて、投薬は、数日～数週間続く治療の過程を伴う、または治癒が得られるか、または病態の縮小が達成されるまでの単回または複数回投与であり得る。

【０２３２】

一実施形態では、投与されるべき組成物の量は、当然、治療される対象、苦痛の重篤度、投与方式、処方医の判断などに依存するであろう。

【０２３３】

一実施形態では、適合可能な医薬キャリア中で処方される本発明の調製物を含む組成物

も調製され、適切な容器に入れられて、適応症状の治療に関してラベル表示される。

【０２３４】

別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子は、複合有機賦形剤および安定化剤、例えば、非イオン性表面活性剤（すなわち、サーファクタント）、様々な糖類、有機ポリオールおよび／またはヒト血清アルブミンと組み合わされた凍結乾燥（すなわち、フリーズドライ）製剤である。別の実施形態では、医薬組成物は、記載のような、注射用滅菌水中の凍結乾燥凝固因子を含む。別の実施形態では、医薬組成物は、記載のような、注射用滅菌ＰＢＳ中の凍結乾燥凝固因子を含む。別の実施形態では、医薬組成物は、記載のような、注射用滅菌０．９％ＮａＣｌ中の凍結乾燥凝固因子を含む。

【０２３５】

別の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の凝固因子および複合キャリア、例えば、ヒト血清アルブミン、ポリオール、糖類、および陰イオン性界面活性安定化剤を含む。別の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の凝固因子と、ラクトビオン酸と、酢酸塩／グリシン緩衝剤とを含む。別の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の凝固因子およびインターフェロン組成物の水中溶解度を高めるアミノ酸、例えば、アルギニンまたはグルタミン酸を含む。別の実施形態では、医薬組成物は、凍結乾燥された、本明細書に記載の凝固因子およびグリシンまたはヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、緩衝液（例えば、酢酸塩）および等張剤（例えば、ＮａＣｌ）を含む。別の実施形態では、医薬組成物は、凍結乾燥された、本明細書に記載の凝固因子およびリン酸緩衝剤、グリシン、ＨＳＡを含む。

【０２３６】

別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む医薬組成物は、約４～７．２のｐＨを有する緩衝溶液中では安定化する。別の実施形態では、凝固因子を含む医薬組成物は、約４～８．５のｐＨを有する緩衝溶液中に存在する。別の実施形態では、凝固因子を含む医薬組成物は、約６～７のｐＨを有する緩衝溶液中に存在する。別の実施形態では、凝固因子を含む医薬組成物は、約６．５のｐＨを有する緩衝溶液中に存在する。別の実施形態では、凝固因子を含む医薬組成物は、約６．４のｐＨを有する緩衝溶液中に存在する。別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む医薬組成物は、安定化剤としてのアミノ酸で安定化され、いくつかの場合には、塩で安定化される（アミノ酸が、荷電側鎖を含まない場合）。

【０２３７】

別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む医薬組成物は、アミノ酸の安定化剤を約０．３重量％～５重量％含む液体組成物である。

【０２３８】

別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む医薬組成物は、投薬精度および製品安全性をもたらす。別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む医薬組成物は、注射可能な用途に用いられる、生物活性のある安定した液体製剤を提供する。別の実施形態では、医薬組成物は、凍結乾燥されていない、本明細書に記載の凝固因子を含む。

【０２３９】

別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む医薬組成物は、液体状態での長期貯蔵を可能として、投与前の貯蔵および輸送を容易にする液体製剤を提供する。

【０２４０】

別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む医薬組成物は、固形脂質をマトリックス材料として含む。別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む注射可能な医薬組成物は、固形脂質をマトリックス材料として含む。別の実施形態では、噴霧凝固による脂質微粒子の生成は、Ｓｐｅｉｓｅｒ（Ｓｐｅｉｓｅｒ ａｎｄ ａｌ．，Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．８（１９９１）４７－５４）によって記載されており、その後、経口投与用の脂質ナノペレットが生成される（Ｓｐｅｉｓｅｒ、欧州特許第０１６７８２５号（１９９０））。別の実施形態では、使用される脂質（例えば、非経口栄養用の乳剤中に存在する脂肪酸からなるグリセリド）は、体内で耐容性良好である。

【０２４１】
別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む医薬組成物は、高分子微小粒子を含む。別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む医薬組成物は、ナノ粒子を含む。別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む医薬組成物は、リポソームを含む。別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む医薬組成物は、脂質乳剤を含む。別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む医薬組成物は、ミクロスフェアを含む。別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む医薬組成物は、脂質ナノ粒子を含む。別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む医薬組成物は、両親媒性脂質を含む脂質ナノ粒子を含む。別の実施形態では、本明細書に記載の凝固因子を含む医薬組成物は、薬物と、脂質マトリックスと、界面活性剤とを含む脂質ナノ粒子を含む。別の実施形態では、脂質マトリックスは、少なくとも５０％ｗ／ｗのモノグリセリド含量を有する。
【０２４２】
一実施形態では、本明細書で開示の組成物は、有効成分を含有する１個または複数の単位剤形を含む、パックまたはディスペンサー装置、例えば、ＦＤＡ認可キットにいれて提供される。一実施形態では、パックは、例えば、金属またはブリスターパックなどのプラスチックホイルを含む。一実施形態では、パックまたはディスペンサー装置は、投与のための説明書が添付されている。一実施形態では、パックまたはディスペンサーは、医薬品の製造、使用または販売を規制する政府機関により定められた形式で容器に添付された通知が同梱されており、この通知は、組成物の形態またはヒトもしくは動物への投与の当局による承認を反映する。このような通知は、一実施形態では、処方薬または承認された製品添付文書について米国食品医薬品局によって承認されたラベリングである。
【０２４３】
一実施形態では、本明細書で開示の凝固因子が、追加の活性剤と共に個体に提供されることで、各薬剤単独での治療と比較して、改善された治療効果が達成され得ることが理解されよう。別の実施形態では、併用療法に関連する有害な副作用を回避するための方策（例えば、補助剤の投与および選択）がとられる。
【０２４４】
製造
【０２４５】
一実施形態では、ヒト絨毛性ゴナドトロピンペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト第ＶＩＩａ因子ポリペプチドの製造方法が開示され、該方法は、（ａ）所定の数の細胞に前記ＣＴＰ修飾第ＦＶＩＩ因子をコードするコード部分を含む発現ベクターを安定に遺伝子導入し、前記遺伝子導入細胞が前記ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子を発現し、場合により、分泌するステップ；（ｂ）前記ＣＴＰ修飾第ＦＶＩＩ因子を過剰発現する細胞クローンを得るステップ；（ｃ）溶液中で前記クローンを所定の規模に増殖するステップ；（ｄ）前記クローンを含む前記溶液をハーベストするステップ；（ｅ）前記クローンを含む前記溶液を濾過して、清澄化ハーベスト溶液を得るステップ；および（ｆ）前記清澄化ハーベスト溶液を精製および活性化して、目的の濃度のＣＴＰ修飾第ＦＶＩＩ因子を有する精製タンパク質溶液を得て、それにより、ヒト絨毛性ゴナドトロピンペプチド（ＣＴＰ）修飾第ＶＩＩ因子ポリペプチドを製造するステップを含む。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固第ＶＩＩ因子が分泌される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固第ＶＩＩ因子が分泌されない。ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子の製造において、遺伝子導入は初期ステップである。最終の高発現クローンが選択されると、それぞれの製造は、マスターセルバンク（ＭＣＢ）の解凍、増殖、ハーベストおよび精製を含む。（クローン増殖からハーベストまでについて記載している実施例３、ステップ１～５；および精製および活性化について記載しているステップ６～１４を参照されたい）。一実施形態では、ヒト絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）修飾ヒト活性第ＶＩＩ因子（ＦＶＩＩａ）ポリペプチドを製造する方法が開示され、前記ポリペプチドは、ＦＶＩＩのＣ末端に直列に結合した３個のＣＴＰ分子を含み、該方法は、所定の数の細胞に前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩをコードするコード部分を含む

発現ベクターを安定に遺伝子導入し、前記遺伝子導入細胞が前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを発現し、分泌するステップ；前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを過剰発現する細胞クローンを得るステップ；溶液中で前記クローンを所定の規模に増殖するステップ；前記クローンを含む前記溶液をハーベストするステップ；前記クローンを含む前記溶液を濾過して、前記ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを含む清澄化ハーベスト溶液を得るステップ；および前記清澄化ハーベスト溶液からＣＴＰ修飾ＦＶＩＩを精製および活性化して、目的の濃度のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａを有する精製タンパク質溶液を得て、それにより、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａ製造するステップを含み、前記製造したＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａは、次記：

ａ．少ない酸化型；

ｂ．高い比率のカルボキシル化グルタミン酸残基；

ｃ．少なくとも６０％の荷電Ｎ－グリカン；または

ｄ．少なくとも１０，５００Ｕ／ｍｇの効力；

の内の少なくとも１つを含み、製造されたＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａのアミノ酸配列は、配列番号７で示される。

【０２４６】

一実施形態では、本明細書で開示のポリヌクレオチドを、発現ベクター（すなわち、核酸構築物）に挿入して、組み換えポリペプチドの発現を可能にする。一実施形態では、本明細書で開示の発現ベクターは、このベクターを原核生物中での複製および組込みを好適にする追加の配列を含む。一実施形態では、本明細書で開示の発現ベクターは、このベクターを真核生物中での複製および組込みを好適にする追加の配列を含む。一実施形態では、本明細書で開示の発現ベクターは、このベクターを原核生物および真核生物の両方での複製および組込みを好適にするシャトルベクターを含む。いくつかの実施形態では、クローニングベクターは、転写および翻訳開始配列（例えば、プロモーター、エンハンサー）および転写および翻訳のターミネーター（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含む。

【０２４７】

一実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩａポリペプチドの製造方法は、発現ベクターの使用を含むステップを含み、前記発現ベクターは、プロモーター、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドのためのコード配列、およびポリアデニル化配列を含む。別の実施形態では、ポリアデニル化配列は、シミアンウィルス（ＳＶ）４０ポリアデニル化配列である。

【０２４８】

一実施形態では、種々の原核または真核細胞を宿主発現系として用いて、本明細書で開示のポリペプチドを発現させることができる。いくつかの実施形態では、これらには、ポリペプチドコード配列を含む組換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡまたはコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換した細菌などの微生物；ポリペプチドコード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母；組換えウィルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウィルス、ＣａＭＶ；タバコモザイクウィルス、ＴＭＶ）で感染させた植物細胞系またはポリペプチドコード配列を含むＴｉプラスミドなどの組換えプラスミド発現ベクターで形質転換した植物細胞系が含まれるが、これらに限定されない。

【０２４９】

一実施形態では、本明細書で開示のポリペプチドを発現させるために、非細菌発現系（例えば、ＣＨＯ細胞またはＣＨＯ細胞由来細胞などの哺乳動物発現系）が使用される。一実施形態では、哺乳動物細胞において本明細書で開示のポリヌクレオチドを発現させるために用いられる発現ベクターは、ＣＭＶプロモーターおよびネオマイシン耐性遺伝子を含むｐＣＩ－ＤＨＦＲベクターである。

【０２５０】

一実施形態では、本明細書で開示の発現ベクターはさらに、例えば、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）およびプロモーター－キメラポリペプチドのゲノム組込みのための配列などの単一のｍＲＮＡ由来のいくつかのタンパク質の翻訳を可能にする追加のポリヌクレオチド配列を含み得る。

【０２５１】

いくつかの実施形態では、哺乳動物発現ベクターとして、ｐｃＤＮＡ３、ｐｃＤＮＡ３．１（＋／－）、ｐＧＬ３、ｐＺｅｏＳＶ２（＋／－）、ｐＳｅｃＴａｇ２、ｐＤｉｓｐｌａｙ、ｐＥＦ／ｍｙｃ／ｃｙｔｏ、ｐＣＭＶ／ｍｙｃ／ｃｙｔｏ、ｐＣＲ３．１、ｐＳｉｎＲｅｐ５、ＤＨ２６Ｓ、ＤＨＢＢ、ｐＮＭＴ１、ｐＮＭＴ４１、ｐＮＭＴ８１（これらはＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎから入手可能である）、ｐＣＩ（これはＰｒｏｍｅｇａから入手可能である）、ｐＭｂａｃ、ｐＰｂａｃ、ｐＢＫ－ＲＳＶおよびｐＢＫ－ＣＭＶ（これらはＳｔｒａｔｅｇｅｎｅから入手可能である）、ｐＴＲＥＳ（これはＣｌｏｎｔｅｃｈから入手可能である）、ならびに、それらの誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２５２】

いくつかの実施形態では、レトロウィルスなどの真核性ウィルス由来の調節エレメントを含む発現ベクターが、本明細書で開示の方法により用いられる。ＳＶ４０ベクターは、ｐＳＶＴ７およびｐＭＴ２を含む。いくつかの実施形態では、ウシパピローマウィルス由来のベクターは、ｐＢＶ－１ＭＴＨＡを含み、エプスタイン・バーウィルス由来のベクターは、ｐＨＥＢＯおよびｐ２Ｏ５を含む。他の代表的なベクターとしては、ｐＭＳＧ、ｐＡＶ００９／Ａ＋、ｐＭＴＯ１０／Ａ＋、ｐＭＡＭｎｅｏ－５、バキュロウィルスｐＤＳＶＥ、および真核細胞における発現に有効性を示すＳＶ－４０初期プロモーター、ＳＶ－４０後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳癌ウィルスプロモーター、ラウス肉腫ウィルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、または他のプロモーターの指示下でタンパク質の発現を可能にする任意の他のベクターが挙げられる。

【０２５３】

一実施形態では、種々の方法を用いて、本明細書で開示のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子をコードする発現ベクターを細胞に導入できる。遺伝子改変細胞または遺伝子導入細胞が得られる、ポリヌクレオチドまたは発現ベクターの真核生物宿主細胞への「遺伝子導入」は、当該技術分野において周知のいずれかの方法により実施でき、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇｓ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９，１９９２），Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍｄ．（１９８９），Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｓｏｍａｔｉｃ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ，Ｍｉｃｈ．（１９９５），Ｖｅｇａ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ Ｍｉｃｈ．（１９９５），Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ Ｓｕｒｖｅｙ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｖｅｃｔｏｒｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｕｓｅｓ，Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ，Ｂｏｓｔｏｎ Ｍａｓｓ．（１９８８）およびＧｉｌｂｏａ ｅｔ ａｔ．［Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ４（６）：５０４－５１２，１９８６］に記載されており、また、例えば、安定なまたは一時的な遺伝子導入、および電気穿孔を含む。さらに、ポジティブ－ネガティブ選択法に関する米国特許第５，４６４，７６４号および同第５，４８７，９９２号を参照されたい。遺伝子導入方法には、リポソーム媒介遺伝子導入、リン酸カルシウム共沈、電気穿孔、ポリカチオン（ＤＥＡＥデキストランなど）媒介遺伝子導入、原形質融合、ウィルス感染（組換えウィルス感染を含む）および微量注入がさらに含まれるが、これらに限定されない。遺伝子導入は安定な遺伝子導入であるのが好ましい。特定の宿主細胞株および細胞型中で最適遺伝子導入頻度および本明細書で開示の目的のペプチドコードする異種遺伝子の発現を可能とする遺伝子導入法が好ましい。好適な方法は、常法により決定することができる。安定な形質移入体を得るために、構築物は、宿主細胞のゲノムまたは人工染色体／ミニ染色体中に組み込まれるか、またはエピソームとして位置し、宿主細胞内で安定に維持される。

【０２５４】

本明細書で開示内容の実施には、特に断りのない限り、当業者の技量の範囲内にある、細胞生物学、分子生物学、細胞培養、形態学、などの従来技術を採用することになる。こ

れらの技術は、現在の文献中で完全に開示されている。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ Ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８９）；Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９８７，ｕｐｄａｔｅｄ）；Ｂｒｏｗｎ ｅｄ．，Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９９１）；Ｇｏｅｄｄｅｌ ｅｄ．，Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９１）；Ｂｏｔｈｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ ａｎｄ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ Ｇｅｎｅｓ，Ｂａｒｔｌｅｔｔ Ｐｕｂｌ．（１９９０）；Ｗｕ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＤＮＡ Ｍｅｔｈｏｄｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）；Ｋｒｉｅｇｌｅｒ，Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ（１９９０）；ＭｃＰｈｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，ＰＣＲ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９１）；Ｇａｉｔ ｅｄ．，Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（１９８４）；Ｍｉｌｌｅｒ ＆ Ｃａｌｏｓ ｅｄｓ．，Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ（１９８７）；Ｂｕｔｌｅｒ ｅｄ．，Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（１９９１）；Ｐｏｌｌａｒｄ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（１９９０）；Ｆｒｅｓｈｎｅｙ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ（１９８７）；Ｓｔｕｄｚｉｎｓｋｉ，ｅｄ．，Ｃｅｌｌ Ｇｒｏｗｔｈ ａｎｄ Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９５）；Ｍｅｌａｍｅｄ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｆｌｏｗ Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ ａｎｄ Ｓｏｒｔｉｎｇ，Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ（１９９０）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．（ｕｐｄａｔｅｄ）；Ｗｉｒｔｈ ＆ Ｈａｕｓｅｒ，Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｏｆ Ａｎｉｍａｌｓ Ｃｅｌｌｓ，ｉｎ：Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｖｏｌ．２，Ｐｕｈｌｅｒ ｅｄ．，ＶＣＨ，Ｗｅｉｎｈｅｉｍ ６６３－７４４；ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．），およびＨａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９８７）を参照されたい。

【０２５５】

ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子をコードする目的の異種遺伝子を、各種方法、例えば、ウィルス形質転換、遺伝子導入または微量注入により本明細書で開示の細胞中に導入し得る。目的の異種遺伝子は、直鎖ＤＮＡとしてまたは発現ベクターの一部として細胞中に導入し得る。多くの真核生物の発現ベクターが既知であり、これらは、１種または複数の異種遺伝子の挿入およびそれらの発現のための複数のクローニング部位を可能とする。市販の業者には、特に、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，Ｃａｌｉｆ．，ＵＳＡ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，Ｃａｌｉｆ．，ＵＳＡ；Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．，ＵＳＡまたはＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，Ｃａｌｉｆ．，ＵＳＡなどの会社が挙げられる。１種または複数の目的の遺伝子をコードするＤＮＡまたは発現ベクターの細胞への遺伝子導入は、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，１９８９ ｏｒ Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９９４に記載のような従来の方法により実施される。好適な遺伝子導入方法には、例えば、リポソーム媒介遺伝子導入、リン酸カルシウム共沈、電気穿孔、ポリカチオン（例えば、ＤＥＡＥデキストラン）媒介遺伝子導入、原形質融合、微量注入およびウィルス感染が挙げられる。ＤＮＡ分子が宿主細胞のゲノムまたは人工染色体／ミニ染色体中に組み込まれるか、

またはエピソームとして宿主細胞中に安定に含まれる、安定な遺伝子導入が実施されるのが好ましい。当該宿主細胞中で、最適な遺伝子導入頻度および１種または複数の目的の異種遺伝子の発現が得られる遺伝子導入方法が好ましい。

【０２５６】

いくつかの実施形態では、ウィルス感染による核酸の導入は、リポフェクションおよび電気穿孔などの他の方法を上回るいくつかの利点を提供する。この理由は、ウィルスの感染性の性質に起因して、より高い遺伝子導入効率が得られる可能性があるためである。

【０２５７】

一実施形態では、本明細書で開示のポリペプチドはまた、本明細書において、上記で記載された、任意の適切な投与方式を使用して個体に投与される核酸構築物から発現され得る（すなわち、インビボの遺伝子療法）ことが理解されよう。一実施形態では、核酸構造体は、適切な遺伝子送達ビヒクル／方法（トランスフェクション、トランスダクション、相同組換えなど）および必要となる発現系を介して適切な細胞に導入され、その後、修飾された細胞を培養で増殖させて、個体に戻す（即ち、エクスビボ遺伝子療法）。

【０２５８】

目的の異種遺伝子は通常、目的の遺伝子の転写を可能とするプロモーターに、および目的の遺伝子の転写および翻訳（発現）またはその効率の上昇を可能とする他の調節エレメントに機能的に連結されている。

【０２５９】

当業者なら、用語の「プロモーター」が、遺伝子もしくはそれに機能的に連結された配列の転写を可能とし、制御する、ポリヌクレオチド手順を包含し得ることを理解するであろう。プロモーターは、ＲＮＡポリメラーゼ結合部位および転写のための開始部位（転写開始部位）の認識配列を含む。特定の細胞型または宿主細胞中で目的の配列を発現するために、好適する機能性プロモーターを選択する必要がある。当業者なら、構成的、誘導性および抑制プロモーターを含む、種々の起源に由来する種々のプロモーターに精通しているであろう。これらは、例えば、ジェンバンクなどのデータバンクに寄託されており、商業的ソースまたは単独のソース由来のポリヌクレオチド配列内の別々の要素またはクローン化要素として得られる。誘導性プロモーターでは、プロモーターの作用は、シグナルに応答して増減し得る。誘導性プロモーターの一例は、テトラサイクリン（ｔｅｔ）プロモーターである。これは、テトラサイクリンオペレーター配列（ｔｅＯ）を含み、テトラサイクリン調節トランス活性化因子タンパク質（ｔＴＡ）により誘導できる。テトラサイクリンの存在下では、ｔＴＡのｔｅｔＯへの結合が阻害される。誘導性プロモーターの例は、ｊｕｎ、ｆｏｓ、メタロチオネインおよびヒートショックプロモーターである（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．＆ Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９；Ｇｏｓｓｅｎ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ １９９４，５，５１６－５２０も参照されたい）。真核生物中での高発現のために特に好適なプロモーターには、例えば、ハムスターのユビキチン／Ｓ２７ａプロモーター（国際公開第９７／１５６６４号）、ＳＶ４０初期プロモーター、アデノウィルス主要後期プロモーター、マウスメタロチオネイン－１プロモーター、ラウス肉腫ウィルスの長末端反復配列領域およびヒトサイトメガロウィルスの初期プロモーターが存在する。その他の異種の哺乳動物プロモーターの例は、アクチン、免疫グロブリンまたはヒートショックプロモーターである。

【０２６０】

例えば、プロモーターは、転写活性を高めるために、エンハンサー配列に機能的に連結されてもよい。このために、１種または複数のエンハンサーおよび／またはいくつかのエンハンサー、例えば、ＣＭＶまたはＳＶ４０エンハンサー配列のコピーを使用し得る。例えば、プロモーターは、転写活性を高めるために、エンハンサー配列に機能的に連結されてもよい。このために、１種または複数のエンハンサーおよび／またはいくつかのエンハ

ンサー、例えば、ＣＭＶまたはＳＶ４０エンハンサー配列のコピーを使用し得る。
【０２６１】
当業者なら、用語のエンハンサーは、シス位置でプロモーターの活性に作用することにより、このプロモーターに機能的に連結された遺伝子の転写を刺激するポリヌクレオチド配列を包含し得ることを理解するであろう。プロモーターと異なり、エンハンサーは、位置および向きと無関係であり、したがって、エンハンサーは、イントロン内もしくはコード領域内の、転写単位の前または後ろに配置できる。エンハンサーは、転写単位の直近およびプロモーターからかなりの距離の両方に配置し得る。プロモーターと物理的および機能的重なり合いを有することも可能である。当業者なら、ポリヌクレオチド配列（例えば、ＡＴＣＣに寄託されたまたは商業的および単独ソース由来の）内の独立の要素またはクローン化要素として入手可能な種々の起源由来の（およびジェンバンクなどのデータバンクに寄託された、例えば、ＳＶ４０エンハンサー、ＣＭＶエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、アデノウィルスエンハンサーなどの）多くのエンハンサーを知っているであろう。よく使用されるＣＭＶプロモーターなどの多くのプロモーター配列は、エンハンサー配列も含む。ヒトＣＭＶエンハンサーは、これまでに特定された最強のエンハンサーの１つである。誘導可能なエンハンサーの一例は、メタロチオネインエンハンサーであり、これは、グルココルチコイドまたは重金属により刺激できる。
【０２６２】
基本的には、調節エレメントは、プロモーター、エンハンサー、終端部およびポリアデニル化シグナルおよびその他の発現制御配列を含む。誘導性および構成的調節配列は、種々の細胞型用として既知である。「転写調節エレメント」は通常、発現される遺伝子配列、転写開始および終結部位ならびにポリアデニル化シグナルの上流にプロモーターを含む。
【０２６３】
当業者なら、用語の「転写開始部位」は、一次転写産物、すなわち、ｍＲＮＡ前駆体に組み込まれる最初の核酸に対応する構築物中の核酸を包含し得ることを理解するであろう。転写開始部位は、プロモーター配列と重なり合い得る。
【０２６４】
当業者なら、用語の「転写終結部位」が、通常、目的の遺伝子または転写されるべき遺伝子部分の３'末端にあり、ＲＮＡポリメラーゼＲＮＡポリメラーゼによる転写の終止をもたらす、ヌクレオチド配列を包含することを理解するであろう。
【０２６５】
当業者なら、用語の「ポリアデニル化シグナル」は、真核生物のｍＲＮＡの３'末端にある特定の部位で開裂を起こし、切断した３'末端での約１００～２００アデニンヌクレオチド（ポリＡテイル）の転写後組み込みを生じさせるシグナル配列を包含し得ることを理解するであろう。ポリアデニル化シグナルは、切断部位の約１０～３０ヌクレオチド上流の配列ＡＡＴＡＡＡおよび下流に位置する配列を含む。ｔｋポリＡ、ＳＶ４０後期および早期ポリＡまたはＢＧＨポリＡなどの種々のポリアデニル化エレメントが知られている（例えば、米国特許第５，１２２，４５８号に記載されている）。
【０２６６】
「翻訳調節エレメント」は、発現されるそれぞれのポリペプチドに対し、翻訳開始部位（ＡＵＧ）、停止コドンおよびポリＡシグナルを含む。最適な発現のためには、すべての潜在的に不適切な追加の翻訳開始コドンまたは転写または発現レベルで発現に影響を与え得るその他の配列を排除するために、発現される核酸配列の５'－および／または３'－非翻訳領域を除去、付加または変更するのが望ましい場合がある。発現を促進するために、別の選択肢として、リボソームコンセンサス結合部位を開始コドンのすぐ上流に挿入してもよい。分泌ポリペプチドを産生するために、目的の遺伝子は通常、合成されたポリペプチドをＥＲ膜へおよびそれを通って輸送するシグナル前駆体ペプチドをコードするシグナル配列を含む。シグナル配列は、必ずではないが多くの場合、分泌タンパク質のアミノ末端に位置し、タンパク質がＥＲ膜を通って濾過された後で、シグナルペプチダーゼにより切断される。遺伝子配列は、必須ではないが、通常、それ自体のシグナル配列を含む。本

来のシグナル配列が存在しない場合、異種シグナル配列を既知の方法により導入し得る。多くのこの種のシグナル配列が当業者に知られており、ジェンバンクおよびＥＭＢＬなどのデータバンクに順次寄託されている。

【０２６７】

当業者なら、用語の「ポリペプチド（複数）」、「ポリペプチド」またはその文法的等価物は、同じ意味で用いられ、アミノ酸配列またはタンパク質を包含し、および任意の長さのアミノ酸のポリマーを包含することを理解するであろう。この用語はまた、グリコシル化、リン酸化、アセチル化またはタンパク質プロセッシングなどの反応により翻訳後修飾されているタンパク質を含む。ポリペプチドの構造は、例えば、アミノ酸の置換、欠失または挿入により、およびその他のタンパク質とのその生物活性を維持したままの融合により、改変され得る。

【０２６８】

細胞中で１種または複数の目的の遺伝子産物を産生するために、細胞を無血清培地中、目的の遺伝子の発現を可能とする条件下で、懸濁培養により増殖させ得る。例えば、目的の遺伝子が構成的プロモーターの制御下にある場合、特別な誘導因子を加える必要はない。例えば、目的の遺伝子の発現が誘導性プロモーターの制御下にある場合、対応する誘導因子を、十分であるが非毒性の濃度で、細胞培地に加える必要がある。複数の継代により細胞を所望通り増殖でき、好適な細胞培養容器に移すことができる。遺伝子産物は、細胞産物、膜結合型産物または分泌産物として産生される。

【０２６９】

一実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子を製造するステップは、所定の数の細胞にＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子をコードするコード部分を含む発現ベクターを安定に遺伝子導入するステップを含む。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子を製造するステップは、細胞に前記ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子をコードするコード部分を含む発現ベクターを安定に遺伝子導入するステップを含む。一実施形態では、細胞はＣＨＯ細胞である。別の実施形態では、細胞はＤＧ４４細胞である。別の実施形態では、細胞は、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子の発現および分泌に好適する当該技術分野において既知の任意の細胞である。一実施形態では、発現したＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、シグナルペプチドを欠いているＦＶＩＩ－ＣＴＰ３チモーゲンである。別の実施形態では、発現したＣＴＰ修飾ＦＶＩＩのアミノ酸配列は、配列番号７で示される。

【０２７０】

当業者なら、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩはチモーゲンとして不活性状態で発現され得るが、チモーゲンは精製プロセス中またはその後に活性化され得ることを理解するであろう。用語の「ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ」は、「ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ」と同義に使用し得、不活性および活性型のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの両方を包含し得る。同様に、個々のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子ポリペプチド、例えば、ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３はまた、名称ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａを使用して、不活性または活性型または両方を表し得る。一実施形態では、活性化ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$を含むＣＴＰ修飾ポリペプチドは、ジスルフィド結合で連結された軽鎖および重鎖を含む。

【０２７１】

別の実施形態では、遺伝子導入細胞は、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子を発現する。別の実施形態では、発現および製造されたＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３は、前記第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子のカルボキシ末端に結合した２個のＣＴＰ、および前記第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子のアミノ末端に結合した１個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドからなる。別の実施形態では、発現および製造されたＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子は、前記第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子のカルボキシ末端に結合した１個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドからなる。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固第ＶＩＩ因子の発現は、高発現レベルである。別の実施形態では、前記ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子は、高度グリコシル化されている。別の実施形態では、前記ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子は、高度シアル化されている。別の実施形態では、前記ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因

子は、高いＯ－グリカン含量を有する。別の実施形態では、前記ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子は、高いＮ－グリカン含量を有する。別の実施形態では、前記ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子は、高荷電Ｎ－グリカン含量を有する。別の実施形態では、前記ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子は、高い比率のカルボキシグルタミン酸を有する。本明細書で詳細に記載のように、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子は、異なるグリコシル化含量およびパターンを有し得る。本明細書で開示される方法により製造されたＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子は、本明細書で開示のいずれかのグリコシル化パターンおよび含量を含み得る。一般に、ここで提供される製造方法は、高グリコシル化含量および高い比率のグリコシル化されたグリコシル化部位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子を提供する。

【０２７２】

別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高Ｏ－グリカン含量は、少なくとも２ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高Ｏ－グリカン含量は、少なくとも４ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高Ｏ－グリカン含量は、少なくとも５ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高Ｏ－グリカン含量は、少なくとも６ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高Ｏ－グリカン含量は、少なくとも８ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高Ｏ－グリカン含量は、少なくとも１０ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高Ｏ－グリカン含量は、少なくとも１２ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高Ｏ－グリカン含量は、少なくとも１４ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高Ｏ－グリカン含量は、少なくとも１６ｍｏｌ／ｍｏｌである。

【０２７３】

一実施形態では、Ｏ－グリカンの高レベルまたは高含量は、本明細書で開示の製造プロセスの上流プロセスで促進される。別の実施形態では、Ｏ－グリカンの高レベルまたは高含量は、本明細書で開示の製造プロセスのクローンにより促進される。別の実施形態では、高Ｏ－グリカン含量または高レベルは、最終原薬が得られるまで維持される。

【０２７４】

別の実施形態では、前記ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子は、高シアル酸含量を有する。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高シアル酸含量は、少なくとも４ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高シアル酸含量は、少なくとも６ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高シアル酸含量は、少なくとも８ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高シアル酸含量は、少なくとも１０ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高シアル酸含量は、少なくとも１２ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高シアル酸含量は、少なくとも１４ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高シアル酸含量は、少なくとも１５ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高シアル酸含量は、少なくとも１７ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高シアル酸含量は、少なくとも１８ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高シアル酸含量は、少なくとも２０ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高シアル酸含量は、少なくとも２２ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高シアル酸含量は、少なくとも２５ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高シアル酸含量は、少なくとも２７ｍｏｌ／ｍｏｌである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高シアル酸含量は、少なくとも３０ｍｏｌ／ｍｏｌである。

【０２７５】
別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも４０％の比率である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも５０％の比率である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも６０％の比率である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも７０％の比率である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも８０％の比率である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも８５％の比率である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも９０％の比率である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも９１％の比率である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも９２％の比率である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも９３％の比率である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも９４％の比率である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも９５％の比率である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも９６％の比率である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも９７％の比率である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも９８％の比率である。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の前記高比率のカルボキシグルタミン酸は、少なくとも９９％の比率である。当業者なら、カルボキシグルタミン酸残基の％は、カルボキシグルタミン酸残基ドメインレス（ＧｌａドメインレスＧｌａ）％に反比例して表現され得、例えば、高比率のＧｌａが４０％の場合、ドメインレスＧｌａは６０％であることを理解するであろう。

【０２７６】
一実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子を製造するステップは、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子を過剰発現する細胞クローンを得ることを含む。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾凝固第ＶＩＩ因子の発現は、最大限である。別の実施形態では、発現のレベルは、３０～１５００ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも３０ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも４０ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも５０ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも６０ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも７０ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、５０～７０ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも２００ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも３００ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも４００ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも５００ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも６００ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも７００ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも８００ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも９００ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも１０００ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも１１００ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも１２００ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも１３００ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも１４００ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、発現のレベルは、少なくとも１５００ｍｇ／Ｌである。別の実施形態では、クローンは、培地中で増殖され、マスターセルバンク（ＭＣＢ）およびワーキングセルバンク

（ＷＣＢ）を形成する。一実施形態では、ステップ（ｃ）でのクローンはＭＣＢから得られる。別の実施形態では、クローンはＷＣＢから得られる。

【０２７７】

ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、分泌遺伝子産物として細胞培地から得られる。しかし、タンパク質またはポリペプチドが分泌シグナルなしで発現される場合、遺伝子産物は、同様に、細胞ライセートから単離し得る。実質的にその他の組換えタンパク質および宿主細胞タンパク質を含まない純粋な均一産物を得るために、従来の精製手順が実施される。最初に、細胞および細胞デブリが培地またはライセートから除去される場合が多い。その後、目的の遺伝子産物から、混入可溶性タンパク質、ポリペプチドおよび核酸が、例えば、免疫親和性およびイオン交換カラム、アフィニティカラム、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣまたはセファデックス、ヒドロキシアパタイト、シリカまたはＤＥＡＥ（本明細書の実施例参照）などの陽イオン交換樹脂によるクロマトグラフィーの分取により除かれる。当該技術分野において既知のおよび組換え宿主細胞により発現された異種のタンパク質の精製に繋がる一般方法は、当業者に既知であり、例えば、Ｈａｒｒｉｓ ｅｔ ａｌ．（Ｈａｒｒｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｐｉｃｋｗｏｏｄ ａｎｄ Ｈａｍｅｓ，ｅｄｓ．，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ，１９９５）およびＳｃｏｐｅｓ（Ｓｃｏｐｅｓ，Ｒ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ，１９８８）による文献に記載されている。これらの方法は、本明細書で開示される方法の全体または一部として、採用し得る。

【０２７８】

別の実施形態では、無血清条件下の哺乳動物細胞中でのＣＴＰ修飾ＦＶＩＩの調製方法が本明細書で開示され、該方法は、（ｉ）哺乳動物細胞は、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩをコードする遺伝子を含むこと；（ｉｉ）哺乳動物細胞は、哺乳動物細胞の複製を可能とする無血清条件下で増殖されること；（ｉｉｉ）いずれの場合にも、無血清条件下で、少なくとも１つのこれらの哺乳動物細胞が細胞培養容器中に沈着すること；（ｉｖ）適切に沈着した哺乳動物細胞は無血清条件下で複製されること；（ｖ）複製された細胞が、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩが発現される無血清条件で培養されること；および（ｖｉ）その後、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ産物が細胞または培養上清から単離され、精製および活性化されること、を特徴とする。このプロセスの別の実施形態では、哺乳動物細胞は、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩの遺伝子が導入されている、遺伝子導入哺乳動物細胞である。したがって、本明細書で開示の方法はまた、上記プロセスのステップ（ｉ）の前に、哺乳動物細胞が少なくともＣＴＰ修飾ＦＶＩＩをコードする核酸を遺伝子導入することを特徴とする、組み換え遺伝子産物を調製する方法に関する。対応する哺乳動物細胞の安定な遺伝子導入が好ましい。

【０２７９】

無血清でタンパク質不含または既知組成の培地の例には、例えば、商業的に入手可能な培地 Ｈａｍ's Ｆ１２（Ｓｉｇｍａ，Ｄｅｉｓｅｎｈｏｆｅｎ，ＤＥ）、ＲＰＭＩ １６４０（Ｓｉｇｍａ）、ダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ；Ｓｉｇｍａ）、基礎培地（ＭＥＭ；Ｓｉｇｍａ）、イスコフ改変ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ；Ｓｉｇｍａ）、ＣＤ ＣＨＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，Ｃａｌｉｆ．，ＵＳＡ）、ＣＨＯ－Ｓ－ＳＦＭＩＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、無血清ＣＨＯ培地（Ｓｉｇｍａ）、ＣＤ－ＰｏｗｅｒＣＨＯ２培地（Ｌｏｎｚａ）および無タンパク質ＣＨＯ培地（Ｓｉｇｍａ）が挙げられる。それぞれのこれらの培地は、必要に応じ、ホルモンおよび／またはその他の増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、上皮増殖因子、インスリン様増殖因子）、塩（例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、リン酸塩）、緩衝液（例えば、ヘペス）、ヌクレオシド（例えば、アデノシン、チミジン）、グルタミン、グルコースまたはその他の同等栄養素、抗生物質および／または微量元素または市販のフィード、例えば、Ｐｏｗｅｒ Ｆｅｅｄ Ａ（Ｌｏｎｚａ）などの種々の化合物で補充できる。複製可能細胞が１種または複数の選択可能マーカーを発現する組み換え細胞の場合、抗生物質などの１種または複数の好適な選択剤を培地に添加することも可能である。

【０２８０】
挿入されたコード配列（ポリペプチドをコードする）の転写および翻訳のための必須のエレメントを含む以外に、本明細書で開示の発現構築物はまた、発現されたポリペプチドの安定性、産生、精製、収率または活性を最適化するように操作された配列を含むことができることは理解されよう。一実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩをコードするヌクレオチド配列は、配列番号４で示される。
【０２８１】
いくつかの実施形態では、形質転換細胞を、効果的な条件下で培養し、それにより、大量の組換え型ポリペプチドの発現を可能にする。いくつかの実施形態では、効果的な培養条件としては、限定されないが、タンパク質生成を可能にする有効な培地、バイオリアクター、温度、ｐＨおよび酸素条件が挙げられる。当業者なら、用語の「有効培地」とは、細胞が培養されて本明細書で開示の組み換えポリペプチドが産生される任意の培地を包含し得ることを理解するであろう。いくつかの実施形態では、培地は典型的には、同化可能な炭素、窒素およびリン酸源、ならびに適切な塩、鉱物、金属、および他の栄養素、例えばビタミンを有する水溶液を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で開示の細胞は、従来の発酵バイオリアクター、振盪フラスコ、試験管、マイクロタイターディッシュおよびペトリ皿中で培養できる。いくつかの実施形態では、培養は、組み換え細胞に適切な温度、ｐＨおよび酸素含量で行われる。いくつかの実施形態では、培養条件は、当業者の専門技術の範囲内である。
【０２８２】
一実施形態では、培養条件は、約２０～８０％の溶存酸素（ＤＯ）含量を含んでいた。別の実施形態では、ＤＯ含量は、約２０～３０％である。別の実施形態では、ＤＯ含量は、約３０～４０％である。別の実施形態では、ＤＯ含量は、約４０～５０％である。別の実施形態では、ＤＯ含量は、約５０～６０％である。別の実施形態では、ＤＯ含量は、約６０～７０％である。別の実施形態では、ＤＯ含量は、約７０～８０％である。
【０２８３】
一実施形態では、培養条件は、ある温度で開始するｐＨを含み、製造中に別のｐＨに変化する。別の実施形態では、約７．３のｐＨで開始され、バイオリアクターインキュベーション中に約６．７に変化する。別の実施形態では、約７．３、約７．２または約７．１のｐＨで開始され、バイオリアクターインキュベーション中に約６．７、約６．８、約６．９または約７．０に変化する。
【０２８４】
いくつかの実施形態では、産生のために用いられるベクターおよび宿主系に応じて、得られる本明細書で開示のポリペプチドは、組み換え細胞内に残るか、または培地中に分泌される。
【０２８５】
一実施形態では、培養の所定時間後に、組換え型ポリペプチドの回収が行われる。
【０２８６】
当業者なら、本明細書で使われる場合、「組換え型ポリペプチドの回収」という語句は、ポリペプチドを含有する培地全体を収集することを包含し、分離または精製の追加のステップを意味し得ることを理解するであろう。
【０２８７】
一実施形態では、本明細書で開示のポリペプチドは、限定されないが、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、濾過、電気泳動、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、コンカナバリンＡクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、等電点電気泳動および示差的可溶化などの種々の標準的なタンパク質精製技術を用いて精製される。
【０２８８】
一実施形態では、それぞれのカラムは、制御または非制御温度下で稼動できる。
【０２８９】

一実施形態では、全てのクロマトグラフィーステップは、ダウンフローモードで行われる。別の実施形態では、全てのクロマトグラフィーステップは、アップフローモードで運転される。

【０２９０】

一実施形態では、回収を容易にするために、発現されるコード配列を、本明細書で開示のポリペプチドをコードするように、および切断可能な部分に融合するように設計できる。一実施形態では、ポリペプチドがアフィニティクロマトグラフィーによって、（例えば、切断可能な部分に特異的なカラム上への固定によって、）容易に単離されるように、融合タンパク質を設計できる。一実施形態では、切断部位が、ポリペプチドと切断可能部分との間となるように設計し、この部位で融合タンパク質を特異的に切断する適切な酵素または薬剤での処理によって、ポリペプチドが、クロマトグラフィーカラムから放出され得る［例えば、Ｂｏｏｔｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｌｅｔｔ．１９：６５－７０（１９８８）、およびＧａｒｄｅｌｌａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６５：１５８５４－１５８５９（１９９０）を参照］。

【０２９１】

一実施形態では、本明細書で開示のポリペプチドは、「実質的に純粋な」形態で回収される。当業者なら、「実質的に純粋な」という語句は、本明細書に記載の用途でのタンパク質の効率的な使用を可能にする純度を包含し得ることを理解するであろう。このような形態はまた、本明細書で同様に開示の高度グリコシル化（Ｏ－グリカンおよび／またはＮ－グリカン）および高度シアル化型を含む。別の実施形態では、このような形態は、高い比率のカルボキシル化グルタミン酸残基および／または低い比率の酸化型を有する形態を含み得る。さらに別の実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドは、実質的に純粋で、活性型のポリペプチドを含み得る。

【０２９２】

別の実施形態では、本明細書に記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａの酸化パーセントは、２０％未満の酸化である。別の実施形態では、本明細書に記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａの酸化パーセントは、１５％未満の酸化である。別の実施形態では、本明細書に記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａの酸化パーセントは、１０％未満の酸化である。別の実施形態では、本明細書に記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａの酸化パーセントは、８％未満の酸化である。別の実施形態では、本明細書に記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａの酸化パーセントは、５％未満の酸化である。別の実施形態では、本明細書に記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａの酸化パーセントは、４％未満の酸化である。別の実施形態では、本明細書に記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａの酸化パーセントは、３％未満の酸化である。

【０２９３】

一実施形態では、酸化型の減少および酸化型のレベルの制御は、上流から最終原薬までの全製造プロセスを通して実施される。

【０２９４】

別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも４０％である。別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも５０％である。別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも６０％である。別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも７０％である。別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも７５％である。別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも８０％である。別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも８５％である。別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも９０％である。別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも９１％である。別の実施形態では、前記

実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも９２％である。別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも９３％である。別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも９４％である。別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも９５％である。別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも９６％である。別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも９７％である。別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも９８％である。別の実施形態では、前記実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドの純度は、少なくとも９９％である。さらなる実施形態では、純度パーセンテージは、９７．３％、９７．６％、９７．４％および９７．０％からなる群から選択される。

【０２９５】

一実施形態では、本明細書で開示の対象は、ヒト対象である。別の実施形態では、対象は、家畜（ｄｏｍｅｓｔｉｃａｔｅｄ　ａｎｉｍａｌ）である。別の実施形態では、対象は、ペットである。別の実施形態では、対象は哺乳動物である。別の実施形態では、対象は、家畜（ｆａｒｍ　ａｎｉｍａｌ）である。別の実施形態では、対象はサルである。別の実施形態では、対象はウマである。別の実施形態では、対象は雌ウシである。別の実施形態では、対象はマウスである。別の実施形態では、対象は、ラットである。別の実施形態では、対象は、イヌである。別の実施形態では、対象は、ネコである。別の実施形態では、対象は、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、マウスまたはシカである。一実施形態では、対象は、雄性である。別の実施形態では、対象は、雌性である。一実施形態では、対象は、小児であり、別の実施形態では、青年期であり、別の実施形態では、成体であるか、または、別の実施形態では、より高齢の対象である。別の実施形態では、対象は、小児の対象であり、別の実施形態では、高齢の対象である。

【０２９６】

一実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドは、インビトロの発現系を用いて合成される。一実施形態では、インビトロ合成法は当技術分野で公知であり、系の構成要素は市販されている。

【０２９７】

一実施形態では、組換えＤＮＡ技術を用いてＣＴＰで修飾された第ＶＩＩａ因子の製造が実施される。

【０２９８】

いくつかの実施形態では、組換え型ポリペプチドは、合成および精製され、それらの治療効力は、インビボまたはインビトロのいずれかでアッセイできる。一実施形態では、本明細書で開示のＣＴＰで修飾された組換え第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の結合活性は、種々のアッセイを用いて確認できる。

【０２９９】

一実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子を製造する方法は、前記ＷＣＢから前記ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子を最適に発現するクローンを得て、前記クローンを増殖させるステップを含む。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子を製造する方法は、前記ＭＣＢから前記ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子を最適に発現するクローンを得て、前記クローンを増殖させるステップを含む。別の実施形態では、細胞クローンは、一連の継代培養ステップにより、生産バイオリアクターのレベルまで溶液中で増殖される。別の実施形態では、前記継代培養クローンを含む溶液がバイオリアクター中に播種される。別の実施形態では、バイオリアクターは、使い捨て型のバイオリアクターである。別の実施形態では、バイオリアクターには、ステンレス鋼バイオリアクター、ロッキングモーションバイオリアクター、例えば、ＧＥのＷａｖｅシステム、灌流バイオリアクター、または任意の他の当該技術分野において既知のバイオリアクターシステムが含まれる。一実施形態では、バイオリアクターからの細胞の取り出しは、使い捨て型のフィルターシステムの使用により行われ

る。大規模製造が実施される場合、濾過システムの使用の前に、連続的な遠心分離を使用し得る。

【０３００】

一実施形態では、細胞クローンは、さらに増殖されるか、またはバイオリアクターのサイズを大きくしながら、前記細胞を順次培養することにより目的の規模に達するまでスケールアップされる。別の実施形態では、バイオリアクターは、流加バッチ方式で運転される。別の実施形態では、バイオリアクターは、バッチ方式で運転される。別の実施形態では、バイオリアクターは、反復バッチ方式で運転される。別の実施形態では、バイオリアクターは、灌流方式で運転される。

【０３０１】

ピーク生存細胞密度は、採用したバイオリアクターのタイプにより異なる。一実施形態では、本明細書で開示の製造方法で試供したバイオリアクターのピーク生存細胞密度は、約０．２ｘ１０^{6}～１．４ｘ１０^{6}細胞／ｍｌである。別の実施形態では、本明細書で開示の製造方法で試供したバイオリアクターのピーク生存細胞密度は、約０．０５ｘ１０^{6}～１００ｘ１０^{6}である。別の実施形態では、バイオリアクターのピーク生存細胞密度は、約０．０５ｘ１０^{6}～０．５ｘ１０^{6}である。別の実施形態では、バイオリアクターのピーク生存細胞密度は、約０．５ｘ１０^{6}～５ｘ１０^{6}である。別の実施形態では、バイオリアクターのピーク生存細胞密度は、約５．０ｘ１０^{6}～５０ｘ１０^{6}である。別の実施形態では、バイオリアクターのピーク生存細胞密度は、約５０ｘ１０^{6}～１００ｘ１０^{6}である。

【０３０２】

バイオリアクター使用のためのフィードスキームは、異なり得、例えば、特定の日から反復して毎日供給、または数日に固定して、など、さらに、添加フィード％は、数％から５０％またはそれ超までと、異なり得る。

【０３０３】

当該技術分野において知られているように、ＤＭＳＯを異なる濃度でバイオリアクターに加えてもよい。一実施形態では、バイオリアクターの使用中に０．１～３％のＤＭＳＯが加えられる。別の実施形態では、０．１～０．５％のＤＭＳＯが加えられる。別の実施形態では、０．５～１．０％のＤＭＳＯが加えられる。別の実施形態では、１．０～１．５％のＤＭＳＯが加えられる。別の実施形態では、１．５～２．０％のＤＭＳＯが加えられる。別の実施形態では、２．０～２．５％のＤＭＳＯが加えられる。別の実施形態では、２．５～３．０％のＤＭＳＯが加えられる。

【０３０４】

一実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子を製造する方法は、精製活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ溶液を得るために、清澄化ハーベスト溶液を精製および活性化するステップを含む。別の実施形態では、本明細書で提供される方法を用いて製造された精製タンパク質溶液は、少なくとも５～９５％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、本明細書で提供される方法を用いて製造された精製タンパク質溶液は、少なくとも５％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、本明細書で提供される方法を用いて製造された精製タンパク質溶液は、少なくとも１０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、本明細書で提供される方法を用いて製造された精製タンパク質溶液は、少なくとも２０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、本明細書で提供される方法を用いて製造された精製タンパク質溶液は、少なくとも３０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、本明細書で提供される方法を用いて製造された精製タンパク質溶液は、少なくとも４０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも５０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも６０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも７０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも８０％のＣＴ

Ｐ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも９０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、本明細書で提供される方法を用いて製造された精製タンパク質溶液は、少なくとも９５％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。

【０３０５】

一実施形態では、清澄化ハーベストは、２～２５℃で最大２４時間保持される。別の実施形態では、清澄化ハーベストは、少なくとも５℃で最大１ヶ月間貯蔵される。

【０３０６】

一実施形態では、ステップで得られた清澄化ハーベストは、生物汚染度、細菌内毒素、特定のタンパク質含量、残留ＤＮＡ、ウィルス、ウィルス様粒子、および／またはマイコプラズマ、またはこれらの任意の組み合わせの試験が行われる。

【０３０７】

一実施形態では、清澄化ハーベストの精製は、次記を含むステップを順次実施することにより行われる：（ｇ）前記清澄化ハーベスト溶液を濃縮、透析濾過、および精製するステップであって、前記濃縮、透析濾過および精製が、前記清澄化ハーベスト溶液をアニオン交換カラムおよび疎水性相互作用カラムを順次通過させる中空繊維カセットまたはタンジェント流カセットにより行われるステップ；（ｈ）ステップ後に得られた前記清澄化ハーベストを取得するステップ；（ｉ）およびウィルスに毒性の溶液中でインキュベートすることにより前記清澄化ハーベスト中に存在するウィルスを不活化するステップであって、前記濃縮、透析濾過、活性化および精製の後に、前記清澄化ハーベスト溶液にアフィニティカラム、マルチモデルまたは混合モードカラム、疎水性相互作用カラム（ＨＩＣ）、およびアニオン交換カラムを順次通過させるステップ；（ｊ）ステップ（ｉ）後の前記清澄化ハーベスト溶液を取得し、前記清澄化ハーベスト溶液からナノ濾過によりウィルスを物理的に除去するステップ；（ｋ）ステップ（ｊ）後の前記清澄化ハーベスト溶液を取得し、前記清澄化ハーベスト溶液を濃縮、透析濾過および精製し、最大限に精製した、前記高度グリコシル化型のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａを含む清澄化ハーベストに到達するステップ。

【０３０８】

一実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、精製中に活性化される。代替的実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、精製後に活性化される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩは、精製のいずれかのステップと同時に活性化される。

【０３０９】

一実施形態では、清澄化ハーベストを濃縮および濾過するための限外濾過および透析濾過は、中空繊維カートリッジ、または同等のＴＦＦベースのＵＦＤＦステップを用いて実施し得る。カートリッジの公称分画分子量サイズは、１０，０００ｋＤａである。別の実施形態では、膜カートリッジは、３ｋＤａ～３０ｋＤａの分画分子量サイズを有するＰＥＳ／ＰＳ／ＲＣ膜に準拠し得る。別の実施形態では、ＵＦＤＦステップは、クロマトグラフィーステップの間に実施され得る。別の実施形態では、ＵＦＤＦステップは、アニオン交換カラムの使用の前に実施され得る。別の実施形態では、ＵＦＤＦステップは、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）の使用の前に実施され得る。別の実施形態では、ＵＦＤＦステップは、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）の使用の後で実施され得る。さらに別の実施形態では、ＵＦＤＦは複数のステップで実施され得、例えば、ＵＦＤＦはハーベスト後に、クロマトグラフィーステップの間に、またはナノ濾過によるウィルス除去後のステップとして、またはこれらの任意の組み合わせで実施し得る。

【０３１０】

別の実施形態では、アニオン交換カラムは、ＤＥＡＥ－セファロースＦａｓｔ　Ｆｌｏｗカラムである。別の実施形態では、ＤＥＡＥカラムにより、高度グリコシル化型の前記ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を精製する。一実施形態では、グリコシル化が大きいほど、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の薬力学が良好になる。別の実施形態では、アニオン交換カラムは、例えば、Ｃａｐｔｏ　ＤＥＡＥアニオン交換カラムまたはＥｓｈｍ

ｕｎｏ　Ｑなどの他の樹脂などの当該技術分野において既知のアニオン交換カラムを含んでよい。

【０３１１】

一実施形態では、疎水性カラムは、フェニル疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）カラムである。フェニルＨＩＣの使用サイクル数は、約１～１０の範囲であり得る。一実施形態では、１～３サイクルが好ましい。別の実施形態では、１～５サイクルが好ましい。別の実施形態では、１～６サイクルが好ましい。別の実施形態では、１～７サイクルが好ましい。別の実施形態では、１～８サイクルが好ましい。別の実施形態では、１～９サイクルが好ましい。別の実施形態では、１～１０サイクルが好ましい。別の実施形態では、当該技術分野において既知の緩衝液が洗浄および溶出に使用される。一実施形態では、溶出緩衝液は、プロピレングリコールを加えた硫酸アンモニウムを含む。一実施形態では、溶出緩衝液は、エチレングリコールを加えた硫酸アンモニウムを含む。

【０３１２】

一実施形態では、ヒドロキシアパタイト混合モードカラムは、セラミックヒドロキシアパタイト混合モードカラムを含む。ＣＨＴの使用サイクル数は、約１～１０の範囲であり得る。一実施形態では、１～３サイクルが好ましい。別の実施形態では、１～５サイクルが好ましい。別の実施形態では、１～６サイクルが好ましい。別の実施形態では、１～７サイクルが好ましい。別の実施形態では、１～８サイクルが好ましい。別の実施形態では、１～９サイクルが好ましい。別の実施形態では、１～１０サイクルが好ましい。ＣＨＴカラムからの溶出は、約３～１０カラム体積（ＣＶ）の間で実施され得る。一実施形態では、溶出は約３ＣＶで実施される。別の実施形態では、溶出は約４ＣＶで実施される。別の実施形態では、溶出は約５ＣＶで実施される。別の実施形態では、溶出は約６ＣＶで実施される。別の実施形態では、溶出は約７ＣＶで実施される。別の実施形態では、溶出は約８ＣＶで実施される。別の実施形態では、溶出は約９ＣＶで実施される。別の実施形態では、溶出は約１０ＣＶで実施される。

【０３１３】

一実施形態では、混入により清澄化ハーベスト中に存在し得るウィルスは、清澄化ハーベスト中で不活化される。別の実施形態では、ウィルスは１％のトリトン－Ｘ１００溶液を用いて不活化される。別の実施形態では、ウィルスは０．２～２％の％トリトン－Ｘ１００溶液を用いて不活化される。別の実施形態では、ウィルスは０．５％トリトン－Ｘ１００溶液を用いて不活化される。別の実施形態では、ウィルスは１～４％のトリトン－Ｘ１００溶液を用いて不活化される。別の実施形態では、ウィルスは０．２～０．５％のトリトン－Ｘ１００溶液を用いて不活化される。別の実施形態では、ウィルスは０．５～１．０％のトリトン－Ｘ１００溶液を用いて不活化される。別の実施形態では、ウィルスは２％のトリトン－Ｘ１００溶液を用いて不活化される。別の実施形態では、ウィルスは３％のトリトン－Ｘ１００溶液を用いて不活化される。別の実施形態では、ウィルスは４％のトリトン－Ｘ１００溶液を用いて不活化される。別の実施形態では、ウィルスは５～１０％のトリトン－Ｘ１００溶液を用いて不活化される。別の実施形態では、トリトン－Ｘ１００溶液中でのウィルス不活性化は、約０．５～２４時間の間行われる。別の実施形態では、トリトン－Ｘ溶液中でのウィルス不活性化は、約０．５～１時間の間行われる。別の実施形態では、トリトン－Ｘ溶液中でのウィルス不活性化は、約１～２時間の間行われる。別の実施形態では、トリトン－Ｘ溶液中でのウィルス不活性化は、約２～３時間の間行われる。別の実施形態では、トリトン－Ｘ溶液中でのウィルス不活性化は、約３～４時間の間行われる。別の実施形態では、トリトン－Ｘ溶液中でのウィルス不活性化は、約４～６時間の間行われる。別の実施形態では、トリトン－Ｘ溶液中でのウィルス不活性化は、約６～８時間の間行われる。別の実施形態では、トリトン－Ｘ溶液中でのウィルス不活性化は、約８～１０時間の間行われる。別の実施形態では、トリトン－Ｘ溶液中でのウィルス不活性化は、約１０～１２時間の間行われる。別の実施形態では、トリトン－Ｘ溶液中でのウィルス不活性化は、約１２～２４時間の間行われる。

【０３１４】

当業者なら、当該技術分野において利用可能な他の濃度、またはこれらのウィルスに毒性の他の溶液、例えば、ナトリウムコラートおよびツイーン８０を本明細書で開示の方法で使用し得ることを理解するであろう。別の実施形態では、トリ－ｎ－ｎ－ブチルホスフェート（ＴＮＢＰ）およびポリソルベート８０（ツイーン８０）を用いて、ステップ（ｈ）でウィルスが不活化される。

【０３１５】

一実施形態では、ウィルスは、ナノ濾過を用いて物理的に除去される。当業者なら、当該技術分野において既知の任意のウィルス除去用フィルターを本明細書で開示の方法で適用し得ることを理解するであろう。別の実施形態では、ナノ濾過は、Ｐｌａｎｏｖａまたは Ｐｌａｎｏｖａ型フィルターカートリッジ（１～６０ｍｍ^2）を用いて実施される。このような方法は、その後、当該技術分野において既知の方法を使用して、清澄化ハーベストからのウィルス除去の確認が行われる。

【０３１６】

一実施形態では、本明細書で開示される方法は、高度グリコシル化ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の少なくとも２０％の回収率を達成する。別の実施形態では、該方法は、高度グリコシル化ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．９％の回収率を達成する。

【０３１７】

一実施形態では、高度グリコシル化ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の精製後、本明細書で開示される方法は、前記ＣＴＰ修飾ポリペプチドの特性を明らかにすることを含む。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の純度が決定される。別の実施形態では、グリコシル化が測定される。別の実施形態では、グリコシル化部位占有率が決定される。一実施形態では、製造されたＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子の純度、グリコシル化物含量およびグリコシル化部位占有率が決定される。

【０３１８】

別の実施形態では、本明細書で開示の方法で利用される細胞クローンは、凍結セルバンクで貯蔵される。別の実施形態では、細胞クローンは、凍結乾燥セルバンクで貯蔵される。

【０３１９】

別の実施形態では、本明細書で開示の方法と組成物のセルバンクは、マスターセルバンクである。別の実施形態では、セルバンクは、ワーキングセルバンクである。別の実施形態では、セルバンクは、優良医薬品製造基準（ＧＭＰ）セルバンクである。別の実施形態では、セルバンクは、臨床グレードの材料の製造向けである。別の実施形態では、セルバンクは、ヒト使用のための規制実施に準ずる。別の実施形態では、セルバンクは、当該技術分野において既知の任意の他のタイプのセルバンクである。

【０３２０】

「優良医薬品製造基準」は、別の実施形態では、米国連邦規則の（２１ＣＦＲ２１０－２１１）により規定される。別の実施形態では、「優良医薬品製造基準」は、その他の臨床グレードの製造のためのまたはヒトの摂取のための標準、例えば、米国以外の国の標準により規定される。それぞれの可能性は、本明細書で開示の別々の実施形態を表す。

【０３２１】

別の実施形態では、細胞を増殖用の培地は、メトトレキセート（ＭＸＴ）を含む。別の実施形態では、培地は、メトトレキセート不含培地である。別の実施形態では、培地中に存在するＭＸＴの濃度は、約０．１～２ｕＭである。別の実施形態では、培地中に存在するＭＸＴの濃度は、約０．１～０．５ｕＭである。別の実施形態では、培地中に存在するＭＸＴの濃度は、約０．５～１．０ｕＭである。別の実施形態では、培地中に存在するＭＸＴの濃度は、約１．０～１．５ｕＭである。別の実施形態では、培地中に存在するＭＸＴの濃度は、約１．５～２．０ｕＭである。用語の「培地」は、本明細書で開示のＣＴＰ

修飾第ＶＩＩ因子を含む細胞の増殖または培養に好適する液体またはゲルまたは粉末を包含し得ることはよく理解されよう。このような培地は、代わりに、「増殖培地」または「培養培地」と呼ばれることもあり、限定されないが、栄養培地、栄養強化培地、最少培地、鑑別培地、輸送培地、または選択培地を含み得る。さらなる態様では、選択培地は、製造プロセス中に、特定の群の細胞を選択するために好適し得る。

【０３２２】

一実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも５～９５％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも５％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも１０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも１５％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも２０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも３０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも４０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも５０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも６０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも７０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも８０％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも９０～９５％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも９５．１～９９．９％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。別の実施形態では、精製タンパク質溶液は、少なくとも１００％のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を含む。

【０３２３】

一実施形態では、製造されたＣＴＰ修飾凝固因子は、高のγ－カルボキシル化％を含む。当業者なら、凝固因子のパーセント（％）ガンマカルボキシル化は、ＣＴＰ修飾凝固因子の効力と直接相関を有し得ることを理解するであろう。一実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、少なくとも５０％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、少なくとも６０％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、少なくとも７０％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、少なくとも８０％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、少なくとも９０％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、少なくとも９２％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、少なくとも９３％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、少なくとも９４％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、少なくとも９５％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、少なくとも９６％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、少なくとも９７％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、少なくとも９８％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、少なくとも９９％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶ

ＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、少なくとも１００％のガンマカルボキシル化を含む。

【０３２４】

別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、４０～５０％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、５０～６０％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、６０～７０％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、７０～８０％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、８０～８５％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、８５～９０％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、９０～９２％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、９０～９５％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、９５～９７％のガンマカルボキシル化を含む。別の実施形態では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ３またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３のガンマカルボキシル化％は、９５～１００％のガンマカルボキシル化を含む。

【０３２５】

一実施形態では、低γ－カルボキシル化物の除去は、本明細書で開示の製造プロセスのマルチモデルまたは混合モードクロマトグラフィーステップで実施される（図１７、ステップ９参照）。

【０３２６】

一実施形態では、製造されたＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子は、高度グリコシル化されている。当業者なら、用語の「高度グリコシル化」は、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子に関する場合、総ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチドの約７０～８０％のグリコシル化レベルを包含し得ることをよく理解するであろう。別の実施形態では、高度グリコシル化ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子は、少なくとも７０％のグリコシル化レベルを有する。別の実施形態では、高度グリコシル化ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子は、少なくとも８０％のグリコシル化レベルを有する。別の実施形態では、この用語は、総ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチドの約８１～９０％のグリコシル化レベルを包含し得る。別の実施形態では、高度グリコシル化ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子は、少なくとも９０％のグリコシル化レベルを有する。別の実施形態では、この用語は、総ＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子ポリペプチドの約９１～９５％のグリコシル化レベルを包含し得る。別の実施形態では、この用語は、総ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチドの約９５．１～９９％のグリコシル化レベルを包含し得る。別の実施形態では、この用語は、総ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチドの１００％のグリコシル化レベルを包含し得る。高度グリコシル化ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチドは、長時間作用型第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子のための使用方法における有益な特性を有し、投与頻度の低減を支援し得る。高グリコシル化レベルは、組換え第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子に比較して、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子、例えば、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子の流体力学体積の顕著な増加に寄与する。これは、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子の循環時間の延長をもたらし得る。

【０３２７】

一実施形態では、ＣＴＰ当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも４～６である。別の実施形態では、ＣＴＰ当たりのＯ－グリカンの数は、４～６である。別の実施形態では、ＣＴＰ当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも４～８である。別の実施形態では、ＣＴＰ当たりのＯ－グリカンの数は、４～８である。一実施形態では、ＣＴＰ当たりのＯ－グ

リカンの数は、少なくとも６～８である。一実施形態では、ＣＴＰ当たりのＯ－グリカンの数は、６～８である。別の実施形態では、ＣＴＰ当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも４である。別の実施形態では、ＣＴＰ当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも５である。別の実施形態では、ＣＴＰ当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも６である。別の実施形態では、ＣＴＰ当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも７である。別の実施形態では、ＣＴＰ当たりのＯ－グリカンの数は、８である。

【０３２８】

一実施形態では、１個の結合ＣＴＰを有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも４～６である。別の実施形態では、１個の結合ＣＴＰを有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも６～８である。別の実施形態では、１個の結合ＣＴＰを有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも４～８である。別の実施形態では、２個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも８～１２である。別の実施形態では、２個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも１２～１６である。別の実施形態では、２個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも８～１６である。別の実施形態では、３個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも１２～１８である。別の実施形態では、３個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも１８～２４である。別の実施形態では、３個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも１２～２４である。別の実施形態では、４個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも１６～２４である。別の実施形態では、４個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも２４～３２である。別の実施形態では、４個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも１６～３２である。別の実施形態では、５個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも２０～３０である。別の実施形態では、５個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも３０～４０である。別の実施形態では、５個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも２０～４０である。別の実施形態では、６個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも２４～３６である。別の実施形態では、６個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも３６～４８である。別の実施形態では、６個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも２４～４８である。別の実施形態では、７個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも２８～３５である。別の実施形態では、７個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも４２～５６である。別の実施形態では、７個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも２８～５６である。別の実施形態では、８個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも３２～４８である。別の実施形態では、８個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも４８～６４である。別の実施形態では、８個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカン

の数は、少なくとも３２～６４である。別の実施形態では、９個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも３６～５４である。別の実施形態では、９個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも５４～７２である。別の実施形態では、９個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも３６～７２である。別の実施形態では、１０個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも４０～６０である。別の実施形態では、１０個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも６０～８０である。別の実施形態では、５個の結合ＣＴＰ単位を有するＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチド当たりのＯ－グリカンの数は、少なくとも４０～８０である。

【０３２９】

一実施形態では、ＣＴＰあたりのＯ－グリカン占有率は少なくとも７０％である。別の実施形態では、ＣＴＰあたりのＯ－グリカン占有率は少なくとも８０％である。別の実施形態では、ＣＴＰあたりのＯ－グリカン占有率は少なくとも９０％である。別の実施形態では、ＣＴＰあたりのＯ－グリカン占有率は１００％である。

【０３３０】

一実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａあたりの高い比率のＮ－グリカンは荷電される。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、少なくとも４０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、少なくとも５０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、少なくとも６０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、少なくとも７０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、少なくとも８０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、少なくとも８５％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、少なくとも９０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、少なくとも９５％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、１００％を含む。

【０３３１】

別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約４０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約５０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約６０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約７０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約８０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約８５％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約９０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約９５％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約１００％を含む。

【０３３２】

別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約１０％～３０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約２０％～４０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、

約３０％～４０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約２０％～５０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約４０％～５０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約３０％～６０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約５０％～６０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約４０％～７０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約６０％～７０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約５０％～８０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約７０％～８０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約５５％～８５％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約８０％～８５％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約６０％～９０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約８５％～９０％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約６５％～９５％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約９０％～９５％を含む。別の実施形態では、荷電しているＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａ当たりのＮ－グリカンの比率は、約９５％～１００％を含む。

【０３３３】

一実施形態では、荷電しているＮ－グリカンの高レベルは、本明細書で開示の製造プロセスの上流プロセスで促進される。別の実施形態では、６０％を超える荷電Ｎ－グリカンが初期ＤＳＰ段階に到達し、最終原薬が得られるまで、このレベルが維持される。

【０３３４】

一実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子は、高度シアル化されている。当業者なら、用語の「高度シアル化」は、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子に関する場合、総ＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子ポリペプチドの約７０～８０％のシアル化レベルを包含し得ることを理解するであろう。別の実施形態では、この用語は、総ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチドの約８０～９０％のシアル化レベルを包含し得る。別の実施形態では、この用語は、総ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチドの約９０～９５％のシアル化レベルを包含し得る。別の実施形態では、この用語は、総ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチドの約９５．１～９９％のシアル化レベルを包含し得る。別の実施形態では、この用語は、総ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチドの１００％のシアル化レベルを包含し得る。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子のＯ－グリカン構造は、モノシアル化コア１を含む。

【０３３５】

一実施形態では、本明細書に記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａの高い比率のシアル化およびＯ結合型グリカン含量は、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａの効力を増大する。別の実施形態では、本明細書に記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａの高い比率のシアル化およびＯ結合型グリカン含量は、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａの流体力学体積を増大させる。

【０３３６】

一実施形態では、本明細書に記載のＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａは、効力を有する。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａは、実質的に純粋な活性ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩポリペプチドである。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾ＦＶＩＩ／ＦＶＩＩａは、本明細書に記載の方法を用いて製造される。別の実施形態では、効力は少なくとも５，０００Ｕ／ｍｇである。別の実施形態では、効力は少なくとも７，５００Ｕ／ｍｇである

。別の実施形態では、効力は少なくとも１０，０００Ｕ／ｍｇである。別の実施形態では、効力は少なくとも１０，５００Ｕ／ｍｇである。別の実施形態では、効力は少なくとも１５，０００Ｕ／ｍｇである。別の実施形態では、効力は少なくとも２０，０００Ｕ／ｍｇである。別の実施形態では、効力は少なくとも２５，０００Ｕ／ｍｇである。別の実施形態では、効力は少なくとも２７，５００Ｕ／ｍｇである。別の実施形態では、効力は少なくとも３０，０００Ｕ／ｍｇである。別の実施形態では、効力は少なくとも３５，０００Ｕ／ｍｇである。別の実施形態では、効力は少なくとも４０，０００Ｕ／ｍｇである。さらなる実施形態では、効力は、１５，５６３Ｕ／ｍｇ、１６，７２０Ｕ／ｍｇ、２２，４７８Ｕ／ｍｇおよび２３，６０８Ｕ／ｍｇからなる群から選択される。

【０３３７】

一実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチドは、前記第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子のカルボキシ末端に結合した２個のＣＴＰ、および前記第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子のアミノ末端に結合した１個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドからなる。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子ポリペプチドは、前記第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子のカルボキシ末端に結合した１個の絨毛性ゴナドトロピンカルボキシ末端ペプチドからなる。

【０３３８】

一実施形態では、前記ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子をコードするコード部分を含む発現ベクターはまた、プロモーター、前記ＣＴＰ修飾ポリペプチドのためのコード配列、およびポリアデニル化配列も含む。一実施形態では、ポリアデニル化配列は、シミアンウィルス（ＳＶ）４０ポリアデニル化配列である。

【０３３９】

一実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、３０～１５００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも３０ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも４０ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも５０ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも６０ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも７０ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも５０～７０ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも８０ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも９０ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも７０～１００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも１００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも２００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも１００～２００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも３００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも２００～３００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも４００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも３００～４００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも５００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも５００～６００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも６００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも６００～７００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも７００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも７０１～８００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも８００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因

子は、少なくとも８０１～９００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも９００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも９０１～１０００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも１０００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも１００１～１１００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも１１００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも１１０１～１２００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも１２００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも１２０１～１３００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも１３００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも１３０１～１４００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも１４００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも１４０１～１５００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、少なくとも１５００ｍｇ／Ｌのレベルで発現される。

【０３４０】

当業者なら、用語の「発現」は、宿主細胞内の異種核酸配列の転写および／または翻訳を包含し得ることを理解するであろう。宿主細胞中での所望の産物／目的のタンパク質の発現のレベルは、本実施例にあるように、細胞中に存在する対応するｍＲＮＡまたはｃＤＮＡの量、または選択配列によりコードされる所望のポリペプチド／目的のタンパク質の量を基準にして決定し得る。例えば、選択配列から転写されたｍＲＮＡは、ノーザンブロットハイブリダイゼーション、リボヌクレアーゼＲＮＡ保護、細胞ＲＮＡに対するインサイツハイブリダイゼーションまたはＰＣＲにより定量できる（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９；Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，１９８７更新、を参照されたい）。選択配列によりコードされるタンパク質は、各種方法、例えば、ＥＬＩＳＡにより、ウェスタンブロッティングにより、ラジオイムノアッセイにより、免疫沈殿により、タンパク質の生物活性をアッセイすることにより、タンパク質を免疫染色法した後のＦＡＣＳ分析（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９；Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，１９８７更新、を参照されたい）またはホモジニアス時間分解蛍光法（ＨＴＲＦ）アッセイにより、定量できる。一実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子の定量化は、逆相高速液体クロマトグラフィー（ＲＰ－ＨＰＬＣ）の使用を含む。別の実施形態では、ＲＰ－ＨＰＬＣは、Ｃ－１８カラムを含む。別の実施形態では、ＲＰ－ＨＰＬＣは、Ｃ－８カラムを含む。別の実施形態では、本明細書で開示の方法は、ＲＰ－ＨＰＬＣを用いて、ハーベスト中のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子を定量する（実施例３ステップ２～５を参照されたい）。別の実施形態では、本明細書で開示の方法は、ＲＰ－ＨＰＬＣを用いて、ハーベスト中のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子を精製中に定量する。

【０３４１】

別の実施形態では、本明細書で開示のセルバンク、または凍結ストックは、９０％を超える解凍時の生存率を示す。別の実施形態では、貯蔵は、無期限の時間の間である。

【０３４２】

別の実施形態では、貯蔵は、２週間である。別の実施形態では、貯蔵は、３週間である。別の実施形態では、貯蔵は、１ヶ月間である。別の実施形態では、貯蔵は、２ヶ月間である。別の実施形態では、貯蔵は、３ヶ月間である。別の実施形態では、貯蔵は、５ヶ月間である。別の実施形態では、貯蔵は、６ヶ月間である。別の実施形態では、貯蔵は、９ヶ月間である。別の実施形態では、貯蔵は、１年間である。

【０３４３】

別の実施形態では、本明細書で開示のセルバンク、または凍結ストックは、本明細書で開示の所定の培地中で細胞の培養物を増殖すること、グリセロール含有溶液中で培養物を

凍結すること、および－２０℃未満の温度で細胞クローンを貯蔵すること、を含む方法により凍結保存される。別の実施形態では、温度は、約－７０℃である。別の実施形態では、温度は、約－７０～－８０℃である。別の実施形態では、本明細書で開示の任意の所定の培地をこの方法で用い得る。それぞれの所定の培地は、本明細書で開示の別々の実施形態を表す。

【０３４４】

本明細書で開示の方法および組成物の別の実施形態では、培養は、セルバンクから接種される。別の実施形態では、培養は、凍結ストックから接種される。別の実施形態では、培養は、種菌から接種される。別の実施形態では、培養は、コロニーから接種される。別の実施形態では、培養は、対数期の中間部増殖相で接種される。別の実施形態では、培養は、ほぼ対数期の中間部増殖相で接種される。別の実施形態では、培養は、別の増殖相で接種される。

【０３４５】

本明細書で開示の方法および組成物の別の実施形態では、凍結に使用される溶液は、２～２０％の量のＤＭＳＯを含む。別の実施形態では、量は２％である。別の実施形態では、量は２０％である。別の実施形態では、量は１％である。別の実施形態では、量は１．５％である。別の実施形態では、量は３％である。別の実施形態では、量は４％である。別の実施形態では、量は５％である。別の実施形態では、量は２％である。別の実施形態では、量は２％である。別の実施形態では、量は７％である。別の実施形態では、量は７．５％である。別の実施形態では、量は９％である。別の実施形態では、量は１０％である。別の実施形態では、量は１２％である。別の実施形態では、量は１４％である。別の実施形態では、量は１６％である。別の実施形態では、量は１８％である。別の実施形態では、量は２２％である。別の実施形態では、量は２５％である。別の実施形態では、量は３０％である。別の実施形態では、量は３５％である。別の実施形態では、量は４０％である。

【０３４６】

別の実施形態では、添加剤はショ糖である。別の実施形態では、添加剤は、いずれか他の束一的添加剤または、当該技術分野において既知の抗凍結特性を有する添加剤である。それぞれの可能性は、本明細書で開示の別々の実施形態を表す。

【０３４７】

一実施形態では、本明細書で開示の方法でおよび組成物のために使用される凍結溶液は、馴化培地およびＤＭＳＯを含む。一実施形態では、本明細書で開示の方法でおよび組成物のために使用される凍結溶液は、約４６．２５５％の馴化培地および７．５％のＤＭＳＯを含む。

【０３４８】

一実施形態では、細胞培養物は、当該技術分野において定型化した技術により増殖される。別の実施形態では、一定のｐＨが細胞培養物の増殖中維持される。別の実施形態では、ｐＨは、約７．０で維持される。別の実施形態では、ｐＨは、約６である。別の実施形態では、ｐＨは、約６．５である。別の実施形態では、ｐＨは、約７．５である。別の実施形態では、ｐＨは、約８である。別の実施形態では、ｐＨは、６．５～７．５である。別の実施形態では、ｐＨは、６～８である。別の実施形態では、ｐＨは、６～７である。別の実施形態では、ｐＨは、７～８である。

【０３４９】

別の実施形態では、一定温度が細胞培養物の増殖中維持される。別の実施形態では、温度は、約３７℃で維持される。別の実施形態では、温度は、３７℃である。別の実施形態では、温度は、２５℃である。別の実施形態では、温度は、２７℃である。別の実施形態では、温度は、２８℃である。別の実施形態では、温度は、３０℃である。別の実施形態では、温度は、３２℃である。別の実施形態では、温度は、３４℃である。別の実施形態では、温度は、３５℃である。別の実施形態では、温度は、３６℃である。別の実施形態では、温度は、３８℃である。別の実施形態では、温度は、３９℃である。

【０３５０】
別の実施形態では、一定の溶存酸素濃度が細胞培養物の増殖中維持される。別の実施形態では、溶存酸素濃度は飽和の２０％で維持される。別の実施形態では、濃度は飽和の１５％である。別の実施形態では、濃度は飽和の１６％である。別の実施形態では、濃度は飽和の１８％である。別の実施形態では、濃度は飽和の２２％である。別の実施形態では、濃度は飽和の２５％である。別の実施形態では、濃度は飽和の３０％である。別の実施形態では、濃度は飽和の３５％である。別の実施形態では、濃度は飽和の４０％である。別の実施形態では、濃度は飽和の４５％である。別の実施形態では、濃度は飽和の５０％である。別の実施形態では、濃度は飽和の５５％である。別の実施形態では、濃度は飽和の６０％である。別の実施形態では、濃度は飽和の６５％である。別の実施形態では、濃度は飽和の７０％である。別の実施形態では、濃度は飽和の７５％である。別の実施形態では、濃度は飽和の８０％である。別の実施形態では、濃度は飽和の８５％である。別の実施形態では、濃度は飽和の９０％である。別の実施形態では、濃度は飽和の９５％である。別の実施形態では、濃度は飽和の１００％である。別の実施形態では、濃度は飽和のほぼ１００％である。

【０３５１】
本明細書で開示の方法および組成物の別の実施形態では、培養物は、容器当たり２リットル（Ｌ）の最大体積を有する培地中で増殖される。別の実施形態では、培地は、容器当たり２００ｍｌの最大体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり３００ｍｌの最大体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍｌの最大体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり７５０ｍｌの最大体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり１Ｌの最大体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり１．５Ｌの最大体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり２．５Ｌの最大体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり３Ｌの体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり５Ｌの体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり少なくとも５Ｌの体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり少なくとも１０Ｌの体積を有する。

【０３５２】
別の実施形態では、培地は、容器当たり２Ｌの最小体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍｌの最小体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり７５０ｍｌの最小体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり１Ｌの最小体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり１．５Ｌの最小体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり２．５Ｌの最小体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり３Ｌの最小体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり４Ｌの最小体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり５Ｌの最小体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり６Ｌの最小体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり８Ｌの最小体積を有する。別の実施形態では、培地は、容器当たり１０Ｌの最小体積を有する。

【０３５３】
別の実施形態では、凍結ステップは、培養物が1×10^6生存細胞（ＶＣ）／ｍｌの密度を有するときに、実施される。別の実施形態では、バイオマスは、1.5×10^6ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、1.5×10^6ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、2×10^6ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、3×10^6ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、4×10^6ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、5×10^6ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、7×10^6ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、9×10^6ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、10×10^6ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、12×10^6ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、15×10^6ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、20×10^7ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、２５

ｘ１０^{6}ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、３０ｘ１０^{7}ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、３３ｘ１０^{6}ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、４０ｘ１０^{6}ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、５０ｘ１０^{6}ＶＣ／ｍｌである。別の実施形態では、バイオマスは、５０ｘ１０^{6}を超えるＶＣ／ｍｌである。

【０３５４】

本明細書で開示の方法および組成物の別の実施形態では、細胞培養物は、液体窒素中で急速冷凍され、続けて、最終凍結温度で貯蔵される。別の実施形態では、培養物は、よりゆるやかな方法で、例えば、培養物のバイアルを最終貯蔵温度中に置くことにより、凍結される。別の実施形態では、培養物は、当該技術分野において既知のいずれか他の細胞培養物の凍結のための方法で凍結される。

【０３５５】

当業者なら、用語の「細胞培養」および「組織培養」は、同義に使用され、液体培地中の、または液体培地を保持するガラス、プラスチックまたは寒天などの表面上の懸濁培養における、インビトロでの細胞の維持を意味することを理解するであろう。一般に、「細胞培養」は、一定の好適なｐＨを維持するために緩衝する培地を必要とする。細胞培養で使用される培地は通常、必要な栄養素の十分な供給を含むように配合され、特定の細胞が維持されるように浸透圧を調整でき、温度および気相も好適な許容限度内に制御される。細胞培養技術は当該技術分野において周知である。例えば、Ｍｏｒｇａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９３ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ，ＢＩＯＳ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｏｘｆｏｒｄ，ＵＫ；およびＡｄａｍｓ，Ｒ．Ｌ．Ｐ．１９９０ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ ｆｏｒ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｓ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、を参照されたい。

【０３５６】

当業者なら、用語の「継代」は、細胞集団の継代培養（ｓｕｂｃｕｌｔｕｒｉｎｇ）の行為を包含し得ることを理解するであろう。当業者なら、用語の「継代培養」は、無菌培地、一実施形態では、新しい無菌培地で、前の培養からの試料を有する培地、の接種により確立された細胞培養を包含し得ることを理解するであろう。

【０３５７】

また、当業者なら、用語の「細胞株」は、継代培養技術を用いた、初代培養物由来の細胞集団を包含し得ることを理解するであろう。したがって、初代培養物は、２つまたはそれ以上の新しい培養物に継代培養でき、継代培養は、定期的間隔で数ヶ月間反復されて、細胞株が維持される。継代培養は、確立された細胞培養技術を用いて実施できる。

【０３５８】

一実施形態では、継代培養された細胞株、および不死化細胞株は、ケラチン、ホルモン受容体および増殖因子受容体などのそれらの特定の機能的マーカーの発現により特定できる。

【０３５９】

いくつかの態様では、培養は、増殖因子を加えた無血清限定培地中で実施し得る。他の態様では、培地は血清を含み、増殖因子を添加、または添加しない。このような変更は、当業者により細胞増殖を最適化するように経験的に決定し得る。

【０３６０】

また、当業者なら、用語の「細胞株」は、無制限のインビトロ増殖の潜在能力を有するとして特徴付けられる単一外植片由来の細胞集団を包含し得ることを理解するであろう。細胞株は、初代培養物から、その生存能力に基づいて単離でき、培養により増殖を継続できる。すべての新生細胞集団がインビトロで無期限に増殖する能力を有しているとは限らないが、腫瘍組織から最初に得た細胞株は、インビボで形質転換されているかもしれない。さらに、細胞株は通常、多くの回数の分裂を通してそれらの分化特性を保持している。

【０３６１】

好適な細胞培養基材は通常、滅菌でき、毒性因子を浸出させず、顕微鏡画像を歪ませな

い容器である。したがって、ガラスおよびプラスチックから形成されたプレートが本明細書での好適な基材であるプラスチック容器は、細胞付着を促進するように、当該技術分野において既知の技術を使用してさらに処理され得る（Ｒａｍｓｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，１９８４　Ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　２０：８０２）。好適な組織培地は通常、等張性、緩衝性の、無機塩、アミノ酸、ビタミンおよび種々のサプリメントを加えた、エネルギー源を与える基本栄養素培地からなる。サプリメントには、血清（例えば、ウシ胎仔血清、など）、細菌混入を防ぐまたは選択条件を与えるための種々の抗生物質、付着および成長因子、などを含み得る。限定されないが、例えば、基礎培地（ＭＥＭ）、Ｒｏｓｅｗｅｌｌ　Ｐａｒｋ　Ｍｅｍｏｒｉａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０またはダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）などの多くの培地配合物が当技術分野において知られている。好適な組織培養条件もまた、当技術分野で既知である。例えば、Ｍｏｒｇａｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３　Ａｎｉｍａｌ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅ，ＢＩＯＳ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ　Ｌｔｄ．，Ｏｘｆｏｒｄ，ＵＫ；およびＡｄａｍｓ，Ｒ．Ｌ．Ｐ．１９９０　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｓ，Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、を参照されたい。本明細書で開示の別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子の製造方法は、無血清プロセスである。本明細書で開示の別の実施形態では、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩａ因子の製造方法は、動物由来物不含プロセスである。

【０３６２】

本明細書で開示の方法および組成物の別の実施形態では、培養物の貯蔵温度は、－２０～－８０℃である。別の実施形態では、温度は、－２０℃よりかなり低い。別の実施形態では、温度は、－７０℃より暖かくない。別の実施形態では、温度は、－７０℃である。別の実施形態では、温度は、約－７０℃である。別の実施形態では、温度は、－２０℃である。別の実施形態では、温度は、約－２０℃である。別の実施形態では、温度は、－３０℃である。別の実施形態では、温度は、－４０℃である。別の実施形態では、温度は、－５０℃である。別の実施形態では、温度は、－６０℃である。別の実施形態では、温度は、－８０℃である。別の実施形態では、温度は、－３０～－７０℃である。別の実施形態では、温度は、－４０～－７０℃である。別の実施形態では、温度は、－５０～－７０℃である。別の実施形態では、温度は、－６０～－７０℃である。別の実施形態では、温度は、－３０～－８０℃である。別の実施形態では、温度は、－４０～－８０℃である。別の実施形態では、温度は、－５０～－８０℃である。別の実施形態では、温度は、－６０～－８０℃である。別の実施形態では、温度は、－７０～－８０℃である。別の実施形態では、温度は、－７０℃より低温である。別の実施形態では、温度は、－８０℃より低温である。

【０３６３】

別の実施形態では、凍結保存のために、細胞は、－７０℃未満の温度に到達するまで、凍結保護物質を含む培地中でゆっくり凍結され、その後、バイアルを液体窒素冷凍庫に移され、－１３０℃未満の温度で維持される。

【０３６４】

本明細書で開示の方法および組成物の別の実施形態では、凍結保存、または凍結貯蔵、は、最大２４時間である。別の実施形態では、凍結保存または凍結貯蔵は、最大２日間、最大３日間、最大４日間、最大１週間、最大２週間、最大３週間、最大１ヶ月間、最大２ヶ月間、最大３ヶ月間、最大５ヶ月間、最大６ヶ月間、最大９ヶ月間、または最大１年間である。それぞれの上記の可能性は、本明細書で開示のある実施形態である。

【０３６５】

別の実施形態では、凍結保存または凍結貯蔵は、最小１週間、最小２週間、最小３週間、最小１ヶ月間、最小２ヶ月間、最小３ヶ月間、最小５ヶ月間、最小６ヶ月間、最小９ヶ月間、最小１年間、最小１．５年間、最小２年間、最小３年間、最小５年間、最小７年間、最小１０年間、または１０年より長期間である。それぞれの上記の可能性は、本明細書で開示のある実施形態である。

【０３６６】
本明細書で開示の方法および組成物の別の実施形態では、細胞は、長期間の凍結保存または凍結貯蔵後の解凍の後で増殖を示す。別の実施形態では、細胞は、新しい培地にセルバンクまたは種菌由来の細胞での接種の約１５～２２時間後以内に増殖を示す。別の実施形態では、細胞は、新しい培地にセルバンクまたは種菌由来の細胞での接種の約１２～２０時間後以内に増殖を示す。一実施形態では、生存率、遺伝的安定性、および表現型安定性を確保するために、細胞株は指数増殖期で維持される必要がある（定期的に継代培養を介して）。
【０３６７】
「長期間」の凍結保存、または凍結貯蔵は、別の実施形態では、１ヶ月間である。別の実施形態では、期間は２ヶ月間である。別の実施形態では、期間は３ヶ月間である。別の実施形態では、期間は５ヶ月間である。別の実施形態では、期間は６ヶ月間である。別の実施形態では、期間は９ヶ月間である。別の実施形態では、期間は１年間である。別の実施形態では、期間は１．５年間である。別の実施形態では、期間は２年間である。別の実施形態では、期間は２～７年間である。別の実施形態では、期間は少なくとも７年間である。別の実施形態では、期間は少なくとも１０年間である。
【０３６８】
別の実施形態では、本明細書で開示の方法および組成物の細胞は、凍結保存後の解凍後、９０％を超える生存率を保持する。別の実施形態では、解凍時の生存率は、凍結保存期間後、ほぼ１００％である。別の実施形態では、解凍時の生存率は、ほぼ９０％である。別の実施形態では、解凍時の生存率は、少なくとも９０％である。別の実施形態では、解凍時の生存率は、８０％を超える。
【０３６９】
別の実施形態では、本明細書で開示のセルバンク、凍結ストック、またはワクチン投与バッチは、所定の細胞培養培地中で増殖される。このような培地は当技術分野において既知であり、限定されないが、ダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）（ＡＴＣＣ（登録商標）Ｎｏ．３０－２００２）、イスコフ改変ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ）（ＡＴＣＣ（登録商標）Ｎｏ．３０－２００５）、Ｈｙｂｒｉ－Ｃａｒｅ培地（ＡＴＣＣ（登録商標）Ｎｏ．４６－Ｘ）、マッコイ５ＡおよびＲＰＭＩ－１６４０（ＡＴＣＣ（登録商標）Ｎｏ．３０－２００７）、ハム栄養混合物（ＡＴＣＣ（登録商標）ＣＣＬ－６１（商標））、ＰｏｗｅｒＣＨＯ（商標）既知組成の無血清ＣＨＯ培地（Ｌｏｎｚａカタログ番号１２－７７１Ｑ）、または当該技術分野において既知の任意のその他の培地を含み得る。別の実施形態では、これらの培地は、当業者により経験的に決定されるように、抗生物質または動物血清で補充され得る。
【０３７０】
一実施形態では、大規模の量で哺乳動物細胞の培養を可能とするバイオリアクターおよび方法が本明細書で開示される。さらに、および別の実施形態では、前記バイオリアクターおよび方法は、大規模な量の増殖であっても、最適条件下で、哺乳動物細胞の培養を可能とし、したがって、バイオリアクターの大きさに関係しないプロセス性能および製品品質を可能とする。バイオリアクター内のインキュベーションの継続時間は、規模およびバイオリアクターシステムの変化によってのみ変わってよく、例えば、持続時間は８～９日でよく、または１５～１６日であってもよい。別の実施形態では、バイオリアクター中でのインキュベーション期間は、約７日、約８日、約９日、約１０日、約１１日、約１２日、約１３日、約１４日、約１５日、約１６日、約１７日、約１８日、約１９日、約２０日またはそれ超である。別の実施形態では、灌流バイオリアクターが用いられる場合、インキュベーション期間は最大７～１２０日であってよい。
【０３７１】
別の実施形態では、ｐＨ、溶存酸素圧（ＤＯＴ）および温度などのプロセスパラメーターに関して均一環境下で、バイオリアクター内で良く混合された細胞懸濁液および配合栄養素フィードを維持して、哺乳動物細胞の培養を可能とする大規模バイオリアクターが本

明細書で開示される。別の実施形態では、バイオリアクターは、使い捨て型のバイオリアクターである。

【０３７２】

本明細書に開示される方法は、特許請求の範囲による、真核細胞、特に哺乳動物細胞の培養のための、バイオリアクター、バイオリアクターシステムおよび方法の提供により、根源的な技術的問題を解決する。

【０３７３】

一実施形態では、バイオリアクターは、少なくとも２５０リットル（Ｌ）の容積を有する。別の実施形態では、バイオリアクターは、少なくとも５００Ｌの容積を有する。別の実施形態では、容積は、少なくとも１，０００Ｌ、少なくとも２，０００Ｌ、少なくとも５，０００Ｌ、少なくとも１０，０００Ｌ、少なくとも１２，０００Ｌまたは少なくとも１５，０００Ｌである。

【０３７４】

別の実施形態では、細胞は、容積が次第に増加するバイオリアクター中で継代培養される（実施例参照）。

【０３７５】

当該技術分野において一般に知られているように、本開示の修飾ペプチドおよびタンパク質は、目的の用途に応じて、標識、薬物、標的化薬剤、キャリア、固体支持体などに結合され得る。標識された形態の修飾生物製剤を用いて、それらの代謝的運命を追跡してもよく、この目的の好適な標識としては、特に、放射性同位体標識、例えば、ヨウ素１３１、テクネチウム９９、インジウム１１１などが挙げられる。また、標識を用いて、アッセイ系での修飾タンパク質またはペプチドの検出を媒介してもよく、この場合、酵素標識、蛍光標識、発色標識などと同様に放射性同位体も用い得る。このような標識の使用は、このペプチドまたはタンパク質が、それ自体、抗体またはレセプターリガンドなどの標的化薬剤である場合、特に有益である。

【０３７６】

ほかのものと共に、同様の連結技術を使用して、本開示の修飾ペプチドおよびタンパク質を固体支持体に対して結合してもよい。結合された場合、次に、これらの修飾ペプチドおよびタンパク質を、特定の反応を呈する目的の成分の分離のためのアフィニティ試薬として使用し得る。

【０３７７】

最終的に、本開示の修飾ペプチドおよびタンパク質を用いて、これらの新規の化合物と特異的免疫反応性である抗体を生成し得る。これらの抗体は、非修飾のペプチドまたはタンパク質の生物学的活性の性質に応じて、種々の診断および治療用途に有用である。本開示は、本明細書に記載のＦＶＩＩ、またはＦＶＩＩａと免疫反応性である抗体を提供することを理解されたい。一実施形態では、このような抗体を用いて、内在性の凝固因子から投与されたＣＴＰ修飾凝固因子を識別または特定し得る。別の実施形態では、この抗体を用いて、投与されたＣＴＰ修飾凝固因子の場所を特定してもよい。

【０３７８】

本発明の追加の目的、利点、および新規特徴は、限定を意図するものではない次の実施例を考察することにより、当業者に明らかとなるであろう。さらに、上記本明細書中で詳述されたような、および、下記の特許請求の範囲のセクションにおいて請求されるような本明細書で開示の様々な実施形態および態様のそれぞれに関する実験的裏付けが下記の実施例において明らかになる。

【０３７９】

実施例

【０３８０】

一般に、本明細書で使用される命名法および本発明で使用される検査法には、分子、生化学、微生物学および組み換えＤＮＡ技術が含まれている。これらの技術は文献に詳細に説明されている。例えば、「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　ｌａｂｏｒａｔｏ

ｒｙ Ｍａｎｕａｌ」，Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（１９８９）；「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」，第Ｉ－ＩＩＩ巻、Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｒ．Ｍ．編（１９９４）；Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ（１９８９）；Ｐｅｒｂａｌ，「Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ」，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８８）；Ｗａｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，「Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＤＮＡ」，Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｂｏｏｋｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ｂｉｒｒｅｎ ｅｔ ａｌ．，（編）「Ｇｅｎｏｍｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ Ｓｅｒｉｅｓ」，第１－４巻，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９８）；以下に示された方法論：米国特許第４，６６６，８２８号、第４，６８３，２０２号、第４，８０１，５３１号、第５，１９２，６５９号および第５，２７２，０５７号；「Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｈａｎｄｂｏｏｋ」，第Ｉ－ＩＩＩ巻 Ｃｅｌｌｉｓ，Ｊ．Ｅ．，編．（１９９４）；「Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ － Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ」，Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９９４），第３版；「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ」，第Ｉ－ＩＩＩ巻 Ｃｏｌｉｇａｎ Ｊ．Ｅ．，編（１９９４）；Ｓｔｉｔｅｓ ｅｔ ａｌ．，（編），「Ｂａｓｉｃ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ」（第８版），Ａｐｐｌｅｔｏｎ ＆ Ｌａｎｇｅ，Ｎｏｒｗａｌｋ，ＣＴ（１９９４）；Ｍｉｓｈｅｌｌ ａｎｄ Ｓｈｉｉｇｉ（編），「Ｓｅｌｅｃｔｅｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ」，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８０）」；を参照のこと。利用可能な免疫アッセイは、特許および科学文献に広範に記載されており、例えば、米国特許第３，７９１，９３２号、第３，８３９，１５３号、第３，８５０，７５２号、第３，８５０，５７８号、第３，８５３，９８７号、第３，８６７，５１７号、第３，８７９，２６２号、第３，９０１，６５４号、第３，９３５，０７４号、第３，９８４，５３３号、第３，９９６，３４５号、第４，０３４，０７４号、第４，０９８，８７６号、第４，８７９，２１９号、第５，０１１，７７１号および第５，２８１，５２１号；「Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」，Ｇａｉｔ，Ｍ．Ｊ．，編（１９８４）；「Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ」，Ｈａｍｅｓ，Ｂ．Ｄ．，およびＨｉｇｇｉｎｓ Ｓ．Ｊ．，編（１９８５）；「Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ」，Ｈａｍｅｓ，Ｂ．Ｄ．，およびＨｉｇｇｉｎｓ Ｓ．Ｊ．，編．（１９８４）；「Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ」，Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，Ｒ．Ｉ．，編（１９８６）；「Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ Ｃｅｌｌｓ ａｎｄ Ｅｎｚｙｍｅｓ」，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，（１９８６）；「Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ」，Ｐｅｒｂａｌ，Ｂ．，（１９８４）および「Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１－３１７，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；「ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ａ Ｇｕｉｄｅ Ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ（１９９０）；Ｍａｒｓｈａｋ ｅｔ ａｌ．，「Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｃｏｕｒｓｅ Ｍａｎｕａｌ」，ＣＳＨＬ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）」を参照のこと；これらの全てが、参照により組み込まれる。その他の一般的な文献は、本明細書全体を通して提供される。

【０３８１】

実施例１

ＦＶＩＩＩ欠乏症の血友病性マウスにおけるＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$の実現可能性試験

【０３８２】

ＦＶＩＩ－ＣＴＰ、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_2$およびＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$ハーベストのＰＫプ

ロファイル試験および凝固活性を、市販のＦＶＩＩと比較する試験を実施した。ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$は、ＦＶＩＩ－ＣＴＰおよびＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_2$のハーベストまたはｒｈＦＶＩＩに対してその凝固活性を維持しつつ、改善されたＰＫプロファイルを示した。ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$のインビトロおよびインビボ特性をさらに特徴付けるため、同タンパク質を発現し分泌する安定なミニプールを作製し、精製および活性化プロセスを開発した。

【０３８３】

本試験では、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$の薬物動態学的特性および薬力学的特性を、ＦＶＩＩ欠損マウスで試験した。このタンパク質のＰＫプロファイルを評価した。ＦＶＩＩａの比活性ベースのＰＫプロファイルを明らかにし、市販品のＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）と比較した。さらに、尾静脈切断後にＦＶＩＩＩ欠乏マウスの凝固を誘導するＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$の持続性インビボ止血能を試験した（生存試験）。

【０３８４】

試験目的：

【０３８５】

ＦＶＩＩＩ欠乏マウスに、同等の活性用量のＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$と市販のｒｈＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標））を単回ＩＶ投与した後、薬物動態パラメーターおよび薬力学パラメーターを両物質で比較して評価すること。

【０３８６】

同等の活性用量のＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$およびＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）を単回ＩＶ投与した後、尾静脈切断による負荷を与えることにより（生存試験）、ＦＶＩＩＩ欠乏マウスの恒常性を維持するＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$のインビボ能力を決定すること。

【０３８７】

ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$ハーベストの生成：

【０３８８】

ｐＣＩ－ＤＨＦＲベクターを用いてＤｇ４４細胞でＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$を社内で発現させた（図１）。安定に遺伝子導入させたプール＃７１を振盪フラスコ中、２５ｎｇ／Ｌのビタミン Ｋ３（Ｓｉｇｍａ社）の存在下で増殖させた。細胞懸濁物を培養し、生存率が６０～８０％に低下した後にハーベストした。このハーベストを濾過し、－７０℃で凍結した。

【０３８９】

ハーベストのＦＶＩＩ抗原レベルの決定：

【０３９０】

ヒトＦＶＩＩ　ＥＬＩＳＡキット（Ｚｙｍｏｔｅｓｔ　ＨｙＰｈｅｎ）を用いてＦＶＩＩ抗原レベルを決定した（表１）。プールしたハーベストバッチ毎に抗原レベルを算出した。

【０３９１】

【表１】

ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$の抗原レベル

ＦＶＩＩの抗原レベル			
	ＰＫ－ＰＤ試験		生存試験
	ハーベスト３１Ａ	ハーベスト３１Ｂ	ハーベスト３８
Ａｖ（μｇ／ｍｌ）	１６．０	１５．９	１６．６
ＳＴＤ	１．５	０．０	０．８
％ＣＶ	９．１	０．１	４．９

【０３９２】

ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$の精製プロセス（図２Ａ～２Ｂ）

【０３９３】

プロセスの概要

【０３９４】

短時間の精製試験の後、２つのカラムを用いた以下の精製プロセスを実施した。ＶＩＩ－Ｓｅｌｅｃｔアフィニティカラム（ＧＥ）およびセラミックハイドロキシアパタイト１型（ＨＡ）、４０μｍ（Ｂｉｏ　Ｒａｄ）を用いて、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$　γ－カルボキシル化濃縮タンパク質を精製した。精製ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$をＣａＣｌ$_2$の存在下、２～８℃で一晩インキュベートすることにより自己活性化を誘導した。精製プロセスは開発の最終段階にあり、最適化されつつあることから、精製段階のほとんどがほぼ同じものであるが、その一部については、２つのバッチで同一のものではない。

【０３９５】

１０ｋＤａ中空繊維またはＰｅｌｌｉｃｏｎカセットを用いた限外濾過／透析濾過（ＵＦＤＦ）

【０３９６】

清澄化したハーベストを、４℃で週末を通して解凍した（２～３日）。

【０３９７】

バッチ３１では、分画分子量が１０ＫＤａの中空繊維カートリッジ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社、カタログ番号ＵＦＰ－１０－Ｃ－４Ｘ２ＭＡ）を用いて、清澄化ハーベスト（１２リットル）を（連続２回の実施で）４倍に濃縮した。濃縮ハーベストを１～２体積のＴＢＳ（５０ｍＭトリス、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）に対し透析濾過した。

【０３９８】

バッチ３８では、分画分子量が１０ＫＤａのＰｅｌｌｉｃｏｎ　２（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）カセットを用いて、清澄化ハーベスト（８．５リットル）を４倍に濃縮した。濃縮ハーベストを直接ＶＩＩ－Ｓｅｌｅｃｔカラムにロードした。

【０３９９】

両方の限外濾過を、氷冷緩衝液を用いて氷上で実施した。ＵＦＤＦ試料を０．２２μｍで濾過した後、ロードした。

【０４００】

ＦＶＩＩ－Ｓｅｌｅｃｔカラムでの捕捉

【０４０１】

ＴＢＳ（ｐＨ７．４）で予め平衡化したＶＩＩ－Ｓｅｌｅｃｔカラム（ＸＫ１６／２０、ＣＶ　１８ｍｌ）にＵＦＤＦまたは濃縮ハーベストをロードした。カラムを５０ｍＭトリス－ＨＣｌ、０．５Ｍ　ＮａＣｌ　ｐＨ７．５で洗浄し、５０ｍＭトリス－ＨＣｌ、１Ｍ　ＮａＣｌ　５０％（ｖ／ｖ）、プロピレングリコール　ｐＨ７．５でＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$を溶出した。このプロセスを２つの連続するサイクルで同じカラムを用いて実施した。

【０４０２】

セラミックヒドロキシアパタイトカラムでのγ－カルボキシル化ベース分離

【０４０３】

溶出産物を１０ｍＭのリン酸ナトリウム　ｐＨ６．８で１：１０に希釈し、セラミックヒドロキシアパタイトカラム（ＸＫ１６／２０、ＣＶ　２４ｍｌ）にロードした。カラムを５９ｍＭのリン酸ナトリウム　ｐＨ６．８で洗浄し、第ＶＩＩ因子のγ－カルボキシル化濃縮画分を５００ｍＭのリン酸ナトリウム　ｐＨ６．８で溶出した。この本プロセスを２つの連続するサイクルで同じカラムにて実施した。各バッチで２つのサイクルの溶出物をプールし、１．７～２ｍｇ／ｍｌに濃縮し、２０ｍＭトリス－ＨＣｌ、１００ｍＭ　ＮａＣｌ　ｐＨ８．２による透析濾過を実施して体積を減らし、活性化ステップ用の材料を調製した。

【０４０４】

ＦＶＩＩ活性化

【０４０５】

精製ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$を１ｍｇ／ｍｌに希釈し、２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ、１００ｍＭ　ＮａＣｌおよび１ｍＭ　ＣａＣｌ$_2$　ｐＨ８．２中、２～８℃で２４時間インキュベートした。予備処方緩衝液（２０ｍＭのクエン酸緩衝液、２４０ｍＭ　ＮａＣｌ、１３．３ｍＭ　グリシン、ｐＨ６．９）への緩衝液交換（ＵＦＤＦ）によって、活性化を停止さ

せた。
【０４０６】
ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$およびＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$の分析特性：
【０４０７】
ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロット
【０４０８】
Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｐｌｕｓ Ｄｕａｌ Ｃｏｌｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｍａｒｋｅｒ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いて１２％トリス－グリシンゲルに精製ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$およびＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$をロードした。クマシーブリリアントブルー試薬でゲルを染色することによりＳＤＳ－ＰＡＧＥクマシー解析を実施した（１レーン当たりのタンパク質５μｇまたは１０μｇ）。抗ヒトＦＶＩＩポリクローナルＡｂ（Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ、ＡＦ２３３８）、抗ヒトγ－カルボキシル化モノクローナル抗体（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、カタログ番号４９９、３５７０）および抗ＣＴＰポリクローナルＡｂを用いてウエスタンブロット解析を実施した（１レーン当たりのタンパク質１μｇ）。還元条件下では、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$は、７５ＫＤａに移動し、およびＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$は、それぞれ図３Ａ～３Ｈでバンド２および３として示される、２つの主なバンド、５０ｋＤａの重鎖および２５ｋＤａの軽鎖、として移動した。
【０４０９】
この精製手順は、不純物を減少しながら、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$部分を顕著に濃縮した。この精製プロセスの収率は２５～３０％ＦＶＩＩであった（ＥＬＩＳＡによる）。精製過程で喪失したタンパク質のほとんどは、ＦＶＩＩの発色活性が低いか、活性を全く示さないものであった。クマシー染色ＳＤＳ－ＰＡＧＥに基づけば、還元ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$には、予測されたバンドよりも多くのものが含まれている。約７５ｋＤａ付近まで移動したバンドは非活性化ＦＶＩＩを表す（図３Ａ～３Ｈ、バンド１）。このバンドはＭＷがわずかに異なる２つのバンドからなり、このＭＷの差はγ－カルボキシル化含有量の差を反映しているものと思われる。ＭＷが２０ｋＤａより小さいさらなるバンドが観察された。これは重鎖の分解産物であることが既に報告された。
【０４１０】
ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$の発色活性：
【０４１１】
市販の発色活性試験キットであるＢＩＯＰＨＥＮ（Ｈｙｐｈｅｎ ＢｉｏＭｅｄ ２２１３０４）を用いて、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$ハーベスト、プロセス中の画分および精製ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$の、ヒト正常プール血漿に対するインビトロ効力の比較評価を実施した。ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$ハーベストおよびタンパク質を系列希釈し、用量反応曲線を正常ヒト血漿の基準調製物に対し比較することにより、その効力を評価した。ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$精製後、発色活性は大幅に改善され、非活性画分は主にＨＡカラムにより分離された（図４）。ＦＶＩＩ発色活性と、モノクローナル抗Ｇｌａ抗体を用いたウエスタンブロットでのＦＶＩＩ検出との間には強い相関が認められた。ハーベストのＥＣ５０により反映されるＦＶＩＩ発色活性の効力は、カルボキシル化ＦＶＩＩ画分および非カルボキシル化ＦＶＩＩ画分の両方の影響を受ける。ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$のγ－カルボキシル化画分の精製および濃縮後、活性は改善され、ＦＶＩＩ活性に対するγ－カルボキシル化の重要な寄与を示している（図４）。このパラメーターはＦＶＩＩの適切なインビボ活性に極めて重要であり、クローン開発プログラムでさらに取り組むことになる。
【０４１２】
Ａ２８０によるタンパク質測定
【０４１３】
ＰｒｏｔＰａｒａｍアルゴリズム（ｈｔｔｐ：／／ｗｅｂ．ｅｘｐａｓｙ．ｏｒｇ／ｐｒｏｔｐａｒａｍ）を用いてＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$およびＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）の理論的吸光係数を算出した。この計算はアミノ酸配列に基づくものである。算出されたＦＶＩＩ－ＣＴＰ３およびＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）の吸光係数は、それぞれ１

．１８６および１．４０６である。これら値は２８０ｎｍでの１ｇ／Ｌの吸光度を表す。

【０４１４】

２つのタンパク質の間の吸光係数の相違は、ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）と比較したＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$の分子量の増大のみに由来する。この理由は、ＣＴＰは、芳香族残基およびシステイン残基を欠き、従って、吸光度に寄与しないからである。

【０４１５】

最終ＦＶＩＩ、およびＶＩＩ－Ｓｅｌｅｃｔカラムの溶出から開始するプロセス内の精製試料に対し、Ａ２８０によるタンパク質測定を用いる。

【０４１６】

ＦＶＩＩａ抗原レベルの決定

【０４１７】

ヒトＦＶＩＩａ　ＥＬＩＳＡキット（ＩＭＵＢＩＮＤ、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃａ）を用いてＦＶＩＩａ抗原レベルを決定した。各々のバッチについて抗原レベルを計算した。ただし、この手段は活性産物の量を示すものではなかったため、注入用量の決定に有用なものではなかった。

【０４１８】

ＦＶＩＩａ－Ｓｔａｃｌｏｔ（登録商標）ＶＩＩａ－ｒＴＦの凝固アッセイ

【０４１９】

ＦＶＩＩａは一本鎖ＦＶＩＩの鎖内切断により得られる。天然の組織因子（ＴＦ）はＦＶＩＩａの補因子である。ＦＶＩＩは、ＴＦと結合すると、第Ｘ因子から第Ｘａ因子への活性化を仲介し、それ自体はＦＶＩＩａに変換される。可溶性組織因子は天然の組織因子の細胞外部分である。この因子は、もはや自己活性化によるＦＶＩＩの活性化ができないが、組織因子と結合したＦＶＩＩａはＦＸをＦＸａに活性化できる。

【０４２０】

このアッセイに用いる組換え可溶性組織因子（ｒｓＴＦ）は、ＦＶＩＩａの特異性を利用してＦＶＩＩａ凝固試験を構成するものである。ｒｓＴＦは、ＦＶＩＩａ、カルシウムおよびリン脂質の存在下では、ＦＶＩＩをＦＶＩＩａに活性化することなく血漿の凝固を引き起こす。

【０４２１】

このシステムで観察される凝固時間は被験試料中のＦＶＩＩａ含有量と逆相関があり、試料中にＦＶＩＩが存在することによる干渉を受けない。

【０４２２】

Ｏｍｒｉ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｎｅｓ－Ｚｉｏｎａ、イスラエル）でアッセイを実施した。各試験の前に、再構成後のＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）およびＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$の両方についてＦＶＩＩａ活性を評価した。ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）の活性にはバイアルで報告された予測活性との相関は認められなかったが、この不一致は活性評価手法の違いに起因するものと思われる。タンパク質濃度を考慮しない体積当たりのＦＶＩＩａ凝固活性を表３９にまとめる。

【０４２３】

【表２】

バッチ産物のＦＶＩＩａの凝固活性

	ＰＫ試験		生存試験	
	FVIIa-3*CTP (FVIIa 31)	NovoSeven（登録商標）	FVIIa-3*CTP (FVIIa 38)	NovoSeven（登録商標）
活性（Ｕ／ｍｌ）	1.3E+06	2.5E+05	1.3E+06	7.4E+05

【０４２４】

ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$の比活性

【０４２５】
Ａ２８０に基づきＦＶＩＩａの比活性を算出し（活性／ｍｌをタンパク質濃度で除して算出する）、これを表３に示す。ＭＷが異なる２つの分子の比活性を比較する際には、活性を正規化するために補正を実施しなければならない（すなわち、分子量の差により、ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）１ｍｇ中の活性部位の数はＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$の１．１８５倍である）。換算係数の計算は以下の式で表される：

【０４２６】
【数１】

$$\text{Normalized_SA} = \frac{\text{SA(FVIa-CTP}_3\text{)}}{\text{MW.(FVII CTP}_3\text{)}} \times \text{MW(Native_FVII)} =$$

$$= \frac{\text{SA(FVIIa CTP}_3\text{)}}{53419.5\text{Da}} \times 45079.1\text{Da} = \text{SA(FVIIa-CTP}_3\text{)} * 1.185$$

【０４２７】
【表３】
ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）と比較したＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$の比活性

試料	平均A280	STDV(n=9)	%CV	吸光係数	タンパク質濃度(mg/mL)	U/ml	比活性		NovoSeven(登録商標)からの低下倍数
							U/mgタンパク質	U/mg FVIIa	
NovoSeven(登録商標)	1.274	0.031	2.398	1.406	0.906	8.36E+05	9.23E+05	9.23E+05	1.0
FVIIa-CTP$_3$	4.396	0.092	2.094	1.186	3.706	7.23E+05	1.95E+05	2.31E+05	4.0

【０４２８】
ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$のＰＫ－ＰＤ試験：

【０４２９】
試験の概要

【０４３０】
用量６．４Ｅ６　Ｕ／ｋｇ体重（１６０，０００Ｕ／動物）のＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$およびｒｈＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）、ＮＳ）をＣ５７Ｂ　ＦＶＩＩＩ欠損マウスに単回静脈内注射で投与した。投与から０．１６６時間後、０．５時間後、２時間後、４時間後、８時間後、１２時間後、２４時間後、３４時間後、４８時間後、５８時間後および７２時間後、交互に４匹のマウスの後眼窩から血液試料を採取した（表４）。クエン酸処理血漿（０．３２％）をサンプリング直後に調製して、－２０℃で分析時まで保存した。ＦＶＩＩａの凝固活性レベルを評価し、詳細なＰＫ解析を実施した。試験はＯｍｒｉ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｎｅｓ－Ｚｉｏｎａ、イスラエル）で実施した。

【０４３１】

【表４】

試験の概要

治療群	試験品	動物数／群／時点	投与経路	単位の量／動物	注入量（μｌ）	時点（投与後の時間）
A	rhFVIIa	4	ＩＶ	1.6e5	200	0（投与前），0.166，0.5，2，4，8，12，24，34，48，58，72
B	FVIIa-CTP_3	4	ＩＶ	1.6e5	200	0（投与前），0.166，0.5，2，4，8，12，24，34，48，58，72

【０４３２】

ＦＶＩＩＩ欠損マウスにおけるＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$のＰＫプロファイル

【０４３３】

Ｓｔａｃｌｏｔ（登録商標）ＶＩＩａ－ｒＴＦキット（Ｓｔａｇｏ、Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ，ＮＪ）を用いて血液試料中のＦＶＩＩａ活性を定量化した。各タンパク質の薬物動態プロファイルを算出し、各時点の４匹の前記の平均値を示す。図５に実験全体を通したＦＶＩＩａのＰＫプロファイルを示す。ＦＶＩＩａの回収率を表６に示す。ＰＫパラメーターのまとめを表７に示す。

【０４３４】

ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）またはＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$のいずれかを投与した後の凝固活性値を表５にまとめている。ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$およびＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）は、投与から０．５時間後に活性が最大値に達した。ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）の最大活性値はＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$の最大活性値の４３％に達するにとどまった。ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$凝固活性は、長期間維持され、これは、活性が延長されたことを示している。ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）治療マウスの凝固活性は、１２時間より後の時点では検出不能であったが、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$治療マウスは、投与後４８時間でも測定可能な活性を保持し続けていた（表５および図５）。

【０４３５】

ＦＶＩＩａに直列にＣＴＰコピーを３個付加することにより、投与後の最大活性の測定およびインビトロ解析に基づく予測活性との比較で、ＦＶＩＩａの回収率の１００％の増大がみられた（表６）ほか、半減期および平均滞留時間（ＭＲＴ）が５倍になった。曝露時間（ＡＵＣ）は３倍に増加した（表７）。

【０４３６】

【表５】

単回ＩＶ注入後のＦＶＩＩａの凝固活性

投与後の時間（時間）	FVIIa凝固活性(U/ml)	
	FVIIa-CTP$_3$	NovoSeven(登録商標)
0.16	6.8E+07	3.2E+07
0.5	9.7E+07	4.3E+07
2	2.1E+07	3.9E+06
4	7.7E+06	7.3E+05
8	2.7E+06	4.2E+04
12	3.7E+05	6.2E+03
24	2.4E+04	BLQ
34	4.6E+03	BLQ
48	1.5E+03	BLQ

【０４３７】

【表６】

ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$回収

治療群	試験品	単位の量/動物	実際の投与された用量(U/ml)	*予測Cmax(U/ml血液)	Cmax(U/ml)	%回復
A	rFVIIa	1.60E+05	1.20E+06	1.40E+05	4.25E+04	30
B	FVIIa-CTP$_3$	1.60E+05	1.29E+06	1.50E+05	9.74E+04	64.6

＊予測Ｃｍａｘは、投与した用量を血液体積で除算して得られる。

【０４３８】

【表７】

ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３とＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）のＰＫパラメーター比較

PKパラメーター	NovoSeven(登録商標)	FVIIa-CTP$_3$
半減期-$_\alpha$(0.5-12時間)	0.94	1.57
半減期-$_\beta$(12-48時間)	NA	4.62
AUC(mU*hr/ml)	5.80E+07	1.80E+08
Vd/Kg(ml/Kg)	1408	2375
CL/Kg(ml/hr/Kg)	1034	356
MRT(時間)	1.3	6.7

【０４３９】

トロンビン生成アッセイ（ＴＧＡ）

【０４４０】

トロンビンの生成は凝固カスケードの基礎となる部分であり、したがって、特定の個体がいかにうまくトロンビンを生成し得るかは、出血または血栓症のリスクと相関があると思われる。トロンビン生成を分析する際に一般的に測定する変数としては、遅延時間、トロンビン生成がピーク値に達するまでの時間、ピーク値、内因性トロンビン産生能［ＥＴＰ］（すなわち、曲線下面積およびテール）、トロンボグラム（「ＴＧ」）の経時変化が挙げられる。遅延時間の後、トロンビンのバーストがみられる。しかし、トロンビン全体の９５％超が未形成である場合、遅延時間終了時に凝固が起こる。Ｏｍｒｉ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社にて、ヒト血友病血漿を補充したＴｈｒｏｍｂｉｎｏｓｃｏｐｅ試薬を用いてトロンビン生成アッセイを実施した。ＴＧＡは、ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）

およびＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$の注入に起因するマウス血漿での凝固能を反映する。ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$またはＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）のいずれかを投与した後のマウス血漿のＴＧＡパラメーター値を図６Ａ～６Ｃに示す。ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$投与後、３つ全てのパラメーター（トロンビン生成速度、生成されたトロンビンおよびＫＩＩａの最大量）によって、ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）治療を上回るＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$の利点が示される。これによって、さらに、ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）と比較して、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$の潜在的な長時間作用型の優位性という考えが強化される。

【０４４１】

ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$の尾静脈切断（ＴＶＴ）試験：

【０４４２】

試験の概要

【０４４３】

ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$に関するＰＫ／ＰＤ試験から得られたデータによって、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３の機能への洞察が得られ、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$は、ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）と比較した場合、薬物動態学的利点を有することが示された。しかし、このタンパク質が外傷事象後にインビボで血餅を誘導する能力は未だ実証されていない。ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３の止血能を評価するため、出血負荷に同じＦＶＩＩＩ欠損マウスモデルを用いた。

【０４４４】

ＦＶＩＩＩ欠損マウスにＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$またはＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）の単回静脈内注入を実施した。ＦＶＩＩａ血餅活性アッセイで評価した各薬物の効力から算出した等価ＦＶＩＩａ活性を与える量（１．６Ｅ０５単位、２００μｌ）の薬物をマウスに投与した（表８）。投与量は、ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）が９ｍｇ／ｋｇ、ＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$が活性の低下により４０ｍｇ／ｋｇであった。対照群にはビークル２００μｌを注入した。

【０４４５】

投与から１５分後（注入１）、２４時間後（注入２）または４８時間後（注入３）、尾静脈を尾端から２．７ｃｍ横切開し、マウスの生存を２４時間にわたって記録した。

【０４４６】

【表８】

注入試料の評価

	NovoSeven（登録商標）			FVIIa-CTP$_3$			
注入番号	タンパク質濃度(mg/mL)	活性(U/ml)	比活性(U/mg)	タンパク質濃度(mg/mL)	活性(U/ml)	比活性(U/mg)	比活性（正規化）
1	0.91	8.0E+05	8.8E+05	3.63	6.6E+05	1.8E+05	2.2E+05
2	0.92	8.3E+05	9.0E+05	3.81	7.8E+05	2.0E+05	2.4E+05
3	0.89	8.8E+05	9.9E+05	3.68	7.3E+05	2.0E+05	2.3E+05

【０４４７】

Ａ２８０によりタンパク質濃度を測定した。

【０４４８】

結果

【０４４９】

ビークル注入対照群の３回の注入データ（５匹の動物ｘ注入３回）をまとめて、図７Ａ～７Ｄに示す。尾静脈切断から２４時間後の生存率は３０％であった。

【０４５０】

ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）治療マウスおよびＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$治療マウスは、ＦＶＩＩａ投与から１５分後に尾静脈切断を実施した後も正常な止血活性を示した。ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$治療動物およびＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）治療動物の生存率は１００％であった（図７Ａ～７Ｄ）。

【０４５１】

ＰＫ／ＰＤ試験で示されたＦＶＩＩ－ＣＴＰ$_3$のクリアランス速度の低下は、投与から２４時間後に実施した尾静脈切断の後に最も明白にわかる。ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）では生存率の低下が観察された。対照群と同様に、１０時間以内に５０％が死亡した。それまでの間、９０％のＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$治療マウスが生存した（図７Ａ～７Ｄ）。この結果から、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$治療による長時間作用型の有効性が強調される。

【０４５２】

投与から４８時間後、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$またはＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）で治療したグループに生存率の低下がみられた（図７Ｃ）。ＦＶＩＩａ－ＣＴＰマウスにわずかな改善がみられたが、その差は統計的有意性に達するものではなかった。

【０４５３】

考察：

【０４５４】

組換えタンパク質へのＣＴＰ融合により、同等の活性が維持されたままタンパク質の循環半減期が延長される。閾値サイズの７０ＫＤａを超えるタンパク質のクリアランス低下の背後にある機序は、腎クリアランスに関して十分に理解されているが、ＣＴＰ融合によって、さらなるお墨付きが得られる。ＣＴＰ融合は、タンパク質遮蔽物を迂回してタンパク質分解による切断からタンパク質を保護し、高い負電荷によって、タンパク質の放射状分子量を増大させ、肝クリアランス受容体に対するタンパク質の親和性を低下させるものと考えられる。

【０４５５】

本試験は、ＦＶＩＩへのＣＴＰ融合がタンパク質の半減期およびクリアランスに及ぼす影響を具体的に理解すること、およびこの修飾を施した後のＦＶＩＩの比活性の実例に取り組むことを目的としたものである。ＦＶＩＩＩ欠損マウスにＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$または市販の組換えＦＶＩＩａ（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標））を同等の用量（単位ベース）で単回ＩＶ注入により投与し、ＰＫ活性ベースの解析を実施した。ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$は、それぞれ、その半減期およびＡＵＣの５倍および３．５倍の増大で反映されるとおり、優れた寿命を示した。Ｓｔａｃｌｏｔ（登録商標）活性キットにより算出したＦＶＩＩａ－ＣＴＰの比活性（Ｕ／ｍｇ）をＡ２８０により測定したタンパク質濃度で除した商は、ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）の比活性の５分の１～４分の１未満であることがわかった。

【０４５６】

ＣＴＰがインビボでＦＶＩＩａの止血効果にどのように影響するかに関する理解を深めるため、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$が出血を減らす能力について調査した。血友病マウスモデルを用いた尾静脈切断出血モデルでは、ｒＦＶＩＩａ投与によって、負荷動物の生存率を改善し、失血死を回避できる。本明細書に記載される試験では、動物にＦＶＩＩａ－ＣＴＰ３またはＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）を投与した。両分子とも、投与から０．２５時間後に切断を実施した場合、恒常性を維持することができた。投与から２４時間後に切断を実施した場合、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$治療群において活性持続時間の有意な延長が示された。ビークル治療群の生存率は、予想よりも高く、かつ以前の試験で得られたよりも高い（今回の試験の５０％に対し、前回の試験では２０％、データ示さず）。治療動物のパーセント生存率については、今後、投与から３６時間後を含めたさらに早い時点で評価する。

【０４５７】
結論として、ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ$_3$はＮｏｖｏＳｅｖｅｎ（登録商標）と比較して、血友病マウスにおける活性持続時間が長い、換言すれば、止血効果の持続時間が長いことが示された。データを考え合わせると、ＦＶＩＩへのＣＴＰの融合は、血友病患者の予防的処置を大幅に改善する可能性を秘めた技術であることが示唆される。
【０４５８】
実施例２
市販の組換えｈＦＶＩＩａと比較したＭＯＤ－５０１４の生化学的特性－カルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）が第ＶＩＩａ因子の活性に及ぼす効果
【０４５９】
計画の理論的根拠およびまとめ
【０４６０】
これらの試験は、ＭＯＤ－５０１４の生化学的特性を本明細書でＭＯＤ－５０００と称する市販の組換えｈＦＶＩＩａと比較して評価するようデザインしたものである。
【０４６１】
実施する試験：
・ＭＯＤ－５０１４の合成基質切断
・合成基質切断により測定されるＭＯＤ－５０１４の組織因子（ＴＦ）結合
・第Ｘ因子（ＦＸ）活性化により測定されるＭＯＤ－５０１４のＴＦ結合
・ＴＦ結合ＭＯＤ－５０１４によるＦＸ活性化の動力学
・ＦＸ活性化により測定されるＭＯＤ－５０１４の脂質結合
・脂質結合ＭＯＤ－５０１４による因子活性化の動力学
・アンチトロンビン（ＡＴ）によるＭＯＤ－５０１４の不活化
・ＴＦＰＩによるＭＯＤ－５０１４の不活化
【０４６２】
データ全体から、ＭＯＤ－５０００と比較したとき、ＭＯＤ－５０１４は作用機序がほぼ同じであり、触媒活性がわずかに低いことが示唆される。これらの結果から、ＴＦ結合ＭＯＤ－５０１４の活性はわずかに低下しており、ＴＦから独立していると、さらにいくぶん低下することがわかった。
【０４６３】
これらの影響は、反応の大きさよりはむしろ反応速度が主として反映されたものであり、経時変化全体を測定できる反応は確かに終了まで進行する。
【０４６４】
ＡＴ阻害速度のわずかな低下は、ＭＯＤ－５０１４のインビボ半減期が長くなり、適切な阻害応答が起こることを示唆している。
【０４６５】
実験材料
・ＭＯＤ－５０１４　ＧＭＰ－１：２．５ｍｇ／ｍｌ（Ａ２８０に基づいて）
・ＮｏｖｏＳｅｖｅｎロット番号ＣＵ６０４３０：０．９４３ｍｇ／ｍｌ（Ａ２８０に基づいて）、ＭＯＤ－５０００と呼ぶ。
【０４６６】
ＭＯＤ－５０１４の合成基質切断
【０４６７】
論理的根拠：合成基質の切断は、もっぱら機能的活性部位が利用可能性に依存しているはずである。
【０４６８】
方法：ＭＯＤ－５０００およびＭＯＤ－５０１４をモル基準で同じ濃度に希釈した。次いで、同じ濃度を固定濃度の基質Ｐｅｆａｃｈｒｏｍｅ　ＦＶＩＩａ（メチルスルホニル－Ｄ－シクロヘキシルアラニル－２－アミノブチリル－アルギニン－ｐ－ニトロアニリド）に加え、黄色の出現によって、基質の切断をモニターした。

【０４６９】
結果
【０４７０】
濃度：ＦＶＩＩａ　３６０ｎＭ；基質　５００μＭ
【０４７１】
分析：既知の吸光係数を用いて、４０５ｎｍでの吸光度をｐ－ニトロアニリンの濃度に変換した。ｐ－ニトロアニリンの濃度を時間に対してプロットし、基質切断速度を決定した。
【０４７２】
データを下記の数式に当てはめた。
【０４７３】
【数２】

$$rate = k_1[VIIa]$$

【０４７４】
k_1＝２７．５モル　ｐＮＡ／分／モルＶＩＩａ
【０４７５】
結論：モル濃度基準では、ＭＯＤ－５０００とＭＯＤ－５０１４は基質切断速度が同じである（図８）。その後の試験では、基質切断の測定値を希釈およびピペット操作の対照として用いる。
【０４７６】
合成基質切断により測定されるＭＯＤ－５０１４のＴｆ結合
【０４７７】
論理的根拠：第ＶＩＩａ因子がＴＦと結合すると、第ＶＩＩａ因子の立体構造変化が起こり、それにより基質切断速度が増大する。このことは、基質切断の増大を用いて第ＶＩＩａ因子とＴＦとの結合をモニターすることが可能であることを意味する。
【０４７８】
方法：様々な濃度のＭＯＤ－５０００およびＭＯＤ－５０１４を固定濃度のＴＦに加え、５分間インキュベートした。基質（Ｐｅｆａｃｈｒｏｍｅ　ＦＶＩＩａ）を加えた。４０５ｎｍでの基質の切断を黄色の出現によりモニターした。
【０４７９】
結果：
【０４８０】
濃度：ＦＶＩＩａ　０～２５ｎＭ、ＴＦ　８．７ｎＭ；基質５００μＭ
【０４８１】
分析：ＴＦの濃度が予測Ｋｄを十分に上回っているとき、全てのＦＶＩＩａが低濃度でＴＦと結合するはずである。基質切断速度はＶＩＩａ／ＴＦ複合体の基質切断速度となる。ＦＶＩＩａの濃度がＴＦの濃度を上回ると、基質切断速度は遊離ＦＶＩＩａの基質切断速度まで低下するはずである。ＦＶＩＩａとＴＦはモル比１：１の複合体を形成することから、基質切断速度の変化が起こるときのＦＶＩＩａの濃度がＦＶＩＩａの推定濃度の判断材料となる。
【０４８２】
データを下記の数式に当てはめた。
【０４８３】
【数３】

$$rate = k_1[VIIa] + k_2[VIIa/TF]$$

【０４８４】

MOD－５０００　MOD－５０１４
k_1　２７．５　２７．５モル　ｐＮＡ／分／モルＶＩＩａ
k_1　３６５　３５７５モル　ｐＮＡ／分／モルＶＩＩａ／ＴＦ

【０４８５】

結論：ＭＯＤ－５０００（ＮｏｖｏＳｅｖｅｎ）とＭＯＤ－５０１４は予測されたＴＦ濃度（８．７ｎＭ）で同じ変曲点を示している（図９）。このことは、基質切断により予測されるＭＯＤ－５０００およびＭＯＤ－５０１４のモル濃度が正しいことを裏付けるものである。ＭＯＤ－５０１４は、ＴＦと結合したとき、ＭＯＤ－５０００よりも基質切断速度が極わずかに低かった（９８％）（図９）。

【０４８６】

第Ｘ因子活性化により測定されるＭＯＤ－５０１４のＴｆ結合

【０４８７】

論理的根拠：ＦＶＩＩａによるＦＸの切断は、ＦＶＩＩａ／ＴＦ複合体による切断に比べて速度が遅い。したがって、ＦＸ活性化の速度を測定することによりＦＶＩＩａとＴＦとの結合を評価できる。

【０４８８】

方法：様々な濃度のＭＯＤ－５０００およびＭＯＤ－５０１４を固定濃度のＴＦに加え、ＦＸ活性化の速度を測定した。合成基質Ｐｅｆａｃｈｒｏｍｅ　ＦＸａ（メトキシカルボニル－Ｄ－シクロヘキシルアラニル－グリシル－アルギニンパラニトロアニリド）の切断により第Ｘ因子活性化を評価した。検量線により合成基質の切断をＦＸａ濃度に変換する。ＦＶＩＩａもＦＶＩＩａ／ＴＦもかなりの速度でＦＸ基質を切断することはない。

【０４８９】

結果

【０４９０】

濃度：ＦＶＩＩａ　０～２ｎＭ；ＴＦ　１０ｐＭ；ＦＸ　１３５ｎＭ；基質５００μＭ

【０４９１】

血漿中の第Ｘ因子の濃度は８μｇ／ｍＬ（約１３５ｎＭ）である。

【０４９２】

分析：ＦＸ活性化の速度は、ＦＶＩＩａがＴＦと結合するのに伴い増大するはずである。ＴＦがすべてＦＶＩＩａで飽和されると、ＦＸ活性化の速度が最大値に達する（図１０）。

【０４９３】

データを下記の数式に当てはめた。

【０４９４】

【数４】

$$v = V_{max}\frac{[VIIa]^n+[TF]+K_d^n-\sqrt{([VIIa]^n+[TF]+K_d^n)^2-4[VIIa]^n[TF]}}{2[TF]}$$

【０４９５】

MOD－５０００　MOD－５０１４
V_{max}　１．４０　１．３０　ｎＭ　ＦＸａ／分
K_d　３．３　３．０　ｐＭ
ヒル値　０．９３　０．９１

【０４９６】

結論：ＦＶＩＩａのＴＦに対する結合で、極わずかな負の協同性（ヒル値＜１）が存在する。これは、ＭＯＤ－５０００とＭＯＤ－５０１４で同じである。ＴＦと結合すると、ＭＯＤ－５０１４のＦＸ活性化の速度はＭＯＤ－５０００に比べてわずかに低下する（９３％）。ＭＯＤ－５０１４のＴＦに対する親和性はＭＯＤ－５０００のものと同程度であ

る（図１０）。
【０４９７】
ＦＸ濃度の関数としてのＦＸ活性化の速度
【０４９８】
論理的根拠：ＴＦと結合するとＭＯＤ－５０１４の活性化速度がわずかに低下するのは、ＦＸａに対する親和性が低下するか、ＦＸが複合体と結合したときにその回転率が低下する結果であると考えられる。ＦＸ活性化の速度をＦＸ濃度の関数として測定することにより、複合体の動力学的パラメーターを確立した。
【０４９９】
方法：様々な濃度のＦＸを固定濃度のＦＶＩＩａ／ＴＦ複合体とインキュベートした。
【０５００】
合成基質（Ｐｅｆａｃｈｒｏｍｅ　ＦＸａ）の切断により第Ｘ因子活性化を評価した。検量線により合成基質の切断をＦＸａ濃度に変換した。
【０５０１】
結果
【０５０２】
濃度：ＦＶＩＩａ　１ｎＭ；ＴＦ　５ｐＭ；ＦＸ　０～１５００ｎＭ；基質５００μＭ
【０５０３】
分析：ＦＸ添加量の増大に伴い、ＦＶＩＩａ／ＴＦ複合体がすべてＦＸと結合する時点まで、ＦＸと結合するＦＶＩＩａ／ＴＦ複合体が増加したはずである。上記の時点での反応は、ＦＸが活性化される速度により制限された。したがって、ＦＸ活性化の速度はＦＸの濃度の増大とともに増大したはずであり、曲線の形状は漸近的に最大速度に近づくものとなっている（図１２３）。
【０５０４】
データを下記の数式に当てはめた。
【０５０５】
【数５】

$$v = V_{max}\left(\frac{[S]}{K_m + [S]}\right)$$

【０５０６】

	ＭＯＤ－５０００	ＭＯＤ－５０１４	
V_{max}	１．７８	１．６４	ｎＭ　ＦＸａ／分
K_m	１４０	１２０	ｎＭ

【０５０７】
結論：ＴＦと結合すると、ＭＯＤ－５０１４はＦＸの回転率がＭＯＤ－５０００に比べてわずかに低下した（９２％）。ＦＸとＭＯＤ－５０１４／ＴＦ複合体との結合は、ＦＸとＭＯＤ－５０００／ＴＦ複合体との結合と同じであった（図１１）。
【０５０８】
ＦＸ活性化により測定されるＭＯＤ－５０１４の脂質結合
【０５０９】
論理的根拠：血小板上での第Ｘ因子活性化はＦＶＩＩａの止血効果に寄与すると考えられる。この血小板活性は、低ＴＦ環境下またはＴＦ不在下で起こると考えられる。ＴＦ不在下での第Ｘ因子活性化は脂質小胞上で試験できる。
【０５１０】
方法：脂質上でのＦＶＩＩａによる第Ｘ因子活性化は、酵素（ＦＶＩＩａ）およびタンパク質基質（ＦＸ）の両者の結合の関数となる。脂質の比をＰＣ：ＰＥ：ＰＳ＝４１：４４：１４とし、高活性化血小板の組成を模倣するよう設計した。脂質は大型の単層小胞（

２００ｎｍ）として調製した。漸増濃度の小胞をＦＶＩＩａおよびＦＸに添加した。合成基質（Ｐｅｆａｃｈｒｏｍｅ　ＦＸａ）の切断により第Ｘ因子活性化を評価した。検量線により合成基質の切断をＦＸａ濃度に変換した。

【０５１１】

結果

【０５１２】

濃度：ＦＶＩＩａ　２０ｎＭ；ＦＸ　５００ｎＭ；脂質０～１０００μＭ；基質５００μＭ。

【０５１３】

分析：ＦＸａ生成速度を脂質小胞の濃度に対してプロットした（図１２Ａ）。予想された通り、脂質濃度の増大に伴い反応に利用可能な表面積が増大するため、ＦＸａ生成が増大した。脂質が十分な濃度になったとき、ＦＶＩＩａとＦＸが異なる脂質小胞上に分離したため反応速度が低下した。この鋳型反応は、この系で予想されることである。データを方程式に当てはめることはせず、示した線は視覚的参照用のみにとどめる。ＭＯＤ－５００ＯとＭＯＤ－５０１４との間のＦＸａ生成速度の差は、脂質に対する親和性の差によるものではなかった。このことは、それぞれの最大値に対する相対ＦＸａ生成速度を脂質濃度に対してプロットした図１２Ｂからわかる。

【０５１４】

結論：ＴＦ不在下でのＦＸ活性化の速度は、ＭＯＤ－５０００よりもＭＯＤ－５０１４の方が低い（約６０％）。ＭＯＤ－５０１４の脂質に対する親和性はＭＯＤ－５０００のものと同じである。

【０５１５】

脂質結合ＭＯＤ－５０１４によるＦＸ活性化の動力学

【０５１６】

論理的根拠：ＴＦ不在下でＭＯＤ－５０１４のＦＸ活性化の速度がＭＯＤ－５０００に比べて低下するは、ＦＸａに対する親和性が低下するか、ＦＸが脂質表面で酵素と結合するとその回転率が低下する結果であると考えられる。

【０５１７】

方法：様々な濃度のＦＸを固定濃度のＦＶＩＩａおよび脂質小胞とインキュベートした。合成基質（Ｐｅｆａｃｈｒｏｍｅ　ＦＸａ）の切断により第Ｘ因子活性化を評価した。検量線により合成基質の切断をＦＸａ濃度に変換した。

【０５１８】

結果

【０５１９】

濃度：ＦＶＩＩａ　２０ｎＭ；ＦＸ　０～２５００ｎＭ；脂質１００μＭ；基質５００μＭ。

【０５２０】

分析：ＦＸ添加量の増大に伴い、ＦＶＩＩａがすべてＦＸと結合する時点まで、ＦＸと結合する脂質表面のＦＶＩＩａが増加したはずである。上記の時点での反応は、ＦＸが活性化される速度により制限される。したがって、ＦＸ活性化の速度はＦＸの濃度の増大とともに増大し、曲線の形状は漸近的に最大速度に近づくものとなるはずである。予想される通り、ＦＶＩＩａのＦＸに対する親和性はＴＦ不在下で低下し（Ｋｍが大きくなり）、ＦＸａ生成速度はＴＦ不在下で低下している（図１３）。

【０５２１】

データを下記の数式に当てはめた。

【０５２２】

【数６】

$$v = V_{max}\left(\frac{[S]}{K_m + [S]}\right)$$

【０５２３】

	ＭＯＤ－５０００	ＭＯＤ－５０１４	
V_{max}	０．２５３	０．１１５	ｎＭ　ＦＸａ／分
K_m	８７８	８４８	ｎＭ　ＦＸａ／分

【０５２４】

結論：ＴＦ不在下では、脂質表面でのＦＸ活性化の速度はＭＯＤ－５０１４の方がＭＯＤ－５０００よりも低い（４５％）。脂質表面でのＦＸとＭＯＤ－５０１４との結合はＦＸとＭＯＤ－５０００との結合と同じであった（図１３）。

【０５２５】

ＡＴによるＭＯＤ－５０１４の不活性化

【０５２６】

論理的根拠：ＦＶＩＩａのインビボでのクリアランスのかなりの部分が、ＡＴとのＦＶＩＩａ複合体の形成を介するものであると考えられる。この反応の速度は、インビトロでＦＶＩＩａがＴＦと結合する場合にのみ測定可能である。このインビトロの反応が測定可能な速度で進行するには、さらに、天然のグリコサミノグリカンの作用を模倣すると考えられる高濃度のヘパリンが必要である。

【０５２７】

方法：第ＶＩＩａ因子をＴＦとインキュベートして複合体を形成させた。この複合体をＡＴおよびヘパリンとインキュベートした。決まった時間間隔で、ポリブレン（臭化ヘキサジメトリン）を添加してヘパリンを中和することにより反応を停止させた。合成基質（Ｐｅｆａｃｈｒｏｍｅ　ＦＶＩＩａ）の切断により残存ＦＶＩＩａ／ＴＦ活性を測定した。このアッセイに用いた濃度でポリブレンが基質切断を変化させることはなかった。

【０５２８】

結果

【０５２９】

濃度：ＦＶＩＩａ　１０ｎＭ；ＴＦ　１１ｎＭ；ＡＴ　１μＭ；ヘパリン５Ｕ／ｍＬ；ＦＶＩＩａ／ＴＦ　８．２ｎＭ；ポリブレン１００μｇ／ｍＬ；基質５００μＭ。

【０５３０】

分析：基質切断速度として測定したＦＶＩＩａ／ＴＦの濃度を、分で表した時間に対してプロットした（図１４）。予想された通り、ＡＴ／ヘパリンによって、ＦＶＩＩａが阻害され、それによりＦＶＩＩａ／ＴＦ活性が低下した。

【０５３１】

データを下記の数式に当てはめた。

【０５３２】

【数７】

$$v = V_{t=0}e^{-k*time}$$

【０５３３】

	ＭＯＤ－５０００	ＭＯＤ－５０１４	
V_0	１１．８９	１１．９３	
k	０．３５４	０．２１７	分$^{-1}$

【０５３４】

結論：Ｔ＝０での活性の値がほぼ同じであったことから、反応物中に存在する量はＭＯ

Ｄ－５０００とＭＯＤ－５０１４とで同じであったことがわかる。ＭＯＤ－５０１４の阻害速度はＭＯＤ－５０００よりもわずかに遅かった（６２％）（図１４）。両反応とも完全に阻害するまで進行した。

【０５３５】

ＴＦＰＩによるＭＯＤ－５０１４の不活化

【０５３６】

論理的根拠：ＴＦＰＩはＦＶＩＩａ／ＴＦ複合体の生理的阻害剤である。ＴＦＰＩのＫ２ドメインはＦＸａとの最初の複合体を形成する。この複合体はＦＶＩＩａ／ＴＰＩと結合し、そこでＴＦＰＩのＫ１ドメインがＦＶＩＩａと相互作用する。したがって、ＦＶＩＩａ／ＴＦによって、ＦＸが活性化されると、複合体が阻害され、ＦＶＩＩａ－ＴＦＰＩ間の作用が停止するはずである。

【０５３７】

方法：第ＶＩＩａ因子とＴＦを一緒にインキュベートして複合体を形成させた。この複合体をＴＦＰＩ／ＦＸ／ＦＸａ基質に添加した。合成基質（Ｐｅｆａｃｈｒｏｍｅ　ＦＸａ）の切断により第Ｘ因子活性化を評価した。検量線により合成基質の切断をＦＸａ濃度に変換した。

【０５３８】

結果

【０５３９】

濃度－阻害：ＦＶＩＩａ　１ｎＭ；ＴＦ　２０ｐＭ；ＦＸ　１３５ｎＭ；ＴＦＰＩ　０～５ｎＭ；基質５００μＭ。

【０５４０】

解析：予想された通り、初期のＦＸａ生成は、全ての反応で同じ速度で起こった（図１５Ａ～Ｃ）。ＴＦＰＩの存在下では、ＦＶＩＩａ／ＴＦＰＩ複合体がＴＦＰＩ／ＦＸａにより阻害されたため、ＦＸａ生成速度が遅くなった（下の２つのパネル）。ＴＦＰＩ複合体の作用停止は、ＴＦＰＩの濃度が高いほど短時間でみられた（下の２つのパネル）。ＦＶＩＩａ／ＴＦＰＩの作用が停止する前に形成されたＦＸａの量は、ＴＦＰＩとＦＶＩＩａ／ＴＦとの相互作用の尺度となる。ＭＯＤ－５０１４はＦＸａ生成速度がわずかに低く、そのためＦＸａ／ＴＦＰＩ複合体の形成が遅くなったことから、反応がプラトーに達するまでに要した時間は、ＭＯＤ－５０００よりもＭＯＤ－５０１４の方が長かった。

【０５４１】

結論：上のパネルからわかるように、ＴＦＰＩによるＦＸａのＭＯＤ－５０１４／ＴＦ生成阻害の濃度依存性は、ＭＯＤ－５０００のものと極めて類似している。ＭＯＤ－５０１４の方がＴＦＰＩ阻害に対する感受性がわずかに高い（１２４％）と思われ、あるいは、これはＦＸａ生成速度がわずかに遅いことによるアーティファクトであると思われる。

【０５４２】

実施例３

ＣＴＰ修飾活性化第ＶＩＩ因子の還元

【０５４３】

目的

【０５４４】

製造方法の目的は、合成培地中でＣＨＯ細胞を用いた組換えＤＮＡ技術により流加バッチ上流プロセス、およびこれに続く、高度グリコシル化され、高度にγ－カルボキシル化されたＭＯＤ－５０１４を産生する、堅牢で規模拡大可能な下流プロセスを開発することであった。換言すれば、最も高い含量のγ－カルボキシル化を有するＭＯＤ－５０１４を産生および生成し、プロセスおよび製造関連不純物を効率的に除去することであった。Ｏ－グリカン、Ｎ－グリカン、シアル酸の比率、酸化関連型、効力（ＳＴＡ－ＣＬＯＴ分析により試験）、Ｇｌａドメインの比率（あるいは、非カルボキシル化グルタミン酸残基の比率、および非活性化ＦＶＩＩ比率）を分析することは重要であった。

【０５４５】

製造手順

【０５４６】

遺伝子導入および安定クローン選択

【０５４７】

ＭＯＤ－５０１４をコードするｃＤＮＡをＣＨＯ細胞（ｄｈｆｒ陰性ＣＤ　ＤＧ４４細胞、これは、タンパク質不含培地中での増殖および浮遊増殖に適応されている）に遺伝子導入し、限界希釈ステップにより安定クローンを生成した。最大産生クローンを増幅し、最終クローンをさらなる開発用に選択した。

【０５４８】

動物成分不含培地を、マスターおよびワーキングセルバンク（ＭＣＢ；ＷＣＢ）の誘導の全体を通して使用した。安定クローンを細胞培養の限界希釈ステップにより単離した。最高産生クローンを漸増濃度の選択可能剤を用いて増幅した。クローン細胞集団倍化数（ＰＤＬ）、ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子の生産性（ピコグラム／細胞／日、ＰＣＤ）、および選択培地中での最大達成細胞密度に基づいて、最大産生クローンを単離し、Ｒ＆Ｄバンクの調製、続けて、適当と認められたマスターセルバンク（ＭＣＢ）およびワーキングセルバンク（ＷＣＢ）の製造に使用した。

【０５４９】

上流プロセス：

【０５５０】

ＭＯＤ－５０１４を発現しているＣＨＯ細胞の安定クローンをマスターセルバンク（ＭＣＢ）の単一バイアルから接種し（図１６のステップ１）、ビタミンＫを補充した無血清合成培地中で流加バッチ手法を用いて、１０００Ｌまたは２０００Ｌのバイオリアクターに段階的に拡大した（図１６のステップ２～４）。

【０５５１】

産生細胞培養上清の生物汚染度、細菌内毒素、生産性および外来性ウィルスの試験をした。このプロセスを、５０Ｌおよび２００Ｌバイオリアクターを播種用バイオリアクターとして使用して（図１６のステップ３）、および１０００Ｌまたは２０００Ｌバイオリアクターをスケールアップ用として使用して（図１６のステップ４）、実施した。全ての産物の接触面は使い捨て型としたが、廃棄できない製品接触装置は製品専用とした。これらの装置は、バッチ間で洗浄し、消毒した。１０００Ｌまたは２０００Ｌバイオリアクターに接種する前に、培養物を５０Ｌおよび２００Ｌに拡大した。最終スケールアップおよび流加バッチバイオリアクター産生を、２０００Ｌの使い捨て型バイオリアクターで実施した。細胞の取り出しは、使い捨て型フィルターシステム（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅデプスフィルター）を用いて行った。

【０５５２】

細胞増殖を、製造バイオリアクター、１０００または２０００Ｌで実施した（図１６，ステップ４）。

【０５５３】

培養物をバイオリアクター中で３７℃、５０％溶存酸素（ＤＯ）およびｐＨ７．１で約１１日間（細胞の生存率に依存）インキュベートした。運転中、ハーベストまでにｐＨが６．９に変化し、フィード（Ｃｅｌｌ　Ｂｏｏｓｔ　６）を加え、ビタミン$Ｋ_3$を加えた。さらに、ＤＭＳＯをバイオリアクターに加えた。目的の濃度に維持するために、培養物にグルコースフィード溶液を加え、また、目的の培養物濃度に維持するために、１Ｍの重炭酸ナトリウム塊を加えた。所定の基準を用いて、ハーベストを実施した。最初の４日間は、細胞計数、生存率および代謝分析のために毎日サンプリングした。５日目からは、細胞計数、生存率および代謝分析のために、９日目からは、前記に加えて、ＥｌｉｓａまたはＨＰＬＣ親和性法による比生産性のために、１日２回サンプリングした。

【０５５４】

本明細書で提供される実施例は、流加バッチ方式を使用したが、当業者なら、通常、類似の増殖および生成スキームを使用する灌流方式を開発可能であろう。あるいは、当業者

なら、インキュベーション期間が７～１２０日までにもなり得る灌流法を開発可能であろう。

【０５５５】

細胞ハーベストおよび貯蔵（図１６のステップ５）

【０５５６】

使い捨て型の濾過プロセストレインを用いて、ハーベストを実施した。ハーベストを清澄化するために、深層濾過および０．２μｍ濾過を実施した。清澄化後、０．４５／０．２μｍ濾過を実施した。デプスフィルターをフラッシングし、残留液体をシステムから空気を使って吹き飛ばした。濾過プロセスは、１５Ｌ／分以下のポンプ速度および最大定格圧力で実施した。後で、フィルターをトリス塩酸緩衝液で洗浄し、加圧空気で吹き出し、製品回収率を高めた。

【０５５７】

清澄化ハーベストを、生物汚染度、細菌内毒素、特定のタンパク質含量を、ＥＬＩＳＡまたはＨＰＬＣ親和性法、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ウエスタンブロット、ＨＣＰ　ＥＬＩＳＡアッセイ、残留ＤＮＡ、インビトロウィルスアッセイ、ウィルス様粒子、Ｓ＋Ｌおよびマイコプラズマを検査した。

【０５５８】

精製活性化プロセス

【０５５９】

精製スキームを図１７に記載している。精製プロセスは、４種のクロマトグラフィーカラムをベースにした。タンパク質を、親和性クロマトグラフィー、混合モードクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、および陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した。タンパク質は陰イオン交換クロマトグラフィーのステップで活性化した。精製プロセスは、ウィルス不活化およびナノ濾過ステップも含む。

【０５６０】

限外濾過および透析濾過１－ＵＦＤＦ１（ステップ６）

【０５６１】

清澄化ハーベストを、タンジェント流濾過（ＴＦＦ）ベース限外濾過および透析濾過（ＵＦ／ＤＦ）ステップを用いて濃縮および透析濾過を行った。カートリッジの公称分画分子量サイズは、３０ｋＤａとした。濃縮および透析濾過ハーベストを、ＥＬＩＳＡ、ＨＰＬＣ親和性法により特定のタンパク質含量を検査し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ウエスタンブロット、および／またはＨＣＰ　ＥＬＩＳＡを用いてエンドトキシンおよび生物汚染度を評価した。

【０５６２】

インキュベーションによるウィルス不活化（ステップ７）

【０５６３】

材料を０．２２μｍのフィルターを通して滅菌混合バッグ中へ濾過した。次に、ウィルス内容物を不活性化するために溶液、例えば、トリス／１０％トリトン溶液を、最終濾液に加え、トリトン濃度を１％（ｗ／ｗ）にした。インキュベーション後、アフィニティカラムへのロード前に、産物溶液を、再度０．２μｍフィルターユニットを用いて再度濾過した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロット分析を用いて、濾過したウィルス不活化産物の、エンドトキシンおよび生物汚染度の検査をした。

【０５６４】

親和性クロマトグラフィー（ステップ８）

【０５６５】

このステップでは、アフィニティカラムを使用した。カラムの所定のベッド高さまで充填した。産物量に応じて、このステップを２～４回実施した。アッセイ中にトリトンにより干渉が生じるという理由で、トリトンの添加前に、特定のタンパク質を特定した。アフィニティカラムを平衡化し、ウィルス不活化プールをロードした後、洗浄した第２の洗浄を行い、材料を溶出し、その後、翌日の処理のために２～８℃で貯蔵した。全てのクロマ

トグラフィーステップを、ダウンフローモードで行った。

【０５６６】

溶出液の、特定のタンパク質産物、エンドトキシン、残留ＤＮＡ、シアル酸含量、γ－カルボキシル化パーセント、荷電Ｎ－グリカン、残留浸出親和性リガンドおよび生物汚染度の検査を、２８０ｎｍでの吸光度、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ＡＩＥＸ　ＨＰＬＣ、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＨＣＰ　ＥＬＩＳＡ、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、およびウエスタンブロットなどの当該技術分野において周知の技術を用いて行った。

【０５６７】

マルチモデルまたは混合モードクロマトグラフィー（ステップ９）

【０５６８】

マルチモデルまたは混合モードクロマトグラフィー樹脂を充填したカラムをこのステップで用いた。カラムの所定のベッド高さまで充填した。産物量に応じて、このステップを１～４回実施した。カラムを平衡化し、希釈した親和性溶出液をロードし、洗浄して、溶出液を収集し、さらなる処理まで２～８℃で貯蔵した。溶出液の、特定のタンパク質産物、エンドトキシン、残留ＤＮＡ、シアル酸含量、γ－カルボキシル化パーセント、荷電Ｎ－グリカン、残留浸出親和性リガンドおよび生物汚染度の検査を、２８０ｎｍでの吸光度、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ＡＩＥＸ　ＨＰＬＣ、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＨＣＰ　ＥＬＩＳＡ、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、およびウエスタンブロットなどの技術を用いて行った。

【０５６９】

疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）（ステップ１０）

【０５７０】

このステップでは、ＨＩＣ樹脂を使用した。カラムの所定のベッド高さまで充填した。産物量に応じて、ＨＩＣクロマトグラフィーを１～４回実施した。硫酸アンモニウムを用いて、マルチモデルまたは混合モードタンパク質カラム溶出液を調節することにより、ＨＩＣロードを調製した。カラムを平衡化し、調節および０．２μｍフィルター濾過したマルチモデルまたは混合モードカラム溶出液をロードした後、洗浄した。産物を溶出し、その後、さらなる処理まで、２～８℃で貯蔵した。溶出液の特定のタンパク質濃度を２８０ｎｍでの吸光度およびＳＥＣ－ＨＰＬＣにより検査した。加えて、溶出液のエンドトキシンおよび生物汚染度も検査した。

【０５７１】

ＨＩＣ溶出液の限外濾過および透析濾過（ステップ１１）

【０５７２】

ＨＩＣ溶出液を濃縮および透析濾過して体積を縮減し、アニオン交換カラムステップ用の材料を調製した。ｐＨおよび導電率が範囲内にあると判定されると、システムを排液し、０．５／０．２μｍ濾過ステップを用いて、滅菌バッグ中に濾過した。最終量の濃縮および透析濾過したＨＩＣ溶出液を、さらなる処理まで２～８℃で貯蔵した。溶出液の、特定のタンパク質産物、エンドトキシン、残留ＤＮＡ、シアル酸含量、γ－カルボキシル化パーセント、荷電Ｎ－グリカン、残留浸出親和性リガンドおよび生物汚染度の検査を、２８０ｎｍでの吸光度、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ＡＩＥＸ　ＨＰＬＣ、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＨＣＰ　ＥＬＩＳＡ、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、およびウエスタンブロットなどの技術を用いて行った。

【０５７３】

陰イオン交換クロマトグラフィー（ステップ１２）

【０５７４】

陰イオン交換樹脂を充填したカラムをこのステップで用いた。カラムの所定のベッド高さまで充填した。ロードを濃縮、透析濾過ＨＩＣ溶出液画分とした。ＦＶＩＩからＦＶＩＩａへの活性は、アニオン交換カラム上で起こった。活性化および洗浄ステップ後、産物を溶出し、さらなる処理のために収集した。溶出液のｐＨを、必要に応じ調節した。その後、溶出液を０．４５／０．２μｍフィルターを通して濾過した。さらなる処理まで、材料を２～８℃で貯蔵した。全てのクロマトグラフィーステップは、ダウンフローモードで実施される。溶出液の、特定のタンパク質濃度、残留ＤＮＡ、および生物汚染度の検査を

、２８０ｎｍでの吸光度、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ＡＩＥＸ　ＨＰＬＣ、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＨＣＰ　ＥＬＩＳＡ、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、およびウエスタンブロットにより行った。

【０５７５】

ナノ濾過によるウィルス除去（ステップ１３）

【０５７６】

Ａｓａｈｉ　Ｐｌａｎｏｖａ　２０Ｎウィルスフィルターを用いて、ウィルス除去を実施した。０．４５／０．２μｍまたは０．１μｍの膜のフィルターを、ナノ濾過（Ｐｌａｎｏｖａ　２０Ｎフィルター）のプレフィルターとして用いた。Ａｓａｓｈｉ　Ｐｌａｎｏｖａ　２０Ｎフィルターを陰イオン交換溶出緩衝液または処方緩衝液で作製した最終配合物でプレ平衡化し、プライマー塗布した。陰イオン交換溶出液を連続圧力でフィルタートレインを通過させて、滅菌バイオプロセスバッグ中に収集した。フィルタートレイン（ｐｌａｎｏｖａフィルター）を陰イオン交換溶出緩衝液または処方緩衝液でフラッシングして、産物回収を最大化した。製造業者推奨手順に従った使用の前、および使用後に、フィルターの健全性を試験した。使用後試験には、同様に製造業者の手順に従った、金粒子試験が含まれる。ウィルス濾液の特定のタンパク質を、２８０ｎｍでの吸光度、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ＡＩＥＸ　ＨＰＬＣ、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより検査した。加えて、ウィルス濾液のエンドトキシンおよび生物汚染度も検査した。

【０５７７】

ＵＦＤＦ－３および濾過ならびに原薬（ＤＳ）の貯蔵（ステップ１４）

【０５７８】

ウィルス濾液をバルク濾過および充填に備えて、標的ＤＳ濃度（２～１００ｍｇ／ｍｌで変化し得る）に濃縮した。最終ステップには、０．２μｍのフィルターと通す除菌濾過による濾過が含まれた。３～３０ＫＤａの分画分子量を有する使い捨てまたは再使用可能カセットをこのステップで使用した。第１のステップで産物を５～２５ｍｇ／ｍｌタンパク質に濃縮し、２０ｍＭのクエン酸塩、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１３．３ｍＭのグリシン、ｐＨ６．４または２０ｍＭのクエン酸塩、１００ｍＭのアルギニン、２％のトレハロース、ｐＨ６．２（≧７ＤＦ体積）に対し透析濾過した。ＵＦＤＦ－３プールの特定のタンパク質を２８０ｎｍでの吸光度により検査した。加えて、ＵＦＤＦ－３プールのエンドトキシンおよび生物汚染度も検査した。

【０５７９】

最終産物濃度を調節し、ポリソルベート８０（ＰＳ－８０）を加えて、０．０４％の最終濃度とした。あるいは、添加をしなかった。調節したＵＦＤＦ－３産物をＭｉｌｌｉｐａｋ　１００またはＭｉｌｌｉｐａｋ　２００フィルターで濾過した。濾過産物溶液を分取し、７０±５℃の温度で凍結した。処方プールの産物濃度をＡ２８０により検査した。処方緩衝液を、２０ｍＭのクエン酸塩、１００ｍＭのアルギニン、２％のトレハロース、０．０４％のＳ８０、ｐＨ６．２とした。

【０５８０】

結果

【０５８１】

使用精製プロセスは、マルチモデルステップ中（図２１）に、高度γ－カルボキシル化ＭＯＤ－５０１４、高度グリコシル化ＭＯＤ－５０１４産物を収集し、精製した。さらに、高度グリコシル化ＭＯＤ－５０１４の初期比率は、上流細胞培養プロセスからもたらされ、精製プロセスを通して一定に維持される（図１９）。このプロセスは、プロセス関連不純物、例えば、酸化型およびマルチモデルおよびＨＩＣ精製ステップ中のその他の関連型（図２０）などを除去する高い能力を示し、高品質産物が得られた。

【０５８２】

精製ＭＯＤ－５０１４産物の還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を図１８に示す。次の単離産物が特定された（番号は右側）：７５ｋＤａ－非活性化型のＭＯＤ－５０１４（１）；５５ｋＤａ－ＭＯＤ－５０１４重鎖－ＣＴＰ－ＣＴＰ－ＣＴＰ（２）；２５ｋＤａ－ＭＯＤ－５０１４軽鎖（４）；低分子量（ＬＭＷ）型（３、５、および６）。

【０５８３】
表９は、２つの異なる医薬品受託製造機関（ＣＭＯ）における試験運転（ＥＲ）、および異なるＧＭＰ（適性製造基準）運転のための製造プロセスの結果を示す。詳細事項には、効力、非活性化ＭＯＤ－５０１４パーセント（％）、酸化型パーセント（％）；カルボキシル化されなかった（Ｇｌａドメインレス）グルタミン酸残基パーセント（％）、シアル酸含量（ｍｏｌ／ｍｏｌ）、およびＯ－グリカン含量（ｍｏｌ／ｍｏｌ）が含まれる。
【０５８４】
【表９】
精製ＭＯＤ－５０１４品質特性

方法	CMO-1		CMO-2	
	ER	BMP1	GMP2	GMP3
効力(U/mg)	15,563	16,720	22,478	23,608
非活性化FVII	2.7	2.4	2.6	3.0
酸化型(%)	4.0	4.9	2.9	3.9
Glaドメインレス(%)	5.4	5.5	0.6	0.6
シアル酸(mol/mol)	17.1	17.1	18.4	17.2
O-グリカン(mol/mol)	12.3	13.2	13.2	12.5

【０５８５】
さらに、ＣＭＯ－１の結果は、荷電Ｎ－グリカンのパーセントは、８５．３（ＥＲ）および８４．２（ＧＭＰ１）であったことを示した。
【０５８６】
結論
【０５８７】
結論として、ＭＯＤ－５０１４の臨床開発および商業製造の支援に好適する大規模流加バッチ製造プロセスを開発した。結果は、このプロセスを、高度グリコシル化長時間作用型ＦＶＩＩａ－ＣＴＰ（ＭＯＤ－５０１４）の製造のための再現可能な流加バッチ製造プロセスとして支援する。精製ＭＯＤ－５０１４産物は、高含量レベルのＯ－グリカンおよびシアル酸を有した。精製産物は、最小限レベルの非活性化ＦＶＩＩおよびＧｌａドメインレス（カルボキシル化されなかったグルタミン酸残基）を有した。
【０５８８】
実施例４
薬物製品（ＤＰ）の製造
【０５８９】
薬物製品（ＤＰ）の薬剤処方プロセスは、原薬（ＤＳ）の解凍から開始される。薬物製品は、処方緩衝液を用いて原薬（ＤＳ）を必要濃度へ希釈するか、または希釈なしで無菌濾過して、標準的２Ｒバイアルまたはその他の一次包装、例えば、カートリッジまたはプレフィルシリンジへの充填により実現される。当業者なら、用語の「原薬」（ＤＳ）が、医薬品有効成分（ＡＰＩ）を包含するか、またはこれと等価であり得ることを理解するであろう。一実施形態では、本明細書で記載のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、バルク精製薬物を含む原薬（ＤＳ）である。また、当業者なら、用語の「薬物製品」（ＤＰ）が最終的に処方され、最終容器、例えば、バイアル中に無菌条件下で分注された薬物を包含し得ることを理解するであろう。一実施形態では、本明細書で記載のＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子は、最終的に処方されたＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子を含む薬物製品（ＤＰ）である。
【０５９０】
ＣＴＰ修飾凝固第ＶＩＩ因子の特性評価
【０５９１】
ハーベスト中のＣＴＰ修飾ポリペプチド含量および高グリコシル化型の比率は、特定のＲＰ－ＨＰＬＣ法により決定される。ハーベスト中の総タンパク質は、ブラッドフォード

分析により測定した。選択クローンにより産生されたハーベスト中の特定のタンパク質比率は、ハーベスト中の総タンパク質の約７０％である。さらに、製造上流プロセスは、低グリコシル化型に比べて、高い比率の高度グリコシル化ＣＴＰ修飾タンパク質を可能とするように開発されている。高度グリコシル化型は、標的型であり、その理由は、これがＣＴＰ修飾ポリペプチドの半減期のより長い延長をもたらすためである。

【０５９２】

Ｏ－グリカン含量

【０５９３】

グリカンを放出させ、２－アミノベンズアミド（２ＡＢ）でグリカンを標識し、浄化してＮＰ－ＨＰＬＣで分析することにより、グリコプロファイリングを実施する。簡単に説明すると、Ｏ－グリカン含量アッセイを行って、Ｏ－グリカンの数、モル／（ＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子モル）を計算する。Ｏ－グリカンの末端ガラクトース単位をβ－ガラクトシダーゼによりタンパク質から酵素切断する。これらの遊離ガラクトース単位は、ＣａｒｂｏＰａｃ　ＰＡ２０カラムで分離され、パルスドアンペロメトリによる検出される。ガラクトース（Ｇａｌ）は、ガラクトース参照基準による外部較正を用いて定量される。ガラクトースの含量は、Ｏ－グリカン構造、Ｇａｌ－ＧａｌＮＡｃの含量と直接関連し得る。原薬および薬物製品バッチの分析により、安定したバッチ間一貫性が示された。この予想外の安定したグリコシル化含量は、重要であり、ＣＴＰ当たりのＯ－グリカン数は、当該技術分野において既知のものより改善されている。

【０５９４】

未処理の分子量分析試料

【０５９５】

異なるＤＳバッチの分子量分析を、Ｏ結合型グリコシル化部位の数の情報を得ることを目的として、実施する。未処理の試料ならびにノイラミニダーゼを用いた脱シアル化試料、およびＯ－グリコシダーゼを用いた脱グリコシル化試料をオンラインＬＣ／ＥＳ－ＭＳにより分析した。高％のセリン占有率を示す結果は、当該技術分野において既知のレベルに比較して（本明細書で製造したＣＴＰ修飾第ＶＩＩ因子における６までと比較して、４のみのセリングリコシル化）、予想外である。

【０５９６】

ＣＴＰ修飾タンパク質試料のＯ結合型グリコシル化部位占有率

【０５９７】

４つの異なるＤＳバッチのＯ－グリコシル化部位占有率を、分子当たりのＯ結合型グリコシル化部位の数の情報を得ることを目的として、Ｍスキャンで求める。試料のノイラミニダーゼを用いた脱シアル化とそれに続く還元／カルボキシメチル化試料のトリプシン消化を行った。処理試料に対し、最終的にオンラインＬＣ／ＥＳ－ＭＳを実施し、ＭＳデータの解釈を、指定ソフトウェアを用いて実施する。トリプシン消化混合物の分析から得たデータの評価により、１００％のタンパク質配列のマッピングを可能とするシグナルが得られる。Ｏ－グリコシル化は、Ｎ末端およびＣ末端ＣＴＰ領域の両方で起こり得る。占有部位は、プロリンの後ろのセリン残基として特定され、また、セリン反復領域の４個のセリンの内の２個であると特定される。合計で１８セリン残基までが、Ｏ－グリカンのための結合着部位として機能し得る。バッチ管で有意な差異は検出されていない。

【０５９８】

純度

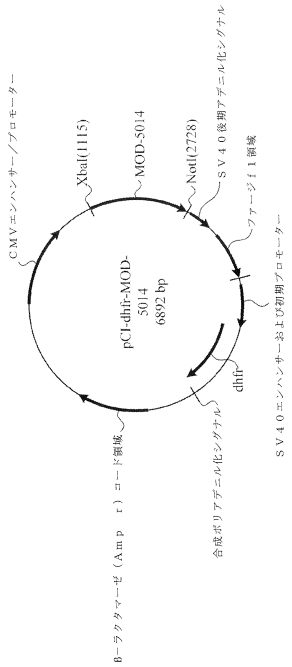
【０５９９】

ＲＰ－ＨＰＬＣは、それらの極性に応じて分子を分離する。より高い極性からより少ない極性の溶媒への移動相勾配液を、強い極性を有する分子を低い極性の分子より早期に溶出するのに用いる。関連型は、２２０ｎｍでの紫外検出を用いて未変性タンパク質から分離される。関連型の相対的ピーク面積（面積％）および主ピークは、対応するピーク面積を積分することにより算出できる。原薬および薬物製品の主ピークは、９７％を超えるピーク面積からなり、高度に精製された産物であり、有効な精製プロセスであることを示す。

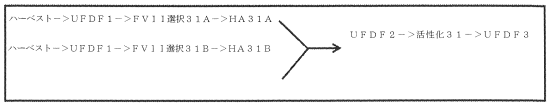
【０６００】
サイズ排除ＨＰＬＣは、分子をサイズに従って分離するクロマトグラフィー技術である。選択された分取領域内で、より大きな分子はより小さい分子より早期に溶出される。分離機序は、非吸着性であり、分子は、無勾配条件下で溶出される。ＳＥＣは、標的分子の高分子量型（ダイマーおよびポリマーなど）からのモノマーの分離を可能とする。ＳＥＣ法は、原薬および薬物製品中のダイマーとポリマーの含量を分析するために開発されている。
【０６０１】
ＲＰ－ＨＰＬＣ含量法
【０６０２】
本方法は、逆相クロマトグラフィーによる中間体試料の含量測定および中間体試料中の非グリコシル化ＣＴＰ修飾ポリペプチド％の測定のために使用されている。逆相－ＨＰＬＣは、それらの極性により分子を分離する。比較的非極性分子は、カラム材料に結合し、一方、荷電および極性分子は、カラムとの相互作用を行うことなく、溶出される。
【０６０３】
結合分子は、極性からより少ない極性の溶液の勾配を使用して溶出される。最強の極性の分子が最初に、続けて、より少ない極性の分子が溶出される。検出は、２１４ｎｍでの吸収により実施される。
【０６０４】
ウィルス除去
【０６０５】
最終薬物製品の内在性および外来性ウィルスの混入に対処し、これを減らす製造プロセスの能力は、予備評価の対象となっている。製造プロセスのスケールダウンしたセグメントに添加した３種のモデルウィルスを用いて、これらのステップが添加ウィルス集団を不活化または除去する能力を定量化するＧＬＰ準拠試験が、試験製品のための適用可能なガイダンスに従って実施されている。ｌｏｇ１０調節力価として表現したウィルスの量を用いて、入力値から出力値を差し引くことにより、ｌｏｇ１０クリアランス指数が容易に決定される。ｌｏｇ１０数として、クリアランス指数は、全評価ステップに対して全体のクリアランス指数を得るために加算的である。Ａ－ＭｕＬＶは、ＣＨＯレトロウィルスの存在の可能性を表すモデルウィルスであると考えられ、混入したＡ－ＭｕＬＶウィルスを不活化し、除去するための採用した手段は、少なくともａｎｔｉｌｏｇ１０（ｌｏｇ１０の逆対数）のクリアランス指数、例えば、２２のウィルス対数減少係数（ＬＲＦ）を実現し、全体プロセスは、ウィルス除去に対し極めて優れた能力を有することを示す。抵抗性無エンベロープ小型ウィルスであるＰＰＶに対して、ナノ濾過ステップにより、強力な除去が達成される。
【０６０６】
本開示の特定の特徴について本明細書で例示および記載してきたが、今では、当業者なら多くの修正、置換、変更および等価物を思いつくであろう。したがって、添付の「特許請求の範囲」は、そのような修正および変更のすべてを本開示の真の趣旨の範囲内に入るとして、包含することを意図するものであることが理解されるべきである。

【図面】

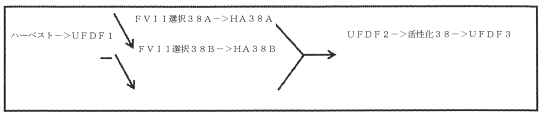
【図１】



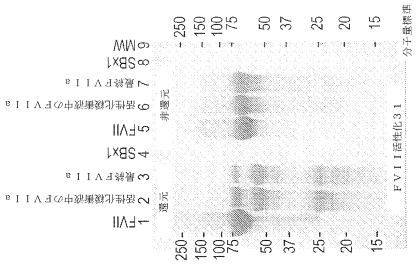
【図２Ａ】



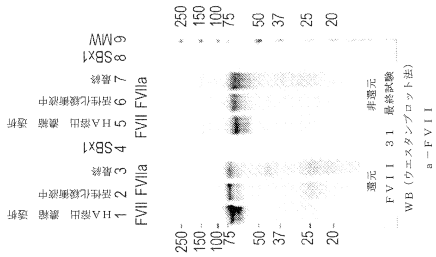
【図２Ｂ】



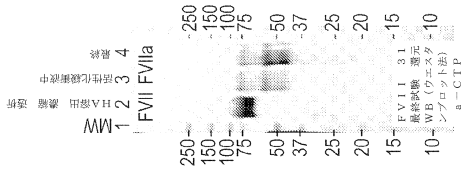
【図３Ａ】



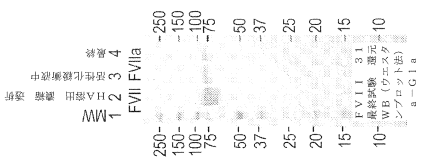
【図３Ｂ】



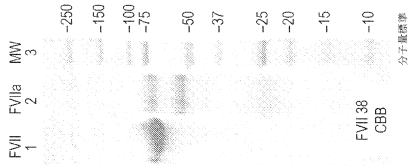
【図３Ｃ】



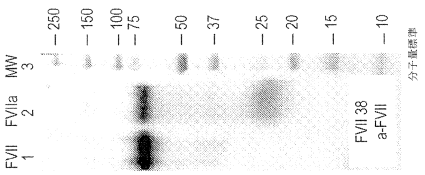
【図３Ｄ】



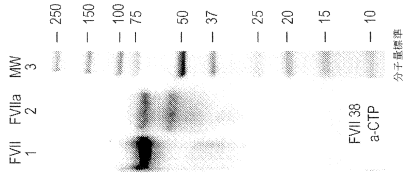
【図３Ｅ】



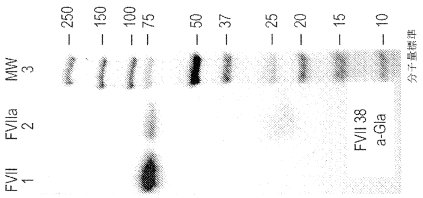
【図３Ｆ】



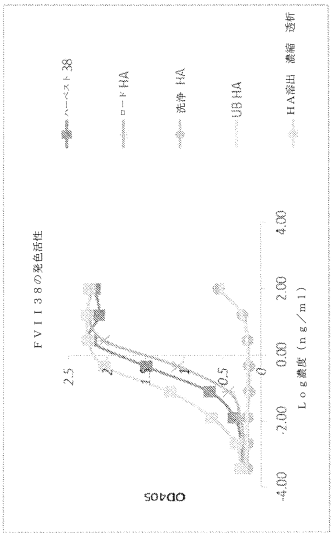
【図３Ｇ】



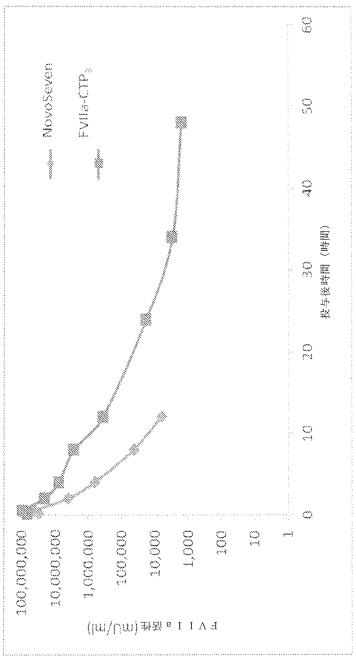
【図３Ｈ】


MW
3
FVIIa
2
FVII
1
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
分子量標準
FVII 38
a-Gla

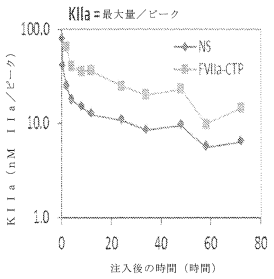
【図４】


FVII38の発色活性
OD405
Log濃度（ng/ml）
ベースト 38
ロード HA
洗浄 HA
UB HA
HA溶出 濃縮 透析

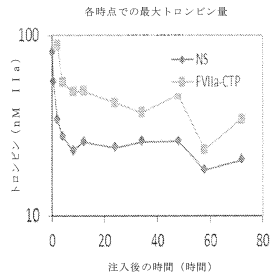
【図５】


NovoSeven
FVIIa-CTP3
FVIIa 活性（mU/ml）
投与後時間（時間）

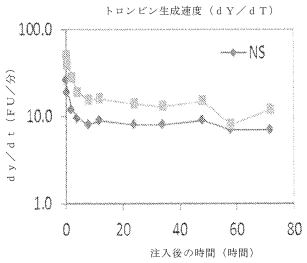
【図６Ａ】


KIIa＝最大量／ピーク
NS
FVIIa-CTP
KIIa（nM IIa／ピーク）
注入後の時間（時間）

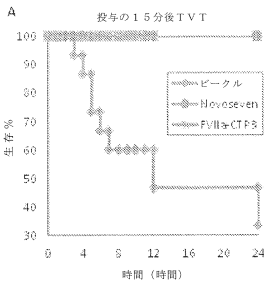
【図６Ｂ】



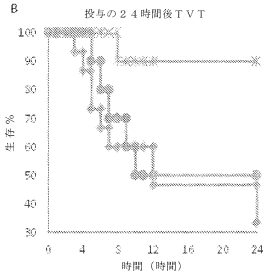
【図６Ｃ】



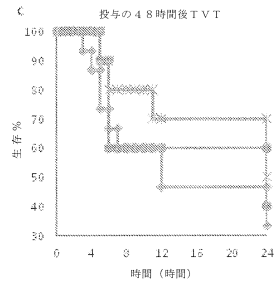
【図７Ａ】



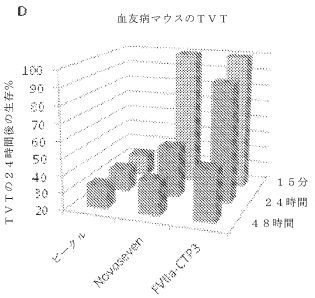
【図７Ｂ】



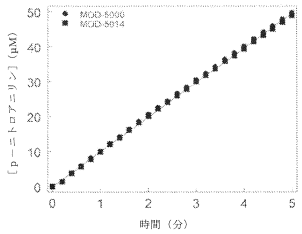
【図７Ｃ】



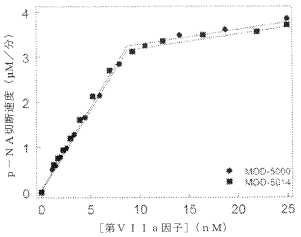
【図７Ｄ】



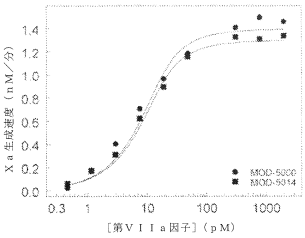
【図８】



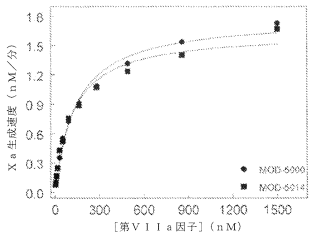
【図９】



【図１０】



【図１１】



【図１２】

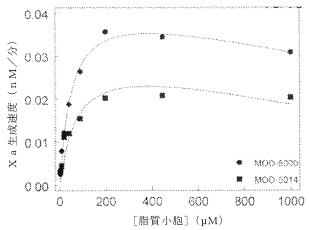


図１２Ａ

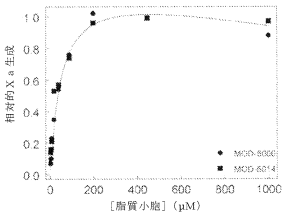
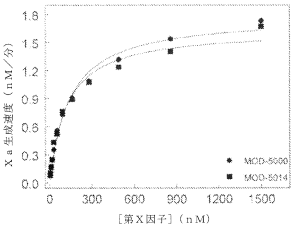
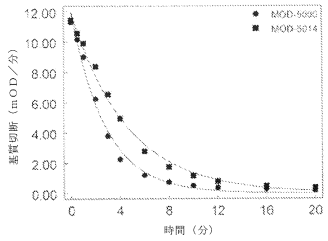


図１２Ｂ

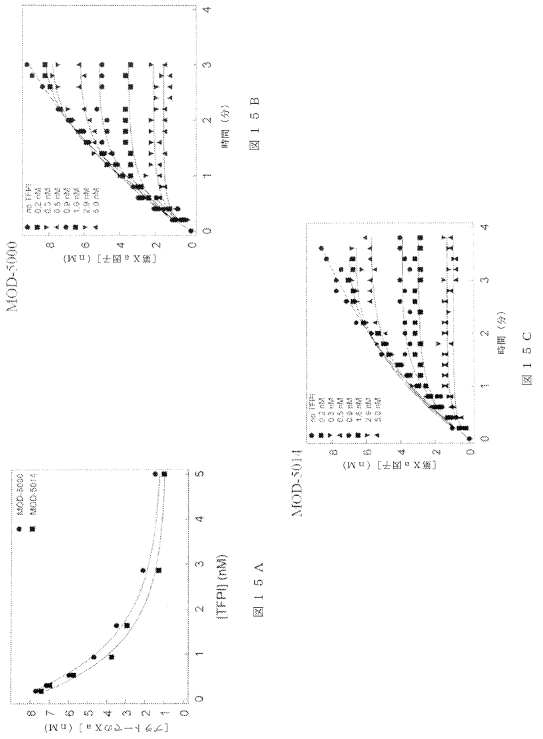
【図１３】



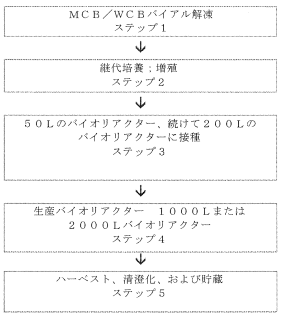
【図１４】



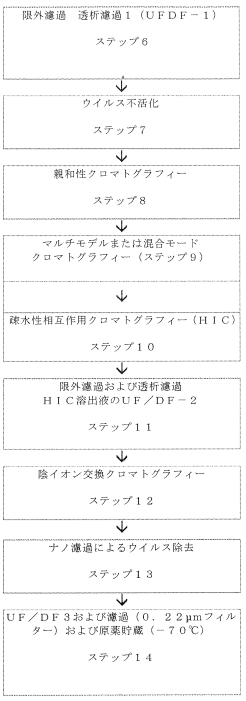
【図１５】



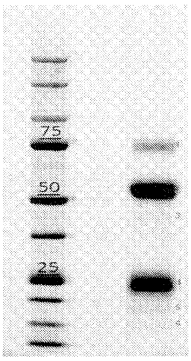
【図１６】



【図１７】



【図１８】



【図１９】

精製ステップ	荷電Ｎ－グリカン（％）
ハーベスト	NA
ウイルス不活化 ＋ ＶＩＩ親和性クロマトグラフィー	80.01
マルチモデルまたは混合モード クロマトグラフィー	79.4
UF/DF2	78.5
UF/DF3	79.5

【図２０】

精製ステップ	RP-HPLC(％)		
	主ピーク	酸化型	他の関連型
ハーベスト	NA	NA	NA
ウイルス不活化 ＋ ＶＩＩ親和性クロマトグラフィー	89.10	4.66	6.23
マルチモデルまたは 混合モードクロマトグラフィー	91.31	4.38	4.31
疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）	94.03	2.68	3.29
陰イオン交換クロマトグラフィー	94.69	2.48	2.83

【図２１】

精製ステップ	γ－カルボキシル化（％）
ハーベスト	NA
ウイルス不活化 ＋ ＶＩＩ親和性クロマトグラフィー	95.4
マルチモデルまたは 混合モードクロマトグラフィー	100

【図２２】

精製ステップ	シアル酸（産物のモル／モル）
ハーベスト	NA
ウイルス不活化 ＋ ＶＩＩ親和性クロマトグラフィー	15.25
CHT	16.6
UF/DF2	16.6
UF/DF3	16.4

【配列表】

0007319187000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI	
A61K	*38/36*	*(2006.01)*	A61K	38/36
A61K	*47/64*	*(2017.01)*	A61K	47/64
A61P	*7/04*	*(2006.01)*	A61P	7/04
C07K	*16/00*	*(2006.01)*	C07K	16/00
C12N	*15/16*	*(2006.01)*	C12N	15/16
C12N	*15/12*	*(2006.01)*	C12N	15/12

(56)参考文献 米国特許出願公開第２０１６／０１６８５８８（ＵＳ，Ａ１）
特表２０１５－５０８７７１（ＪＰ，Ａ）
特開２０１５－１３４７９５（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２０１２／０２０８７５９（ＵＳ，Ａ１）
Precision Medicine，2015年，Vol.2，e989, pp.1-8

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１／００－１５／９０
Ｃ１２Ｐ　１／００－４１／００
Ｃ０７Ｋ　１／００－１９／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＰｕｂＭｅｄ