

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-149784  
(P2017-149784A)

(43) 公開日 平成29年8月31日(2017.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 38/37</b> (2006.01)	A 6 1 K 38/37	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 7/04</b> (2006.01)	A 6 1 P 7/04	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 37/06</b> (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 14/745 (2006.01)	C 0 7 K 14/745	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 144 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-114122 (P2017-114122)  
 (22) 出願日 平成29年6月9日(2017.6.9)  
 (62) 分割の表示 特願2014-552355 (P2014-552355) の分割  
 原出願日 平成25年1月12日(2013.1.12)  
 (31) 優先権主張番号 61/586,103  
 (32) 優先日 平成24年1月12日(2012.1.12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/668,961  
 (32) 優先日 平成24年7月6日(2012.7.6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 398050098  
 バイオジェン・エムエイ・インコーポレイテッド  
 Biogen MA Inc.  
 アメリカ合衆国02142マサチューセツ州ケンブリッジ、ビニー・ストリート250番  
 (71) 出願人 514177074  
 ピュージェット サウンド ブラッド センター  
 アメリカ合衆国 ワシントン 98104-1256, シアトル, テリー アベニュー 921  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 第V I I I 因子療法を受けている個体における第V I I I 因子に対する免疫原性を低下させる方法

(57) 【要約】

【課題】 第V I I I 因子療法を受けている個体における第V I I I 因子に対する免疫原性を低下させる方法を提供すること。

【解決手段】 本開示は、阻害性のFVIII免疫応答（抗F V I I I 抗体および/または細胞媒介性免疫を含む）を発症する危険性のある対象に対し、F V I I I とFcとを含むキメラ性のハイブリッド第V I I I 因子（F V I I I ）ポリペプチドを投与方法を提供する。この投与は、凝固を促進しF V I I I に対する免疫寛容を誘導するのに十分である。このキメラポリペプチドは、全長F V I I I、または欠失（例えばBドメインの完全欠失もしくは部分欠失）を含むF V I I I ポリペプチドを含んでよい。

【選択図】 図1

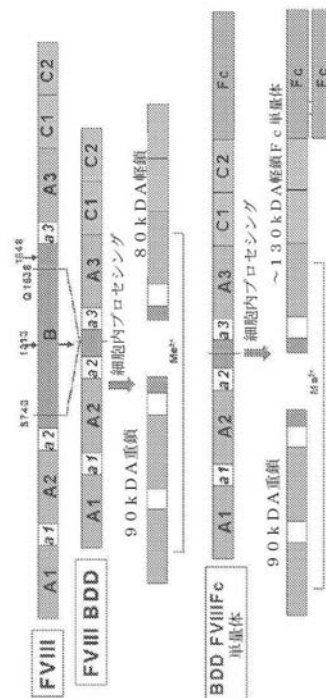


図1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

本願明細書に記載の発明。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本開示は、概して止血障害治療法分野に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

血友病 A は、第 V I I I 因子 ( F V I I I ) 遺伝子における突然変異および / または欠失に起因して F V I I I 活性欠乏となることにより引き起こされる、X 染色体連鎖性の出血性障害である ( Peyvandi, F. et al. Haemophilia 12:82-89 (2006) )。この疾患は、特発性出血と外傷後の出血多量を特徴とする。繰り返し筋肉内および関節内に徐々に出血する ( この事象は幼児期に開始することが多い ) 結果、血友病性関節症および不可逆性関節損傷が生じる。この損傷は進行性であり、重度の関節可動域制限、筋萎縮症、および慢性疼痛を引き起こすことがある ( Rodriguez-Merchan, E.C., Semin. Thromb. Hemost. 29:87-96 (2003) ) ( 参照により、この文献の全体が本明細書に組み込まれる )。

10

## 【0003】

F V I I I 分子の凝血促進活性には、A 2 ドメインが必要である。研究が示すところでは、ブタ F V I I I の凝血促進活性はヒト F V I I I の 6 倍であり ( Lollar & Parker, J. Biol. Chem. 266:12481-12486 (1991) )、ヒト F V I I I とブタ F V I I I で凝血促進活性が異なる根拠は、ヒトとブタでは、A 2 ドメインの 1 つ以上の残基間でアミノ酸配列が異なることにあると見られる ( Lollar, P., et al., J. Biol. Chem. 267:23652-23657 (1992) ) ( 参照により、この文献の全体が本明細書に組み込まれる )。

20

## 【0004】

血友病 A の治療は、特発性出血を予防するために F V I I I 活性を正常レベルの 1 ~ 5 % に回復することを目標とする補充療法により行われている ( Mannucci, P.M., et al., N. Engl. J. Med. 344:1773-1779 (2001) ) ( 参照により、この文献の全体が本明細書に組み込まれる )。

## 【0005】

出血の発症の治療 ( オンデマンド治療 ) と予防 ( 予防治療 ) には、血漿由来 F V I I I ( p d F V I I I ) 製剤および組換えヒト F V I I I ( r F V I I I ) 製剤が利用されている。r F V I I I は、血漿製剤が広範に H I V および肝炎ウイルスに汚染されたことを受けて、血液媒介病原体が伝播するリスクを低減し、F V I I I 製剤の十分な供給を確保する目的で開発された。しかしながら、現在の F V I I I 製剤は、半減期 (  $t_{1/2}$  ) が約 8 ~ 12 時間と短いため、止血保護は時間的に制限されている。このため、大部分の特発性出血発症を保護するレベルとして確立している 1 % 超に F V I I I レベルを維持するには、大部分の患者は 1 週間に 3 回または 1 日おきに予防注射を受ける必要がある。Manc o-Johnson et al., New Engl J Med. 357(6):535-44 (2007)。

30

## 【0006】

多くの研究が示すところによれば、オンデマンド治療は、高用量であっても関節症の予防には効果的でない。Aledort L. et al., J Intern Med. 236:391-399 (1994); Petrini P. et al., Am J Pediatr Hematol Oncol. 13:280-287 (1991)。多くの臨床研究で、予防的処置の利点の実証されている。Aznar J. et al., Haemophilia 6(3):170-176 (2000), Feldman B. et al., J Thromb Haemost. 4:1228-1236 (2006), Kreuz W. et al., Haemophilia 4:413-417 (1998), Liesner R. et al., B J Haem. 92:973-978 (1996), Ljung R., Haemophilia 4(4):409-412 (1998), Loefquist T, et al., J Intern Med 241:395-400 (1997), Nilsson I, et al., B. J Int Med 232:25-32 (1992), Risebrough N. et al., Haemophilia 14:743-752 (2008), Van Den Berg H. et al., Haemophilia 9(Suppl.1):27-31 (2003), Van Den Berg H. et al., Haematologica 89(6):645-650 (2004) および上記 Manco-Jo

40

50

hnson et al.は、オンデマンドで治療した小児と比べて、最初の関節出血後に一次予防を開始した小児の方が、出血と関節損傷が有意に少ないことを立証した。

【0007】

また、オンデマンド治療と比べて、予防治療の方が能力障害および入院率が低下し、学校または仕事を休む時間が減少し(Aznar J. et al., Haemophilia 6(3):170-176 (2000), Molho P. et al., Haemophilia 6(1):23-32 (2000))、患者と家族の生活の質が改善される(Coppola A. et al., Blood Transfus. 6(2): 4-11 (2008))。しかしながら、予防治療の場合、小児に中心静脈アクセスデバイスの使用を要求することが多く、介添人は感染、敗血症、および血栓症の危険にさらされる。加えて、このような利点にもかかわらず、不便さと侵襲性が一因となり、年齢と共に予防治療の受け入れとコンプライアンスが低下する(Geraghty S. et al., Haemophilia 12:75-81 (2006), Hacker M. et al., Haemophilia 7(4):392-396 (2001))。こうしたことから、長期の血漿中  $t_1/2$  を有する rFVIIII 製剤が潜在的に有益であると考えられる(Lillicrap D., Current Opinion in Hematology 17:393-397(2010))。

10

【0008】

p d F V I I I および r F V I I I の開発により実現した重要な成果は、死亡率の低下、関節損傷の予防、および生活の質の改善である。出血防止を長期化することができれば、血友病 A 患者の治療において、さらなる重要な進歩となる。しかしながら、今のところ、止血保護を長期化できる製品は開発されていない。したがって、F V I I I 欠損に起因する血友病を治療するための、現在の治療法より耐性が高く、持続時間が長く、かつ効果の高い改善された治療方法が依然として必要とされている。

20

【0009】

加えて、治療歴のない患者の 15 ~ 30% で、F V I I I 製剤の注入後に中和抗 F V I I I 抗体(阻害物質)が発生する。このような免疫応答を回避するための種々の方法が検討されている。例えば、高用量寛容プロトコル、抗 F V I I I 抗体を模倣するペプチドデコイの使用、ヒト/ブタ F V I I I ハイブリッド分子を用いた免疫認識バイパス、抗クロノタイプ抗体を用いた F V I I I 反応性 C D 4 T 細胞の中和、普遍的 C D 4 エピトープの使用、C T L A - 4 - I g または抗 C D 4 0 L の同時刺激の遮断等の手法が挙げられる。例えば Lei et al., Transfusion Medicine 105: 4865-4870 (2005) を参照のこと。寛容誘導を目的とした、免疫細胞による F V I I I の提示も研究されている。例えば Leiらは、B 細胞の I g バックボーン上に F V I I I ドメインを提示すると、抗体の抑制または減少が生じることを見出した(同文献)。加えて、Qaduraらは、未成熟樹状細胞を用いて F V I I I を寛容誘発提示すると、免疫原性が低下し得ることを見出した(Journal of Thrombosis and Haemostasis 6:2095-2104 (2008))。しかしながら、このような方法は高コストで複雑であり(例えば、F V I I I を併用した他の治療法の同時実施や、比較的単純なタンパク質でなく全細胞の投与が必要とされる)、不要な副作用および/または無能率をもたらす可能性がある。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

40

【非特許文献 1】Peyvandi, F. et al. Haemophilia(2006)12:82 ~ 89

【非特許文献 2】Rodriguez-Merchan, E.C., Semin. Thromb.Hemost.(2003)29:87 ~ 96

【非特許文献 3】Lollar & Parker, J. Biol.Chem.(1991)266:12481 ~ 12486

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

こうしたことから、抑制的応答を発症する患者において効果的な、F V I I I 欠損に起因する血友病を治療するための簡便な方法が依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

50

本開示は、免疫寛容を改善する第V I I I因子(F V I I I)の投与方法を提供する。この方法は、F V I I I部分とFc部分とを含むキメラポリペプチド(r F V I I I Fc)を、阻害性のF V I I I免疫応答を発症する危険性のある対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象は、F V I I I部分からなる同等投与量のポリペプチドを投与された場合、阻害性免疫応答を発症することになる。いくつかの実施形態では、対象は、阻害性免疫応答または阻害性のF V I I I免疫応答を発症したことがある。F V I I I部分とFc部分とを含むキメラポリペプチドを投与することは、出血状態を治療し、F V I I Iに対する免疫寛容を誘導するのに十分であり得る。この投与は予防的であり得る。いくつかの実施形態では、この投与により、特発性出血の発生率が低下し、または出血が防止される。

10

## 【0013】

この免疫応答は、抑制性の抗F V I I I抗体を含み得る。抗体力価は、少なくとも0.6ベセスダ単位(BU)、少なくとも1.0BU、または少なくとも5.0BUである。この免疫応答は、細胞媒介性の免疫応答(例えばサイトカインの放出)も含み得る。サイトカインは、例えばIL-12、IL-4、またはTNF- $\alpha$ であり得る。この免疫応答の結果として、出血傾向の増加、高F V I I I消費、F V I I I療法への無反応、F V I I I療法の効力低下、および/またはF V I I I半減期の減少といった臨床症状が生じることもある。

## 【0014】

阻害性免疫応答を発症する危険性のある対象には、F V I I I遺伝子における突然変異、欠失、または再構成を有する対象が含まれる。いくつかの実施形態では、対象は、F V I I Iタンパク質を産生しない。いくつかの実施形態では、対象は、重度の血友病を有する。いくつかの実施形態では、対象は、F V I I Iまたは別の治療用タンパク質に対する阻害性免疫応答が発症したことがある親族(例えば親、いとこ、叔母、叔父、祖父母、子、孫)を有する。いくつかの実施形態では、対象は、F V I I Iが投与されたときに免疫機能を増加させる療法を同時的に受けているか、以前に受けていた。いくつかの実施形態では、対象は、F V I I Iと併用してインターフェロン療法または抗ウイルス療法を受けている。いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答を発症する危険性のある対象は、サイトカインレベルの上昇(例えばTNF- $\alpha$ またはIL10の増加)に関連する遺伝子多型を有する。いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答を発症する危険性のある対象は、TNF- $\alpha$ -308G>A多型またはIL10Gマイクロサテライトの対立遺伝子134を有する。

20

30

## 【0015】

いくつかの実施形態では、阻害性のF V I I I免疫応答を発症する危険性のある対象は、以前にF V I I Iに曝露したことがない。いくつかの実施形態では、阻害性のF V I I I免疫応答を発症する危険性のある対象は、F V I I Iに曝露したことがある。いくつかの実施形態では、阻害性のF V I I I免疫応答を発症する危険性のある対象は、150日未満、50日未満、または20日未満のF V I I I曝露日数を有する。

## 【0016】

いくつかの実施形態では、阻害性のF V I I I免疫応答を発症する危険性のある対象は、以前にF V I I Iまたは別の治療用タンパク質に対する免疫応答を発症したことがない。いくつかの実施形態では、阻害性のF V I I I免疫応答を発症する危険性のある対象は、以前にF V I I I(pd F V I I Iもしくはr F V I I I)または別の治療用タンパク質に対する免疫応答を発症したことがある。いくつかの実施形態では、阻害性のFVIII免疫応答を発症する危険性のある対象は、以前に、F V I I I製剤、例えばADVATE(登録商標)、RECOMBINATE(登録商標)、KOGENATEFS(登録商標)、HELIXATEFS(登録商標)、XYNTHA(登録商標)/REFACTOAB(登録商標)、HEMOFIL-M(登録商標)、MONARC-M(登録商標)、MONOCLATE-P(登録商標)、HUMATE-P(登録商標)、ALPHANATE(登録商標)、KOATE-DVI(登録商標)、またはHYATE:C(登録商標)

40

50

に対する免疫応答を発症したことがある。いくつかの実施形態では、F V I I I 製剤は全長 F V I I I、成熟 F V I I I、または B ドメイン欠損 F V I I I である。

【 0 0 1 7 】

本明細書で提供する F V I I I の投与方法は、免疫寛容を誘導し得る。いくつかの実施形態では、この投与により、対象における抗 F V I I I 抗体の数、対象における抗 F V I I I 抗体の力価、および/または対象におけるサイトカイン（例えば I L - 1 2、I L - 4、または T N F）のレベルが、投与前の数、力価、またはレベルと比べて減少する。いくつかの実施形態では、この投与により、対象における抗 F V I I I 抗体の数、対象における抗 F V I I I 抗体の力価、および/または対象におけるサイトカイン（例えば I L - 1 2、I L - 4、または T N F）のレベルが、F V I I I ポリペプチドからなるポリペプチドを用いた以前の治療に起因して生じた数、力価、またはレベルと比べて減少する。いくつかの実施形態では、この投与により、対象における抗 F V I I I 抗体の数、対象における抗 F V I I I 抗体の力価、および/または対象におけるサイトカイン（例えば I L - 1 2、I L - 4、または T N F）のレベルが、F V I I I ポリペプチドからなるポリペプチドを対象に投与する結果として生じることになるであろう数、力価、またはレベルと比べて減少する。

10

【 0 0 1 8 】

上記方法は、F V I I I 部分と F c 部分とを含むキメラポリペプチドの投与を含む。F V I I I 部分は、ヒト F V I I I、全長 F V I I I、または B ドメインの完全欠失もしくは部分欠失を含む F V I I I であってよい。F V I I I 部分は、生物活性のあるポリペプチド（例えば、凝固活性を有する F V I I I ポリペプチド）であってよい。F V I I I 部分は、表 2 に示すシグナル配列を含まないアミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 2 0 ~ 1 4 5 7；配列番号 6 のアミノ酸 2 0 ~ 2 3 5 1）と少なくとも 9 0 % 同一、9 5 % 同一、または同一であってよい。また、F V I I I 部分は、表 2 に示すシグナル配列を含むアミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 1 4 5 7、または配列番号 6 のアミノ酸 1 ~ 2 3 5 1）と少なくとも 9 0 % 同一、9 5 % 同一、または同一であってよい。F c 部分は、表 2 に示す F c アミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 1 4 5 8 ~ 1 6 8 4、または配列番号 6 のアミノ酸 2 3 5 2 ~ 2 5 7 8）と同一であってよい。

20

【 0 0 1 9 】

キメラポリペプチドは、キメラポリペプチドと会合した第 2 ポリペプチドを含むハイブリッドの形態であってよい。この第 2 ポリペプチドは、本質的に F c からなるか、または F c からなっていてよい。

30

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態では、上記方法は、キメラポリペプチドを特定用量で投与することを含む。この用量は、例えば 1 0 ~ 1 0 0 I U / k g の用量、または 1 0、2 0、3 0、3 0 ~ 4 0、4 0 ~ 5 0、5 0 ~ 6 0、6 0 ~ 7 0、7 0 ~ 8 0、8 0 ~ 9 0、もしくは 9 0 ~ 1 0 0 I U / k g の用量、または 1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、もしくは 1 0 0 I U / k g の用量であってよい。

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態では、出血状態の対象に上記キメラポリペプチドを投与する。出血状態とは、例えば、出血凝固障害、関節血症、筋肉出血、口腔出血、出血、筋肉内出血、口腔内出血、外傷、頭部外傷、消化管出血、頭蓋内出血、腹腔内出血、胸腔内出血、骨折、中枢神経系出血、咽頭後隙内の出血、腹膜後隙内の出血、または腸腰筋鞘内の出血であり得る。いくつかの実施形態では、出血凝固障害は血友病 A である。

40

【 0 0 2 2 】

また、本開示は、凝固因子に対して阻害性免疫応答を発症する危険性のある対象に凝固因子を投与する方法も提供する。この方法は、凝固因子部分と F c 部分とを含むキメラポリペプチドを対象に投与することを含む。さらに、胎児である対象において、凝固因子に対する免疫寛容を誘発する方法も提供する。この方法は、凝固因子部分と F c 部分とを含

50

むキメラポリペプチドを含むポリペプチドを、胎児の母親に投与することを含む。いくつかの実施形態では、凝固因子は、F V I I 酵素前駆体、活性化F V I I、活性化可能F V I I、またはF I Xである。

【0023】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドの投与により、特発性出血の発生率が低下し、または出血が防止される。

【0024】

また、本開示は、F V I I I に対する免疫寛容を必要とする対象において、F V I I I に対する免疫寛容を誘発する方法も提供する。この方法は、F V I I I 部分とF c 部分とを含むキメラポリペプチドを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象は、阻害性のF V I I I 免疫応答を発症する危険性がある。他の実施形態では、対象は、阻害性のF V I I I 免疫応答を発症したことがある。

【0025】

さらに、F V I I I に対する阻害物質の発生を防止または抑制する方法も提供する。この方法は、免疫寛容を必要とする対象に、F V I I I 部分とF c 部分とを含むキメラポリペプチドを投与することを含む。

【0026】

また、本開示は、凝固因子に対する免疫寛容を必要とする対象において、凝固因子に対する免疫寛容を誘発する方法も提供する。この方法は、凝固因子部分とF c 部分とを含むキメラポリペプチドを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象は、抑制性の凝固因子免疫応答を発症する危険性がある。他の実施形態では、対象は、抑制性の凝固因子免疫応答を発症したことがある。いくつかの実施形態では、凝固因子部分は、第V I I 因子、第I X 因子、またはフォンウィルブランド因子を含む。

【0027】

さらに、凝固因子に対する阻害物質の発生を防止または抑制する方法も提供する。この方法は、これを必要とする対象に、凝固因子部分とF c 部分とを含むキメラポリペプチドを投与することを含む。いくつかの実施形態では、凝固因子部分は、第V I I 因子、第I X 因子、またはフォンウィルブランド因子である。

【0028】

いくつかの実施形態では、対象はヒトであり、F V I I I の投与方法は、当該対象における出血状態を治療するための方法である。いくつかの実施形態では、出血状態は血液凝固障害により引き起こされる。いくつかの実施形態では、血液凝固障害は血友病またはフォンウィルブランド病である。いくつかの実施形態では、血液凝固障害は血友病Aである。いくつかの実施形態では、対象は、予防治療またはオンデマンド治療を必要とする状態（例えば出血の発症）を有する。いくつかの実施形態では、対象は、出血性障害に罹患しているか、または上記治療が必要になると予想される患者である。

【0029】

本開示はキットも提供する。このキットは、( a )凝固因子部分と、F c 部分もしくはF c R n 結合パートナー部分と、薬学的に許容される担体と、を含むキメラポリペプチドを含む医薬組成物と、( b )凝固因子に対する免疫寛容を必要とする対象に上記組成物を投与するための指示と、を含む。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、F V I I I 部分、F V I I 部分、またはF I X 部分を含む。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、F V I I I 単量体二量体ハイブリッド、F V I I 単量体二量体ハイブリッド、またはF I X 単量体二量体ハイブリッドである。いくつかの実施形態では、上記の指示は、凝固因子に対する免疫寛容を必要とする対象を特定するための少なくとも1つのステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、免疫寛容を必要とする対象を特定するための上記ステップは、以下からなる群より選ばれる1つ以上を含む：( a )凝固因子遺伝子における突然変異または欠失を有する対象を特定すること、( b )凝固因子遺伝子における再構成を有する対象を特定すること、( c )以前に凝固因子に対する阻害性免疫応答が発症したことがある親族を有する対象を特定すること、( d )インターフェロン療法

10

20

30

40

50

を受けている対象を特定すること、(e)抗ウイルス療法を受けている対象を特定すること、(f)凝固因子をコードする遺伝子以外で、阻害性免疫応答を発症する危険性の上昇に関連する遺伝子における遺伝子突然変異を有する対象を特定すること、および(g)これらの2つ以上の組み合わせ。いくつかの実施形態では、凝固因子をコードする遺伝子以外の遺伝子の遺伝子突然変異は、以下からなる群より選ばれる1つ以上の突然変異を含む：(a)TNF- $\alpha$ の増加に関連する遺伝子多型、(b)IL10の増加に関連する遺伝子多型、(c)CTLA-4の減少に関連する遺伝子多型、(d)DR15またはDQB0602MHCクラスII分子の突然変異、および(e)これらの2つ以上の組み合わせ。

#### 【0030】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、投与後に、阻害性免疫応答のレベルを測定することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、投与後の阻害性免疫応答レベルを、投与前の阻害性免疫応答レベルと比較することをさらに含む。いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答とは、FVIIIIに対する抗体の発生である。いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答とは、サイトカインの分泌である。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

#### (項目1)

阻害性のFVIIII免疫応答を発症する危険性のある対象に第VIIII因子(FVIIII)を投与する方法であって、FVIIII部分とFc部分とを含むキメラポリペプチドを該対象に投与することを含む、方法。

#### (項目2)

前記対象は、前記FVIIII部分からなる同等投与量のポリペプチドを投与された場合、阻害性のFVIIII免疫応答を発症することになる、項目1に記載の方法。

#### (項目3)

前記対象は、阻害性のFVIIII免疫応答を発症したことがある、項目1に記載の方法。

#### (項目4)

前記投与は、出血状態を治療するのに十分である、項目1～3のいずれか一項に記載の方法。

#### (項目5)

対象においてFVIIIIに対する免疫寛容を誘発する方法であって、該対象は胎児であり、該方法は、FVIIII部分とFc部分とを含むキメラポリペプチドを含むポリペプチドを該胎児の母親に投与することを含む、方法。

#### (項目6)

前記投与は予防的である、項目1～5のいずれか一項に記載の方法。

#### (項目7)

前記免疫応答は抑制性の抗FVIIII抗体を含む、項目1～6のいずれか一項に記載の方法。

#### (項目8)

前記抗体の濃度は少なくとも0.6ベセスダ単位(BU)である、項目7に記載の方法。

#### (項目9)

前記抗体の濃度は少なくとも5ベセスダ単位(BU)である、項目8に記載の方法。

#### (項目10)

前記免疫応答は細胞媒介性の免疫応答を含む、項目1～9のいずれか一項に記載の方法。

#### (項目11)

前記細胞媒介性の免疫応答は、IL-12、IL-4、およびTNF- $\alpha$ からなる群より選ばれるサイトカインの放出を含む、項目10に記載の方法。

#### (項目12)

前記免疫応答は、出血傾向の増加、高FVIIII消費、FVIIII療法への無反応、F

10

20

30

40

50

V I I I 療法の効力低下、および F V I I I 半減期の減少からなる群より選ばれる臨床症状を含む、項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 3)

前記対象は F V I I I 遺伝子における突然変異または欠失を有する、項目 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 4)

前記対象は F V I I I 遺伝子における再構成を有する、項目 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 5)

前記対象は重度の血友病を有する、項目 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 1 6)

前記対象は、以前に阻害性の FVIII 免疫応答を発症したことがある親族を有する、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 7)

前記対象はインターフェロン療法を受けている、項目 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 8)

前記対象は抗ウイルス療法を受けている、項目 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 9)

前記対象は T N F -  $\alpha$  の増加に関連する遺伝子多型を有する、項目 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 2 0)

前記多型は T N F - 3 0 8 G > A である、項目 1 9 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記対象は I L 1 0 の増加に関連する遺伝子多型を有する、項目 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 2)

前記多型は I L 1 0 G マイクロサテライトの対立遺伝子 1 3 4 である、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記対象は 1 5 0 日未満の F V I I I 曝露日数 ( E D ) を有したことがある、項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 2 4)

前記対象は 5 0 日未満の E D を有したことがある、項目 2 3 に一項に記載の方法。

(項目 2 5)

前記対象は 2 0 日未満の E D を有したことがある、項目 2 4 に一項に記載の方法。

(項目 2 6)

前記対象は、F V I I I 以外の治療用タンパク質に対する阻害性免疫応答を発症したことがある、項目 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 7)

40

前記阻害性の FVIII 免疫応答は、A D V A T E (登録商標)、R E C O M B I N A T E (登録商標)、K O G E N A T E F S (登録商標)、H E L I X A T E F S (登録商標)、X Y N T H A / R E F A C T O A B (登録商標)、H E M O F I L - M (登録商標)、M O N A R C - M (登録商標)、M O N O C L A T E - P (登録商標)、H U M A T E - P (登録商標)、A L P H A N A T E (登録商標)、K O A T E - D V I (登録商標)、および H Y A T E : C (登録商標) からなる群より選ばれる F V I I I 製剤に応答して発症した、項目 3 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記阻害性の FVIII 免疫応答は、組換え F V I I I 製剤に応答して発症する、項目 3 に記載の方法。

50

## (項目29)

前記投与は、前記対象における抗FVIII抗体の数を、投与前の数と比べて減少させる、項目1～4または6～28のいずれか一項に記載の方法。

## (項目30)

前記投与は、前記対象における抗FVIII抗体の力価を、投与前の力価と比べて減少させる、項目1～4または6～28のいずれか一項に記載の方法。

## (項目31)

前記投与は、前記対象におけるサイトカインのレベルを、投与前のレベルと比べて減少させる、項目1～4または6～28のいずれか一項に記載の方法。

## (項目32)

前記投与は、前記対象における抗FVIII抗体の数を、以前にFVIIIポリペプチドからなるポリペプチドで治療した後の該対象における数と比べて減少させる、項目1～4または6～28のいずれか一項に記載の方法。

## (項目33)

前記投与は、前記対象における抗FVIII抗体の力価を、以前にFVIIIポリペプチドからなるポリペプチドで治療した後の該対象における力価と比べて減少させる、項目1～4または6～28のいずれか一項に記載の方法。

## (項目34)

前記投与は、前記対象におけるサイトカインのレベルを、以前にFVIIIポリペプチドからなるポリペプチドで治療した後の該対象におけるレベルと比べて減少させる、項目1～4または6～28のいずれか一項に記載の方法。

## (項目35)

前記投与は、前記対象における抗FVIII抗体の数を、FVIIIポリペプチドからなるポリペプチドを該対象に投与する結果として生じることになるであろう数と比べて減少させる、項目2～28のいずれか一項に記載の方法。

## (項目36)

前記投与は、前記対象における抗FVIII抗体の力価を、FVIIIポリペプチドからなるポリペプチドを該対象に投与する結果として生じることになるであろう力価と比べて減少させる、項目2～28のいずれか一項に記載の方法。

## (項目37)

前記投与は、前記対象におけるサイトカインのレベルを、FVIIIポリペプチドからなるポリペプチドを該対象に投与する結果として生じることになるであろうサイトカインのレベルと比べて減少させる、項目2～28のいずれか一項に記載の方法。

## (項目38)

前記サイトカインは、IL-12、IL-4、およびTNF- からなる群より選ばれる、項目31、34、または37に記載の方法。

## (項目39)

前記FVIII部分はFVIII A3ドメインを含む、項目1～38のいずれか一項に記載の方法。

## (項目40)

前記FVIII部分はヒトFVIIIを含む、項目1～38のいずれか一項に記載の方法。

## (項目41)

前記FVIII部分はBドメインの完全欠失または部分欠失を有する、項目1～38のいずれか一項に記載の方法。

## (項目42)

前記FVIII部分は、表2に示されるシグナル配列を含まないFVIIIアミノ酸配列(配列番号2のアミノ酸20～1457;配列番号6のアミノ酸20～2351)と少なくとも90%または95%同一である、項目1～38のいずれか一項に記載の方法。

## (項目43)

10

20

30

40

50

前記 F V I I I 部分は、表 2 に示されるシグナル配列を含まない F V I I I アミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 20 ~ 1457 または配列番号 6 のアミノ酸 20 ~ 2351）と同一である、項目 1 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

（項目 44）

前記 F V I I I 部分は、表 2 に示されるシグナル配列を含む F V I I I アミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 1457 または配列番号 6 のアミノ酸 1 ~ 2351）と少なくとも 90% または 95% 同一である、項目 1 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

（項目 45）

前記 F V I I I 部分は、表 2 に示されるシグナル配列を含む F V I I I アミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 1457 または配列番号 6 のアミノ酸 1 ~ 2351）と同一である、項目 1 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

10

（項目 46）

前記 F V I I I 部分は凝固活性を有する、項目 1 ~ 45 のいずれか一項に記載の方法。

（項目 47）

前記 F c 部分は、表 2 に示される F c アミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 1458 ~ 1684 または配列番号 6 のアミノ酸 2352 ~ 2578）と同一である、項目 1 ~ 46 のいずれか一項に記載の方法。

（項目 48）

前記キメラポリペプチドは、前記キメラポリペプチドと会合する第 2 ポリペプチドを含むハイブリッドの形態であり、該第 2 ポリペプチドは本質的に F c からなる、項目 1 ~ 47 のいずれか一項に記載の方法。

20

（項目 49）

前記キメラポリペプチドは 10 ~ 100 IU / kg の用量で投与される、項目 1 ~ 48 のいずれか一項に記載の方法。

（項目 50）

前記用量は 10 ~ 20、20 ~ 30、30 ~ 40、40 ~ 50、50 ~ 60、60 ~ 70、70 ~ 80、80 ~ 90、または 90 ~ 100 IU / kg である、項目 49 に記載の方法。

（項目 51）

前記用量は 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または 100 IU / kg である、項目 49 に記載の方法。

30

（項目 52）

前記対象は、出血凝固障害、関節血症、筋肉出血、口腔出血、出血、筋肉内出血、口腔内出血、外傷、頭部外傷、消化管出血、頭蓋内出血、腹腔内出血、胸腔内出血、骨折、中枢神経系出血、咽頭後隙内の出血、腹膜後隙内の出血、および腸腰筋鞘内の出血からなる群より選ばれる出血状態を有する、項目 1 ~ 51 のいずれか一項に記載の方法。

（項目 53）

前記出血凝固障害は血友病 A である、項目 52 に記載の方法。

（項目 54）

前記 F V I I I ポリペプチドは全長 F V I I I である、項目 32 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

40

（項目 55）

前記 F V I I I ポリペプチドは B ドメインの完全欠失または部分欠失を含む、項目 32 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

（項目 56）

前記投与は F V I I I に対する免疫寛容を誘導する、項目 1 ~ 55 のいずれか一項に記載の方法。

（項目 57）

凝固因子に対する阻害性免疫応答を発症する危険性のある対象に凝固因子を投与する方

50

法であって、凝固因子部分と F c 部分とを含むキメラポリペプチドを該対象に投与することを含む、方法。

(項目 5 8)

対象において凝固因子に対する免疫応答を誘発する方法であって、該対象は胎児であり、該方法は、凝固因子部分と F c 部分とを含むキメラポリペプチドを含むポリペプチドを該胎児の母親に投与することを含む、方法。

(項目 5 9)

前記凝固因子は、F V I I 酵素前駆体、活性化 F V I I、活性化可能 F V I I、または F I X である、項目 5 7 または 5 8 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記投与は、特発性出血の発生率を低下させるか、または出血を防止する、項目 1 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 1)

F V I I I に対する免疫寛容を、該免疫寛容を必要とする対象において誘発する方法であって、F V I I I 部分と F c 部分とを含むキメラポリペプチドを該対象に投与することを含む、方法。

(項目 6 2)

前記対象は、阻害性の F V I I I 免疫応答を発症する危険性がある、項目 6 1 に記載の方法。

(項目 6 3)

前記対象は、抑制性の第 V I I I 因子免疫応答を発症したことがある、項目 6 1 に記載の方法。

(項目 6 4)

F V I I I に対する阻害物質の発生を防止または抑制する方法であって、免疫寛容を必要とする対象に、F V I I I 部分と F c 部分とを含むキメラポリペプチドを投与することを含む、方法。

(項目 6 5)

凝固因子に対する免疫寛容を、該免疫寛容を必要とする対象において誘発する方法であって、凝固因子部分と F c 部分とを含むキメラポリペプチドを該対象に投与することを含む、方法。

(項目 6 6)

前記対象は、抑制性の凝固因子免疫応答を発症する危険性がある、項目 6 5 に記載の方法。

(項目 6 7)

前記対象は、抑制性の凝固因子免疫応答を発症したことがある、項目 6 5 に記載の方法。

(項目 6 8)

前記凝固因子部分は、第 V I I 因子、第 I X 因子、またはフォンウィルブランド因子を含む、項目 6 5 ~ 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 9)

凝固因子に対する阻害物質の発生を防止または抑制する方法であって、該防止または抑制を必要とする対象に、凝固因子部分と F c 部分とを含むキメラポリペプチドを投与することを含む、方法。

(項目 7 0)

前記凝固因子部分は、第 V I I 因子、第 I X 因子、またはフォンウィルブランド因子である、項目 6 9 に記載の方法。

(項目 7 1)

前記対象はヒトであり、前記 F V I I I の投与方法は、該対象における出血状態を治療するための方法である、項目 1 ~ 4、6 ~ 5 7、および 5 9 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 7 2)

前記出血状態は血液凝固障害により引き起こされる、項目 7 1 に記載の方法。

(項目 7 3)

前記血液凝固障害は血友病またはフォンウィルブランド病である、項目 7 2 に記載の方法。

(項目 7 4)

前記血液凝固障害は血友病 A である、項目 7 2 に記載の方法。

(項目 7 5)

前記対象は、予防治療またはオンデマンド治療を必要とする状態（例えば出血の発症）を有する、項目 1 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 7 6)

前記対象は、出血性障害に罹患しているか、または前記治療が必要になると予想される患者である、項目 1 ~ 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 7)

(a) 凝固因子部分と、F c 部分もしくは F c R n 結合パートナー部分を含むキメラポリペプチド、および薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物と、

(b) 前記凝固因子に対する免疫寛容を必要とする対象に前記組成物を投与するための指示と、を含む、  
キット。

(項目 7 8)

前記キメラポリペプチドは、F V I I I 部分、F V I I 部分、または F I X 部分を含む、方法 7 7 に記載のキット。

20

(項目 7 9)

前記キメラポリペプチドは、F V I I I 単量体二量体ハイブリッド、F V I I 単量体二量体ハイブリッド、または F I X 単量体二量体ハイブリッドである、項目 7 8 に記載のキット。

(項目 8 0)

前記指示は、前記凝固因子に対する免疫寛容を必要とする対象を特定するための少なくとも 1 つのステップをさらに含む、項目 7 7 ~ 7 9 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 8 1)

免疫寛容を必要とする対象を特定するための前記ステップは、以下からなる群のうちの 1 つ以上を含む、項目 8 0 に記載のキット：

30

(a) 前記凝固因子の遺伝子における突然変異または欠失を有する対象を特定すること、

(b) 前記凝固因子の遺伝子における再構成を有する対象を特定すること、

(c) 以前に前記凝固因子に対する阻害性免疫応答が発症したことがある親族を有する対象を特定すること、

(d) インターフェロン療法を受けている対象を特定すること、

(e) 抗ウイルス療法を受けている対象を特定すること、

(f) 前記凝固因子をコードする前記遺伝子以外で、阻害性免疫応答を発症する危険性の上昇に関連する遺伝子における遺伝子突然変異を有する対象を特定すること、および

40

(g) これらの 2 つ以上の組み合わせ。

(項目 8 2)

前記凝固因子をコードする前記遺伝子以外の遺伝子における前記遺伝子突然変異は、以下からなる群より選ばれる 1 つ以上の突然変異を含む、項目 8 1 に記載のキット：

(a) T N F - の増加に関連する遺伝子多型、

(b) I L 1 0 の増加に関連する遺伝子多型、

(c) C T L A - 4 の減少に関連する遺伝子多型、

(d) D R 1 5 または D Q B 0 6 0 2 M H C クラス I I 分子における突然変異、および

(e) これらの 2 つ以上の組み合わせ。

50

(項目 8 3)

前記投与の後に、阻害性免疫応答のレベルを測定することをさらに含む、項目 1 ~ 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 4)

前記投与の後の前記阻害性免疫応答レベルを、前記投与の前の前記阻害性免疫応答レベルとさらに比較する、項目 8 3 に記載の方法。

(項目 8 5)

前記阻害性免疫応答は、F V I I I に対する抗体の発生である、項目 8 4 または 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 6)

前記阻害性免疫応答はサイトカインの分泌である、項目 8 3 または 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図 1】r F V I I I F c 単量体を表す概略図である。

【図 2】図 2 A、2 B は、r F V I I I F c の非還元および還元 SDS - P A G E 分析を示す(プロセッシング済みまたは単鎖)図である。図 2 C は、L C / U V および L C / M S で分析した r F V I I I F c 構造を示す図である。

【図 3】r F V I I I - F c の生化学的特性解析を示す図である。図 3 A は、第 X 因子 ( F X ) の活性化をリン脂質小胞濃度の関数として示す。図 3 B は、F X の活性化を F X 濃度の関数として示す。図 3 C は、F X の活性化を活性化 F I X ( F I X a ) 濃度の関数として示す。

【図 4】活性化プロテイン C による切断の後の F X の活性化を示す図である。

【図 5】観察された群平均 F V I I I 活性 ( ± 標準誤差 ) 対時間のプロファイルを示す図である。プロファイル群は用量で分類され、化合物対時間でグループ化されている。図 5 A は、用量 2 5 I U / k g を用いた一段法アッセイに対応する。図 5 B は、用量 6 5 I U / k g を用いた一段法アッセイに対応する。図 5 C は、用量 2 5 I U / k g を用いた発色アッセイに対応する。図 5 D は、用量 6 5 I U / k g を用いた発色アッセイに対応する。

【図 6】観察された群平均 F V I I I 活性 ( ± 標準誤差 ) 対時間のプロファイルを、用量レベルと化合物対時間でグループ化して表示した図である。図 6 A は、一段法アッセイに対応する。図 6 B は、発色アッセイに対応する。

【図 7】血友病 A ( H e m A ) マウス尾静脈離断モデルにおける、単鎖 F V I I I F c ( S C r F V I I I F c ) のインビボの効力を示す図である。図 7 A は、F V I I I 用量と保護の間の関係を示す。単鎖 r F V I I I F c の用量を四角、プロセッシング済み r F V I I I F c の用量を丸で表示している。図 7 B は、4 . 6 μ g / k g 、 1 . 3 8 μ g / k g 、 0 . 4 6 μ g / k g の r F V I I I F c または S C r F V I I I F c を投与した後の、尾静脈離断後の生存率 ( % ) を示す。図 7 C は、r F V I I I F c 、 S C r F V I I I F c をそれぞれ 4 . 6 μ g / k g ( 黒丸、逆三角形 ) 、 1 . 3 8 μ g / k g ( 三角形、菱形 ) 、 0 . 4 6 μ g / k g ( 四角、グレーの丸 ) の用量で投与した後の、尾静脈離断後の非出血個体の割合 ( % ) を示す。

【図 8】第 1 / 2 a 相試験の試験デザインを示す図である。この試験デザインは、2 5 I U / k g ( 低用量コホート A ) 、 6 5 I U / k g ( 高用量コホート B ) のどちらかを単回静脈内投与した後の r F V I I I F c の安全性および P K を A D V A T E ( 登録商標 ) と比較することを目的とした、用量増加逐次デザインである。

【図 9】一段法による r F V I I I 活性 ( a P T T ) と発色アッセイの相関を示す図である。A d v a t e ( 登録商標 ) ( ) と r F V I I I F c ( ) を注射した後の、F V I I I 活性 ( I U / m L ) の測定結果を示す。

【図 10】低用量コホートと高用量コホートの、群平均血漿 F V I I I 活性薬物動態プロファイルを示す図である。r F V I I I F c または A d v a t e ( 登録商標 ) を単回静脈内投与した後の血漿 F V I I I 活性 ( 一段法 a P T T アッセイ ) 対時間曲線を、2 5 I U

10

20

30

40

50

/ kg (低用量コホート、 $n = 6$ ) (図10A)、65 IU/kg (高用量コホート、 $n = 10$  [Advate (登録商標)] ;  $n = 9$  [rFVIIIFc]) (図10B)のそれぞれについて示す。表示されている結果は、群平均 $\pm$ 平均値の標準誤差 (SEM) である。

【図11】Advate (登録商標) またはrFVIIIFcの注射後のFVII活性のClおよび $t_{1/2}$ に対するVWF抗原レベルの影響を示す図である。VWF抗原レベルと、Advate (登録商標) ( $R^2 = 0.5415$ 、 $p = 0.0012$ ) およびrFVIIIFc ( $R^2 = 0.5492$ 、 $p = 0.0016$ ) の体重により調節されたClとの相関関係 (図11A)、ならびにVWF抗原レベルと、Advate (登録商標) ( $R^2 = 0.7923$ 、 $p < 0.0001$ ) およびrFVIIIFc ( $R^2 = 0.6403$ 、 $p = 0.0003$ ) の $t_{1/2}$ との相関関係 (図11B)を示す。各ドットは個々の対象を表す。

【図12】Advate (登録商標) またはrFVIIIFcを注射した後のエキソピボの全血ROTEM (登録商標) 結果を、個々の対象について示した図である。25 IU/kg用量のAdvate (登録商標) およびrFVIIIFc (図12A)、65 IU/kg用量のAdvate (登録商標) およびrFVIIIFc (図12B)で処置する前と後に、対象から血液サンプルを採取した。凝固時間の測定は、 $Ca^{++}$ で開始したNA-TEMによりROTEM (登録商標) 測定器で行った。表示されている結果は、各個別サンプルに対する3回のチャンネル読み取り値からの平均 $\pm$ 平均値の標準誤差 (SEM) である。

【図13】トロンビン生成アッセイ (TGA) におけるrFVIIIFcとScFVIIIFcの活性を比較する図である。図13Aは、内因性トロンビン産生能 (ETP) を、rFVIIIFc、ScFVIIIFc、完全プロセシング済みrFVIIIFc、およびWHO標準FVII間で比較したものである。図13Bは、ピークトロンビンを、rFVIIIFc、ScFVIIIFc、完全プロセシング済みrFVIIIFc、およびWHO標準FVII間で比較したものである。

【図14】rFVIIIFc単量体を表す概略図である。rFVIIIFcは、ヒトBドメイン欠損FVIIと、ヒトIgG1由来Fcとの組換え融合であり、介在リンカー配列を持たない。

【図15】HemAマウス (図15A)、C57BL/6マウス (図15B)、FcRn KOマウス (図15C)、およびヒトFcRnトランスジェニックTg32Bマウス (図15D) において、125 IU/kgを尾静脈注射した後のrFVIIIFcとrFVIIを比較した薬物動態 (PK) プロファイルを示す図である。表示されている結果は、各時点の処置1回あたりマウス4匹から得た平均 $\pm$ 標準偏差である。PKパラメータの概算値一覧を表12に示す。

【図16】HemAマウス尾切断出血モデルにおける、rFVIIIFcとrFVIIの急性活性を比較した図である。雄性HemAマウスに24 IU/kg、72 IU/kg、または216 IU/kgのrFVIIIFcまたはrFVIIを尾静脈注射し、投与から5分後に10 mmの尾切断を行った。表示されている結果は、尾切断後30分間に渡る、各処置群20匹のマウスからの個別の中央値失血量である。ビヒクル対他の全処置群は $P < 0.05$ 、C57BL/6マウス対72 IU/kgもしくは216 IU/kgのrFVIIIFc、または216 IU/kgのrFVIIで処置したHemAマウスは $P > 0.05$ であった。

【図17】尾静脈離断 (TVT) 出血モデルにおける、rFVIIIFcとrFVIIの予防効果の比較を示す図である。ビヒクル、rFVII、もしくはrFVIIIFcの処置から24時間後、またはrFVIIIFc処置から48時間後に、雄性HemAマウスをTVTで負傷させた。図17Aは、TVT後の生存率を示す。TVTの24時間前に12 IU/kgのrFVIIIFcまたはrFVIIを与えられた動物から得た生存曲線は、ログランク検定により $P < 0.001$ であった。図17Bは、TVT後24時間以内の再出血を示す。TVTの24時間前に12 IU/kgのrFVIIIFcまたはr

10

20

30

40

50

F V I I I を与えられた動物から得た非再出血曲線は、ログランク検定により  $P = 0.002$  であった。

【図18】血友病Aのイヌにおける、r F V I I I F c と r F V I I I の全血凝固時間 (W B C T) を示す図である。イヌの正常 W B C T 範囲を大破線で示す。小破線 (20分) より上の領域は、血漿 F V I I I 活性が正常の1%未満になると予想される時点を表す。図18Aは、r F V I I I F 投与後の W B C T を示す。図18Bは、クロスオーバー試験において r F V I I I 投与に続き r F V I I I F c を投与した後の W B C T を示す。

【図19】血友病Aのイヌにおいて、静脈内投与後の薬物動態 (P K) データを r F V I I I F c と r F V I I I で比較した図である。図19Aは、E L I S A で測定した血漿中抗原濃度を示す。図19Bは、発色アッセイで測定した血漿中 F V I I I 活性を示す。r F V I I I F c は  $N = 4$ 、r F V I I I は  $N = 2$  である。

【図20】H e m A マウスの F V I I I 免疫原性を評価するための試験デザインを示す図である。0日目、7日目、14日目、21日目、および35日目に、r F V I I I F c、キメラヒト F V I I I - マウス F c、B D D - F V I I I ( X Y N T H A (登録商標))、全長 r F V I I I ( A D V A T E (登録商標))、およびビヒクル対照の静脈内 (i . v .) 投与を行った。14日目、21日目、28日目、35日目、および42日目に血液サンプルを収集した。

【図21】図20の試験デザインに従って H e m A マウスで実施した免疫原性実験における、抗 F V I I I トータル抗体個数を示す図である。図21Aは、50IU/kgの r F V I I I F c、キメラヒト F V I I I - マウス F c、B D D - F V I I I ( X Y N T H A (登録商標))、または全長 r F V I I I ( A D V A T E (登録商標)) を繰り返し静脈内投与した後の、トータル抗 F V I I I 抗体測定値に対応する。図21Bは、100IU/kgの r F V I I I F c、キメラヒト F V I I I - マウス F c、B D D - F V I I I ( X Y N T H A (登録商標))、または全長 r F V I I I ( A D V A T E (登録商標)) を繰り返し静脈内投与した後の、トータル抗 F V I I I 抗体測定値に対応する。図21Cは、250IU/kgの r F V I I I F c、キメラヒト F V I I I - マウス F c、B D D - F V I I I ( X Y N T H A (登録商標))、または全長 r F V I I I ( A D V A T E (登録商標)) を繰り返し静脈内投与した後の、トータル抗 F V I I I 抗体測定値に対応する。

【図22】用量50IU/kg、100IU/kg、および250IU/kgの r F V I I I F c、キメラヒト F V I I I - マウス F c、B D D - F V I I I ( X Y N T H A (登録商標))、全長 r F V I I I ( A D V A T E (登録商標)) を投与した後の、様々な時点の抗 F V I I I 抗体測定値を示す図である。図22Aは、14日目に収集したサンプルに対応するデータを示す。図22Bは、21日目に収集したサンプルに対応するデータを示す。図22Cは、28日目に収集したサンプルに対応するデータを示す。図22Dは、42日目に収集したサンプルに対応するデータを示す。

【図23】F V I I I に対するトータル抗体と中和抗体の間の相関関係を示す図である。

【図24】用量50IU/kg、250IU/kgの r F V I I I F c (ヒト F c を有する r F V I I I) で処置した後の抗 h F c 抗体の発生を示す図である。

【図25】市販の F V I I I と比較して r F V I I I F c に対する脾臓リンパ細胞応答を測定する試験において、H e m A マウスから脾細胞を分離して分析する実験手順を示す図である。

【図26】F A C S (蛍光標識細胞分取) を用いて細胞内サイトカイン染色を行う手順を示す図である。この手順は5色を使用する。1色は C D 4 リンパ球マーカー用、他の4色は I L 2、I L - 4、I L - 10、T N F - の各サイトカイン用である。

【図27】代表的な F A C S ドットプロット図である。図27Aは、アイソタイプ対照の細胞内サイトカイン染色に対応する。図27Bは、C D 4 マーカーと T N F - マーカーを含有する二重陽性細胞の細胞内サイトカイン染色に対応する。

【図28】C D 4 およびインターロイキン - 2 ( I L - 2) に対する、対照 (ビヒクル) を超える細胞内サイトカイン染色を示す図である。全 F V I I I 処置群およびビヒクルか

10

20

30

40

50

ら得たFACSドットプロットから、二重陽性細胞の割合(%)を決定した。ビヒクル処置群と比較することにより、FVIIIで処置したマウスの二重陽性細胞の割合(%)を得た。表示されているサンプルは、ヒトFc(hFc)を有するrFVIIIFc、マウスFc(mFc)を有するrFVIIIFc、XYNTHA(登録商標)(Xyn)、およびADVATE(登録商標)(Adv)に対応する。50IU/kgと250IU/kgの用量でFVIII処置を施した。

【図29】CD4およびTNF- $\alpha$ に対する、対照(ビヒクル)を超える細胞内サイトカイン染色を示す図である。全FVIII処置群およびビヒクルから得たFACSドットプロットから、二重陽性細胞の割合(%)を決定した。ビヒクル処置群と比較することにより、FVIIIで処置したマウスの二重陽性細胞の割合(%)を得た。表示されているサンプルは、ヒトFc(hFc)を有するrFVIIIFc、マウスFc(mFc)を有するrFVIIIFc、XYNTHA(登録商標)(Xyn)、およびADVATE(登録商標)(Adv)に対応する。50IU/kgと250IU/kgの用量でFVIII処置を施した。

10

【図30】CD4およびインターロイキン-4(IL-4)に対する、対照(ビヒクル)を超える細胞内サイトカイン染色を示す図である。全FVIII処置群およびビヒクルから得たFACSドットプロットから、二重陽性細胞の割合(%)を決定した。ビヒクル処置群と比較することにより、FVIIIで処置したマウスの二重陽性細胞の割合(%)を得た。表示されているサンプルは、ヒトFc(hFc)を有するrFVIIIFc、マウスFc(mFc)を有するrFVIIIFc、XYNTHA(登録商標)(Xyn)、およびADVATE(登録商標)(Adv)に対応する。50IU/kgと250IU/kgの用量でFVIII処置を施した。

20

【図31】CD4およびインターロイキン-10(IL-10)に対する、対照(ビヒクル)を超える細胞内サイトカイン染色を示す図である。全FVIII処置群およびビヒクルから得たFACSドットプロットから、二重陽性細胞の割合(%)を決定した。ビヒクル処置群と比較することにより、FVIIIで処置したマウスの二重陽性細胞の割合(%)を得た。表示されているサンプルは、ヒトFc(hFc)を有するrFVIIIFc、マウスFc(mFc)を有するrFVIIIFc、XYNTHA(登録商標)(Xyn)、およびADVATE(登録商標)(Adv)に対応する。50IU/kgと250IU/kgの用量でFVIII処置を施した。

30

【図32】CD4および樹状細胞マーカーPD-L1(CD274)に対する、対照(ビヒクル)を超える細胞内サイトカイン染色を示す図である。全FVIII処置群およびビヒクルから得たFACSドットプロットから、二重陽性細胞の割合(%)を決定した。ビヒクル処置群と比較することにより、FVIIIで処置したマウスの二重陽性細胞の割合(%)を得た。表示されているサンプルは、ヒトFc(hFc)を有するrFVIIIFc、マウスFc(mFc)を有するrFVIIIFc、XYNTHA(登録商標)(Xyn)、およびADVATE(登録商標)(Adv)に対応する。50IU/kgと250IU/kgの用量でFVIII処置を施した。

40

【図33】CD4および樹状細胞マーカーCD80に対する、対照(ビヒクル)を超える細胞内サイトカイン染色を示す図である。全FVIII処置群およびビヒクルから得たFACSドットプロットから、二重陽性細胞の割合(%)を決定した。ビヒクル処置群と比較することにより、FVIIIで処置したマウスの二重陽性細胞の割合(%)を得た。表示されているサンプルは、ヒトFc(hFc)を有するrFVIIIFc、マウスFc(mFc)を有するrFVIIIFc、XYNTHA(登録商標)(Xyn)、およびADVATE(登録商標)(Adv)に対応する。50IU/kgと250IU/kgの用量でFVIII処置を施した。

【図34】CD4およびTregマーカーFoxp3に対する、対照(ビヒクル)を超える細胞内サイトカイン染色を示す図である。全FVIII処置群およびビヒクルから得たFACSドットプロットから、二重陽性細胞の割合(%)を決定した。ビヒクル処置群と比較することにより、FVIIIで処置したマウスの二重陽性細胞の割合(%)を得た。

50

表示されているサンプルは、ヒトFc (hFc) を有する rFVIIIFc、マウスFc (mFc) を有する rFVIIIFc、XYNTHA (登録商標) (Xyn)、および ADVATE (登録商標) (Adv) に対応する。50 IU/kg と 250 IU/kg の用量で FVIIIFc 処置を施した。

【図35】CD4 およびTh阻害分子Tim3 に対する、対照 (ビヒクル) を超える細胞内サイトカイン染色を示す図である。全FVIIIFc 処置群およびビヒクルから得たFACSドットプロットから、二重陽性細胞の割合 (%) を決定した。ビヒクル処置群と比較することにより、FVIIIFc で処置したマウスの二重陽性細胞の割合 (%) を得た。表示されているサンプルは、ヒトFc (hFc) を有する rFVIIIFc、マウスFc (mFc) を有する rFVIIIFc、XYNTHA (登録商標) (Xyn)、および ADVATE (登録商標) (Adv) に対応する。50 IU/kg と 250 IU/kg の用量で FVIIIFc 処置を施した。

10

【図36】CD4 およびTh阻害分子CD279 (PD-1) に対する、対照 (ビヒクル) を超える細胞内サイトカイン染色を示す図である。全FVIIIFc 処置群およびビヒクルから得たFACSドットプロットから、二重陽性細胞の割合 (%) を決定した。ビヒクル処置群と比較することにより、FVIIIFc で処置したマウスの二重陽性細胞の割合 (%) を得た。表示されているサンプルは、ヒトFc (hFc) を有する rFVIIIFc、マウスFc (mFc) を有する rFVIIIFc、XYNTHA (登録商標) (Xyn)、および ADVATE (登録商標) (Adv) に対応する。50 IU/kg と 250 IU/kg の用量で FVIIIFc 処置を施した。

20

【図37】実施例13に提示されている免疫原性試験のデザインを示す図である。0日目、7日目、14日目、21日目、35日目、および53日目に、HemAマウス群にFVIIIFc (rFVIIIFc、XYNTHA (登録商標)、ADVATE (登録商標)) およびビヒクル対照を投与した。0日目、14日目、21日目、28日目、および42日目に採血した。56日目に脾臓を採取した。FVIIIFc は50 IU/kg、100 IU/kg、250 IU/kg の用量で投与した。

【図38】実施例13のマウス脾細胞の分析およびT細胞応答プロファイリングに用いた手法を示す図である。

【図39】42日目に採取した血液サンプル中の総抗FVIIIFc 抗体レベルを示す図である。50 IU/kg、100 IU/kg、250 IU/kg の用量で rFVIIIFc、BDD-rFVIIIFc (XYNTHA (登録商標))、および fl-rFVIIIFc (ADVATE (登録商標)) を投与した。

30

【図40】様々な用量のFVIIIFc (rFVIIIFc、BDD-rFVIIIFc (XYNTHA (登録商標))、fl-rFVIIIFc (ADVATE (登録商標))) で処置したHemAマウス群から取得した脾臓CD4+T細胞の細胞内サイトカイン染色を示す図である。どの図もIL-2 (左パネル) とTNF- $\alpha$  (右パネル) の結果を示す。図4Aは、用量50 IU/kg のFVIIIFc が注射されたHemAマウス群 (N=4) に対応する。図4Bは、用量100 IU/kg のFVIIIFc が注射されたHemAマウス群 (N=10) に対応する。図4Cは、用量250 IU/kg のFVIIIFc が注射されたHemAマウス群 (N=4) に対応する。

40

【図41】用量100 IU/kg の rFVIIIFc、BDD-rFVIIIFc (XYNTHA (登録商標))、または fl-rFVIIIFc (ADVATE (登録商標)) で処置したHemAマウス群から分離したCD4/CD25/Foxp3 三重陽性脾細胞の細胞内サイトカイン染色を示す図である。

【図42】100 IU/kg で処置したHemAマウス群の免疫寛容関連サイトカインに対するリアルタイムPCRを示す図である。図42AはTGF- $\beta$  の結果を示し、図42Bはインターロイキン-10の結果を示し、図42CはIL-35のIL-12aサブユニットの結果を示し、図42DはIL-35のEBI-3サブユニットの結果を示す。図42EはFoxp3の結果を示す。図42FはIL2ra/CD25の結果を示す。図42GはCTLA4の結果を示す。図42HはIDO-1の結果を示す。

50

【図43】100IU/kgで処置したマウス群のPD-L1-CD11c経路に關与する細胞のFACS分析を示す図である。脾細胞を染色して表面のCD11cとPD-L1(図43A)、あるいはCD4とPD-1(図43B)を分析した。グラフの棒は、ピヒクルを超える割合を表す(\* $p < 0.05$ 対ピヒクル、\* $p < 0.05$ 処置間、 $t$ 検定)。

【図44】HemAマウス群におけるrFVIIIFc、XYNTHA(登録商標)、ADVATE(登録商標)の免疫原性比較試験のデザインを示す図である。0日目、7日目、14日目、21日目、および35日目に、HemAマウス群に各FVIIIFc用量を投与した。0日目、14日目、21日目、28日目、および42日目に採血した。FVIIIFcは50IU/kg、100IU/kg、250IU/kgの用量で投与した。

【図45】50IU/kg用量のrFVIIIFc、BDD-FVIIIFc(XYNTHA(登録商標))、全長rFVIIIFc(ADVATE(登録商標))を投与後14日目、21日目、28日目、および42日目の抗FVIIIFc抗体の測定値、ならびに42日目の抑制抗体のレベルを示す図である。

【図46】100IU/kg用量のrFVIIIFc、BDD-FVIIIFc(XYNTHA(登録商標))、全長rFVIIIFc(ADVATE(登録商標))を投与後14日目、21日目、28日目、および42日目の抗FVIIIFc抗体の測定値、ならびに42日目の抑制抗体のレベルを示す図である。

【図47】250IU/kg用量のrFVIIIFc、BDD-FVIIIFc(XYNTHA(登録商標))、全長rFVIIIFc(ADVATE(登録商標))を投与後14日目、21日目、28日目、および42日目の抗FVIIIFc抗体の測定値、ならびに42日目の抑制抗体のレベルを示す図である。

【図48】rFVIIIFcおよびrFVIIIFcを投与した後の、FVIIIFc中和抗体力価とトータル結合抗体レベルの相関関係を示す図である。

【図49】図44のHemAマウス群におけるrFVIIIFc、XYNTHA(登録商標)、ADVATE(登録商標)の免疫原性比較試験の、T細胞応答プロファイリング要素を示す図である。53日目に追加のFVIIIFc用量をHemAマウス群に投与し、56日目に脾臓を採取した。

【図50】図50(右パネル)は、用量100IU/kgのrFVIIIFc、BDD-rFVIIIFc(XYNTHA(登録商標))、またはfl-rFVIIIFc(ADVATE(登録商標))で処置したHemAマウス群から分離したCD4/CD25/Foxp3三重陽性脾細胞の細胞内サイトカイン染色を示す図である。図50(左パネル)は、調節性T細胞の作用機構を示す図である。

【図51】rFVIIIFc免疫寛容化試験のデザインを示す図である。0日目、7日目、14日目、21日目、および35日目に、50IU/kg用量のrFVIIIFcをHemAマウス群に投与した。0日目、14日目、21日目、28日目、および42日目に採血した後、1週間の休息期間を与えた。次いで、49日目(再投与から0日目)、56日目(再投与から7日目)、63日目(再投与から14日目)、および70日目(再投与から21日目)に、250IU/kg用量のrFVIIIFcを再投与した。再投与中の63日目(再投与から14日目)、70日目(再投与から21日目)、および77日目(再投与から28日目)に採血した。

【図52】250IU/kg用量のrFVIIIFcを再投与してから14日目、21日目、および28日目のトータル抗FVIIIFc抗体の測定値を示す図である。HemAマウス群を50IU/kgのrFVIIIFcまたはピヒクル対照で前処置した。この結果は、HemAマウス群においてrFVIIIFcが免疫寛容を誘導することを示している。

【図53】FcRnによるIgGとrFVIIIFcのリサイクルを示す図である。

【図54】肝洞様毛細血管を囲む細胞型および細胞構造を示す図である。

【図55】FVIIIFcまたはrFVIIIFcを静脈内注射する前にマクロファージとクッパーをCLODROSOME(登録商標)で枯渇させる(対照としてENCAPSOME(登録商標)を投与)クリアランスアッセイのデザインを示す図である。HemA、DKO、FcRn-KOの3つのノックアウトマウスモデルを使用した。指定の時点に血液

10

20

30

40

50

サンプルを採取した（1時点あたり4サンプル）。

【図56】HemAマウス肝切片に対する、マクロファージ特異マーカの1つであるIba-1抗体を用いた代表的な染色を示す図である。パネルAとA'は、対照のENCAPSOME（登録商標）で処置したHemAマウスを示す。パネルBとB'は、CLODROSOME（登録商標）で処置したHemAマウスを示す。パネルA'とB'は、染色されたクッパー細胞、総組織領域、および空領域を強調表示する定量化マスクを示す。

【図57】CLODROSOME（登録商標）またはENCAPSOME（登録商標）で処置した後の、標識F4/80抗体で陽性染色された領域の免疫組織化学（IHC）定量分析と、同じ標識F4/80抗体で染色された血液細胞内の循環単球細胞を特定する蛍光標示式細胞分取器（FACS）分析を示す図である。

【図58】ENCAPSOME（登録商標）またはCLODROSOME（登録商標）で処置したHemAマウス群の肝臓、脾臓、および肺において、マクロファージマーカ上皮増殖因子モジュール含有ムチン様受容体1（Emr1）（F4/80）の発現をRT-PCRで分析した結果を示す図である。

【図59】対照HemAマウス群およびマクロファージ/クッパー細胞枯渇HemAマウス群における、rFVIIIFcのクリアランスを示す図である。

【図60】対照DKOマウス群（FVIIIFcとVWFが欠乏しているマウス群）およびマクロファージ/クッパー細胞枯渇DKOマウス群における、rFVIIIFcのクリアランスを示す図である。

【図61】対照FcRn-KOマウス群（FcRnリサイクリング受容体が欠乏しているマウス群）およびマクロファージ/クッパー細胞枯渇FcRn-KOマウス群における、rFVIIIFcのクリアランスを示す図である。

【図62】表示されているFVIIIFc原体または対照（未処置）で妊娠16日目に免疫された母親から産まれたマウス群のベセスダ力価を示す図である。パネルAは実験デザインを示し、処置時期、妊娠中のマウスに投与するrFVIIIFcまたはXYNTHA（登録商標）（BDD-FVIIIFc）の用量、これらのマウスから産まれる子を表示している。パネルB、Cは、rFVIIIFc処置マウス、XYNTHA（登録商標）処置マウス、対照（未処置）マウスから産まれた子から取得したrFVIIIFcのベセスダ力価を、処置コホート別にグループ化（パネルB）、または個別母親別にグループ化（パネルC）して表示している。

【図63】表示されているFVIIIFc原体または対照（未処置）で妊娠15～17日目に免疫された母親から産まれたマウス群のベセスダ力価を示す図である。パネルAは実験デザインを示し、処置時期、妊娠中のマウスに投与するrFVIIIFcまたはXYNTHA（登録商標）（BDD-FVIIIFc）の用量、これらのマウスから産まれる子を表示している。パネルB、Cは、rFVIIIFc処置マウス、XYNTHA（登録商標）処置マウス、対照（未処置）マウスから産まれた子から取得したrFVIIIFcのベセスダ力価を、処置コホート別にグループ化（パネルB）、または個別母親別にグループ化（パネルC）して表示している。

【図64】図64Aと64Bは、それぞれCD80とCD274の樹状細胞表面発現を示したものである。100IU/kgのrFVIIIFc、Bドメイン欠損FVIIIFc（BDD-FVIIIFc；XYNTHA（登録商標））、全長FVIIIFc（fl-FVIIIFc；ADVATE（登録商標））で処置したマウス群から取得した脾細胞を染色することにより、CD11c、MHCクラスIIと共にこれらの2つの抗原の発現を測定した。表示されている結果は、脾細胞数の割合（%）±標準誤差である（n=7～9、\*p<0.05対ビヒクル、†p<0.05対rFVIIIFc、t検定）。図64Cと64Dは、それぞれCD274とIDO1のmRNA発現レベルを示す。GAPDHレベルに正規化された脾細胞からのリアルタイムPCRにより測定した。グラフの棒は、相対的発現レベル（ $2^{-C_t}$ ）±標準誤差を表す（n=4～9、\*p<0.05対ビヒクル、†p<0.05対rFVIIIFc、t検定）。

【図65】3つの試験グループ（すなわち、ビヒクル、50IU/kgのrFVIIIFc

10

20

30

40

50

c、250 IU/kgのrFVIIIFcで処置したHemAマウス群の脾細胞)間のリアルタイムPCRアレイにおいて全遺伝子の発現プロファイルを表すヒートマップである。耐性に焦点を置く遺伝子とアレルギー関連分子からなるリアルタイムPCRアレイを使用することにより、各サンプルから得たcDNAを用いて個々の遺伝子の発現をモニターした。

【図66】50 IU/kgのrFVIIIFcで処置したHemAマウス群の脾細胞により上方調節または下方調節されていると特定された候補遺伝子の発現プロファイル、および250 IU/kgのrFVIIIFcで処置した群との比較を示す図である。結果は、ビヒクル群を超えた遺伝子発現の変化を示す。調節の倍率変化のカットオフは2とした。すなわち、2を超える倍率変化を上方調節とみなし、0.5を下回る倍率変化は下方調節とみなした。ここに示す50 IU/kg群に属する候補遺伝子はすべて、有意に調節されていた( $p < 0.05$ 対ビヒクルおよび250 IU/kg群、 $n = 8 \sim 11$ )。

【図67】50 IU/kgまたは250 IU/kgのrFVIIIFcを2週間おきに注射したHemAマウスのT細胞増殖プロファイル比較を示す図である。グラフの棒は、250 IU/kg群と50 IU/kg群から得たT細胞の、対照と比較した場合のCFSEのMFIの減少±標準誤差(\* $p < 0.05$ 、t検定、 $n = 3 \sim 5$ )を表す。

【図68】250 IU/kgのrFVIIIFc(図68A)、50 IU/kgのrFVIIIFc(図68B)、250 IU/kgのrFVIIIFc-N297A(図68C)、50 IU/kgのrFVIIIFc-N297A(図68D)のいずれかを2週間おきに注射したHemAマウス群から得たT細胞のIFN分泌プロファイルを示す図である。グラフの棒は、IFN分泌の対ビヒクル倍率±標準誤差を表す(\* $p < 0.05$ 、t検定、 $n = 3 \sim 5$ )。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本開示は、既知のFVII製品により可能であるものよりも長い投与間隔および/またはより大きなAUCを用いる第VII因子(FVII)(加工処理されたもの、単鎖、またはその組み合わせ)により、血友病Aを治療する方法を提供する。また、本開示は、FVIIに対する免疫寛容を誘導する方法を提供する。また、本開示は、改良されたFVIIキメラポリペプチドおよび産生方法を提供する。

【0033】

また、本明細書に開示される、免疫寛容を誘導する方法および改良されたキメラポリペプチドの産生方法は、一般的に、1つまたはそれ以上の凝固因子、例えば、FVIIおよびFIXに適用可能である。従って、FVIIキメラポリペプチド(例えば、FVIIIFc)およびこれらの使用に関する本開示は、同様に、凝固因子部分およびFc部分を含む他のキメラポリペプチドに適用可能である。いくつかの特定の実施例では、キメラポリペプチドの凝固因子部分は、FVIIまたはFIXである。この点で、本開示は、概して、凝固因子部分およびFc部分を含むキメラポリペプチドを対象に投与することを含む、それを必要とする対象において凝固因子に対する免疫寛容を誘導する方法を提供する。また、キメラポリペプチドの凝固因子に対する免疫寛容を必要とする対象に投与することを含み、キメラポリペプチドは凝固因子部分およびFc部分を含む、凝固因子に対する阻

【0034】

血友病Aの治療は、特発性出血を防止するために、1~5%の正常レベルにFVII活性の回復を目的とする補充療法によるものである(その全体において参照により本明細書に組み込まれる、Mannucci, P.M. et al., N. Engl. J. Med. 344:1773-9 (2001))。出血の発症をオンデマンドで治療すること、または、予防的な治療により出血の発症が生じるのを防止するために用いることができる、血漿由来および組換えFVII製品がある。これらの製品の短い半減期に基づいて(8~12時間)(White G.C., et al., Thromb. Haemost. 77:660-7 (1997); Morfini, M., Haemophilia 9(suppl 1):94-99; discussion 100 (2003))、治療レジメンは、通常、予防のために週に2~3回、および、オンデマ

10

20

30

40

50

ンドでの治療に関して1日に1～3回の頻繁な静脈内投与を必要とし(Manco-Johnson, M.J., et al., N. Engl. J. Med. 357:535-544 (2007))、それぞれがその全体において参照により本明細書に組み込まれる。このような頻繁な投与は、苦痛を伴うものであり、不便である。現在入手可能なF V I I I製品に関する他の主要な課題は、F V I I I治療を受けている患者における、中和する抗F V I I I抗体の発生である。阻害性のF V I I I免疫応答は、抗第V I I I因子抗体および/または細胞媒介性の免疫応答を含み得る。

**【0035】**

本開示は、阻害性のF V I I I免疫応答を発生するリスクがある、それを必要とするヒト対象(例えば、ヒト患者)に、F V I I Iを投与する方法を提供する。本方法は、F V I I I部分およびFc部分を含むキメラポリペプチドの投与を含む。

10

**【0036】**

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドの投与は、投与前の数と比較して、対象における、F V I I Iに対する抗体の数を減少させる。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、阻害性のF V I I I免疫応答を有する対象に投与され、投与は、阻害性免疫応答を減少させ得る。阻害性のF V I I I免疫応答は、阻害性抗体免疫応答および/または細胞媒介性の免疫応答であり得る。本方法に係る、本明細書で提供されるキメラポリペプチドの投与は、阻害性免疫応答を減少または中和させ得る。このように、いくつかの実施形態では、抗F V I I I抗体は、F V I I I部分およびFc部分を含むキメラポリペプチドの投与後に、対象において減少または除去される。減少は、例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の減少であり得る。

20

**【0037】**

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドの投与は、投与前の力価と比較して、対象における、F V I I Iに対する抗体の力価を減少させる。いくつかの実施形態では、抗F V I I I抗体の力価は、F V I I I部分およびFc部分を含むキメラポリペプチド投与後の対象において減少する。従って、F V I I I部分およびFc部分を含むキメラポリペプチドの投与は、ベセスダ単位(BU)で20未満、10未満、5未満、4未満、3未満、2未満、1未満、または0.6未満に阻害物質を減少させ得る。

**【0038】**

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドの投与は、投与前のレベルと比較して、対象における、サイトカインのレベルを減少させる。いくつかの実施形態では、サイトカインのレベルは、F V I I I部分およびFc部分を含むキメラポリペプチドの投与後の対象において減少する。サイトカインは、例えば、IL-12、IL-4、および/またはTNF- $\alpha$ であり得る。減少は、例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の減少であり得る。

30

**【0039】**

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、すでに阻害性のF V I I I免疫応答を発生した対象に投与される。本明細書で提供される方法による、このような対象へのキメラポリペプチドの投与は、以前の反応と比較して、免疫応答の減少をもたらし得る。このように、いくつかの実施形態では、本方法に係るキメラポリペプチドの投与後には、F V I I Iポリペプチドからなるポリペプチドの投与後に産生されるよりも、より少ない抗F V I I I抗体が、対象において産生される。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドの投与は、F V I I Iポリペプチドからなるポリペプチドによる以前の治療後の対象における数と比較して、対象におけるF V I I Iに対する抗体の数を減少させる。

40

**【0040】**

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドの投与は、F V I I Iポリペプチドからなるポリペプチドによる以前の治療後の対象における力価と比較して、対象におけるF V I I Iに対する抗体の力価を減少させる。いくつかの実施形態では、抗F V I I I抗体の力価は、F V I I Iポリペプチドからなるポリペプチドの投与後に産生されるよりも、F V I I I部分およびFc部分を含むキメラポリペプチド投与後の対象において低くなる。

50

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドの投与は、F V I I I ポリペプチドからなるポリペプチドによる以前の治療後の対象におけるレベルと比較して、対象におけるサイトカインのレベルを減少させる。いくつかの実施形態では、サイトカインのレベル（例えば、I L - 1 2、I L - 4、および/またはT N F - ）は、F V I I I ポリペプチドからなるポリペプチド投与後のレベルよりも、F V I I I 部分およびF c 部分を含むキメラポリペプチド投与後の対象において低くなる。

#### 【0041】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドの投与は、凝固因子部分からなるポリペプチドまたは凝固因子部分を含むがF c 部分を含まないポリペプチドの対象への投与からもたらされる数と比較して、対象における抗凝固因子抗体の数を減少させる。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドが、阻害性のF V I I I 免疫応答をこれまでに発生していない対象に投与される。このような対象に対するキメラポリペプチドの投与は、本明細書で提供される方法によれば、F V I I I ポリペプチドからなるポリペプチドの投与からもたらされるよりも低い免疫応答をもたらし得る。このように、いくつかの実施形態では、F V I I I ポリペプチドからなるポリペプチドの投与により産生されるよりもわずかな抗F V I I I 抗体が、本方法によるキメラポリペプチド投与後の対象において産生される。

10

#### 【0042】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドの投与は、凝固因子部分からなるポリペプチドまたは凝固因子部分を含むがF c 部分を含まないポリペプチドの対象への投与からもたらされる力価と比較して、対象における抗凝固因子抗体の力価を減少させる。いくつかの実施形態では、抗F V I I I 抗体の力価は、F V I I I ポリペプチドからなるポリペプチドの投与により産生されるよりも、F V I I I 部分およびF c 部分を含むキメラポリペプチド投与後の対象において低くなる。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドの投与は、凝固因子部分からなるポリペプチドまたは凝固因子部分を含むがF c 部分を含まないポリペプチドの対象への投与からもたらされるレベルと比較して、対象におけるサイトカイン（例えば、I L - 1 2、I L - 4、および/またはT N F - ）のレベルを減少させる。いくつかの実施形態では、サイトカインレベル（例えば、I L - 1 2、I L - 4、および/またはT N F - ）は、F V I I I ポリペプチドからなるポリペプチドの投与後よりも、F V I I I 部分およびF c 部分を含むキメラポリペプチドの投与後の対象において低くなる。

20

30

#### 【0043】

本開示の方法は、キメラポリペプチドの投与前に、( a ) 凝固因子をコードする遺伝子における突然変異または欠失を有する；( b ) 凝固因子をコードする遺伝子における再構成を有する；( c ) これまでに凝固因子に対して阻害性免疫応答を発生したことがある親族を有する；( d ) インターフェロン治療を受けている；( e ) 抗ウイルス療法を受けている；( f ) 阻害性免疫応答を発生するリスクの増加に関連する凝固因子をコードする遺伝子以外の遺伝子における遺伝子突然変異を有する；および( g ) これらの2つまたはそれ以上の組み合わせを有する、からなる群から選択される1つまたはそれ以上の特性を対象が有するということを識別することをさらに含み得る。いくつかの実施形態では、対象は、( i ) T N F - の増加に関連する遺伝子多型；( i i ) I L 1 0 の増加に関連する遺伝子多型；( i i i ) C T L A - 4 の減少に関連する遺伝子多型；( i v ) D R 1 5 またはD Q B 0 6 0 2 M H C クラスI I 分子における突然変異；および( v ) これらの2つまたはそれ以上の組み合わせ、からなる群から選択される、1つまたはそれ以上の突然変異を含む、凝固因子をコードする遺伝子以外の遺伝子に遺伝子突然変異を有する。いくつかの実施形態では、多型は、T N F - の増加に関連し、3 0 8 G > A である。いくつかの実施形態では、I L 1 0 の増加に関連する多型は、I L 1 0 G マイクロサテライトの対立遺伝子1 3 4 である。

40

#### 【0044】

また、本開示は、治療量のキメラF V I I I ポリペプチド、例えば、キメラF V I I I

50

- Fcポリペプチドまたはこのようなポリペプチドのハイブリッドを、非FV III部分（上記FV III部分からなるポリペプチド）がない、例えばFc部分がない、上記FV IIIの同等投与量で必要とされる投与間隔よりも少なくとも約1.5倍長い投与間隔で、対象に投与することを含む、それを必要とするヒト対象（例えば、ヒト患者）にFV IIIを投与する方法を提供する。また、本開示は、キメラFV IIIポリペプチドを投与することを含む、それを必要とするヒト対象における、FV III投与の投与間隔を増加させる方法に関する。

【0045】

投与間隔は、非FV III部分（上記FV III部分からなるポリペプチド）がない、例えばFc部分がない、上記FV IIIの同等投与量で必要とされる投与間隔よりも、少なくとも、約1.5から6倍長く、約1.5から5倍長く、約1.5から4倍長く、約1.5から3倍長く、または、約1.5から2倍長くすることができる。投与間隔は、非FV III部分（上記FV III部分からなるポリペプチド）がない、例えばFc部分がない、上記FV IIIの同等投与量で必要とされる投与間隔よりも、少なくとも約1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、または6倍長くすることができる。投与間隔は、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、もしくは14日ごと、またはこれらより長くすることができる。

10

【0046】

投与間隔は、少なくとも約1.5から5、1.5、2、3、4、もしくは5日、またはこれらより長くすることができる。

20

【0047】

また、本開示は、治療量のキメラFV IIIポリペプチド、例えば、キメラFV III-Fcポリペプチドまたはこのようなポリペプチドのハイブリッドを対象に投与して、非FV III部分（上記FV III部分からなるポリペプチド）がない、例えばFc部分がない、上記FV IIIの同等投与量により得られるAUCよりも少なくとも約1.25倍大きい血漿濃度-時間曲線下面積（AUC）を得ることを含む、それを必要とするヒト対象にFV IIIを投与する方法を提供する。このように、本開示は、キメラFV IIIポリペプチドを投与することを含む、それを必要とするヒト患者におけるFV III活性のAUCを増加または拡張する方法を含む。

【0048】

また、本開示は、FV IIIおよびFcを含む治療量のポリペプチドまたはこのようなポリペプチドのハイブリッドを、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、もしくは14日ごと、または、これらより長い投与間隔で、対象に対し投与することを含む、それを必要とする対象に対してFV IIIを投与する方法を提供する。

30

【0049】

本明細書に開示される方法は、予防的処置またはオンデマンドでの治療を必要とする対象で実施され得る。

【0050】

本明細書で使用される「投与する」とは、薬学的に許容される経路を介して、対象に、本明細書に開示される薬学的に許容されるFV IIIポリペプチドを与えることを意味する。投与の経路は、例えば、静脈内注射および静脈内注入のような静脈内であり得る。投与の追加の経路は、例えば、皮下、筋肉内、経口、経鼻、および肺内投与を含む。キメラポリペプチドおよびハイブリッドタンパク質は、少なくとも1つの賦形剤を含む、医薬組成物の一部として投与され得る。

40

【0051】

本明細書で使用される「血漿濃度-時間曲線下面積（AUC）」は、薬理学の分野における用語と同じであり、投与後のFV III吸収の速度と程度に基づく。AUCは、12、18、24、36、48、もしくは72時間のような特定の期間にわたって、または、曲線の傾斜に基づく外挿法を用いて無限に測定される。本明細書で特に指定がない限り、AUCは無限に測定される。AUCの測定は、単一の対象、または、平均を算出する対象

50

の個体群で行われ得る。

【0052】

本明細書で使用されるFV I I Iの「Bドメイン」は、内部アミノ酸配列の同一性およびトロンピンによるタンパク質切断の部位により定義される、当該技術分野で知られるBドメインと同じであり、例えば、全長ヒトFV I I Iの残基Ser 741 ~ Arg 1648である。他のヒトFV I I Iドメインは、以下のアミノ酸残基により定義される：A1, 残基Ala 1 ~ Arg 372；A2, 残基Ser 373 ~ Arg 740；A3, 残基Ser 1690 ~ Ile 2032；C1, 残基Arg 2033 ~ Asn 2172；C2, 残基Ser 2173 ~ Tyr 2332。A3 - C1 - C2配列は、残基Ser 1690 ~ Tyr 2332を含む。残りの配列、残基Glu 1649 ~ Arg 1689は、通常、FV I I I軽鎖活性化ペプチドと称される。また、ブタ、マウス、およびイヌFV I I Iに関するBドメインを含む、全てのドメインの境界の位置は、当該技術分野で知られている。一実施形態では、FV I I IのBドメインは欠失している（「Bドメイン欠失FV I I I」または「BDD FV I I I」）。

10

【0053】

BDD FV I I Iの例は、REFACTO（登録商標）（組換えBDD FV I I I）であり、表2A(i)におけるFV I I I部分の配列と同じ配列を有する（配列番号2のアミノ酸1 ~ 1457または20 ~ 1457）。他の実施形態では、Bドメイン欠失FV I I Iは、配列番号2のアルギニン残基773に対応する、Bドメイン欠失FV I I Iの残基754のアルギニンに対応する、未変化の細胞内プロセシング部位、または、配列番号6のアルギニン残基1667に対応する全長FV I I Iの残基1648を含む。本明細書で、配列番号を参照することなく用いられる配列残基数は、本明細書にて明示されない限り、シグナルペプチド配列（19のアミノ酸）を有しないFV I I I配列に対応する。例えば、全長FV I I IのS743 / Q1638は、19のアミノ酸シグナルペプチド配列に起因して、配列番号6のS762 / Q1657に対応する。

20

【0054】

「Bドメイン欠失FV I I I」は、その全体が参照により本明細書にそれぞれ組み込まれる、米国特許第6,316,226号、第6,346,513号、第7,041,635号、第5,789,203号、第6,060,447号、第5,595,886号、第6,228,620号、第5,972,885号、第6,048,720号、第5,543,502号、第5,610,278号、第5,171,844号、第5,112,950号、第4,868,112号、および第6,458,563号に開示される、全部または部分的な欠失を有し得る。いくつかの実施形態では、Bドメイン欠失FV I I I配列は、米国特許第6,316,226号（また、米国特許第6,346,513号）の第4欄4行目 ~ 第5欄28行目および実施例1 ~ 5に開示されるいずれか1つの欠失を含む。いくつかの実施形態では、Bドメイン欠失FV I I Iは、米国特許第5,789,203号（また、米国特許第6,060,447号、第5,595,886号、第6,228,620号）の第2欄、26 ~ 51行目および実施例5 ~ 8に開示される欠失を有する。

30

【0055】

いくつかの実施形態では、Bドメイン欠失FV I I Iは、米国特許第5,972,885号の第1欄25行目 ~ 第2欄40行目；米国特許第6,048,720号の第6欄1 ~ 22行目および実施例1；米国特許第5,543,502号の第2欄17 ~ 46行目；米国特許第5,171,844号の第4欄22行目 ~ 第5欄36行目；米国特許第5,112,950号の第2欄55 ~ 68行目、図2、および実施例1；米国特許第4,868,112号の第2欄2行目 ~ 第19欄21行目および表2；米国特許第7,041,635号の第2欄1行目 ~ 第3欄19行目、第3欄40行目 ~ 第4欄67行目、第7欄43行目 ~ 第8欄26行目、および第11欄5行目 ~ 第13欄39行目；または米国特許第6,458,563号の第4欄25 ~ 53行目に記載の欠失を有する。いくつかの実施形態では、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第91/09122号に開示されるように、Bドメイン欠失FV I I Iは、ほとんどのBドメインの欠失を有するが、

40

50

2つのポリペプチド鎖内（つまり、細胞内プロセシング部位）での一次翻訳産物の *in vivo* タンパク質プロセシングに不可欠である B ドメインのアミノ末端配列をまだ含んでいる。

【0056】

いくつかの実施形態では、B ドメイン欠失 F V I I I は、アミノ酸 747 ~ 1638 の欠失、つまり、実質的に B ドメインの完全な欠失により構築される。その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Hoeben R.C., et al. *J. Biol. Chem.* 265 (13): 7318-7323 (1990)。また、B ドメイン欠失 F V I I I は、F V I I I のアミノ酸 771 ~ 1666 またはアミノ酸 868 ~ 1562 の欠失を含み得る。その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Meulien P., et al. *Protein Eng.* 2(4): 301-6 (1988)。本開示の一部である更なる B ドメイン欠失は、例えば、982 ~ 1562 または 760 ~ 1639 (Toole et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:5939-5942 (1986))、797 ~ 1562 (Eaton et al., *Biochemistry* 25:8343-8347 (1986))、741 ~ 1646 (Kaufman (国際公開第 87/04187 号))、747 ~ 1560 (Sarver et al., *DNA* 6:553-564 (1987))、741 ~ 1648 (Pasek (国際出願第 88/00831 号))、816 ~ 1598 または 741 ~ 1689 (Lagner (Behring Inst.Mitt. (1988) No 82:16-25, EP 295597)) のアミノ酸の欠失を含み、それぞれがその全体において参照により本明細書に組み込まれる。上述の欠失のそれぞれは、あらゆる F V I I I 配列で作成され得る。

10

【0057】

一実施形態では、キメラポリペプチドにおける B ドメイン欠失 F V I I I 部分は、金属結合、重鎖を含む第 1 の鎖 (A1 - A2 - B の一部) および軽鎖を含む第 2 の鎖 (A3 - C1 - C2) により結合される (または、関連する)、2 つの鎖に加工される。他の実施形態では、B ドメイン欠失 F V I I I 部分は、単鎖 F V I I I である。単鎖 F V I I I は、B ドメイン欠失 F V I I I の残基 754 のアルギニンに対応する細胞内プロセシング部位 (配列番号 2 の残基 773) または全長 F V I I I の残基 1648 (配列番号 6 の残基 1657) を含み得る。

20

【0058】

重鎖と軽鎖間の金属結合は、当該技術分野で知られるあらゆる金属であり得る。例えば、金属は、二価金属イオンであり得る。重鎖と軽鎖を結合するために使用され得る金属は、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、または  $Cu^{2+}$  を含むが、これらに限定されない。Fatouros et al., *Intern. J. Pharm.* 155(1): 121-131 (1997); Wakabayashi et al., *JBC* 279(13): 12677-12684 (2004)。

30

【0059】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドにおける F V I I I 部分は、F V I I I の A1 ドメインを含む。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドにおける F V I I I 部分は、F V I I I の A2 ドメインを含む。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドにおける F V I I I 部分は、F V I I I の A3 ドメインを含む。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドにおける F V I I I 部分は、F V I I I の C1 ドメインを含む。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドにおける F V I I I 部分は、F V I I I の C2 ドメインを含む。

40

【0060】

本明細書で使用される「キメラポリペプチド」は、異なる供給源由来の少なくとも 2 つのポリペプチド (または、サブシーケンスもしくはペプチド) をその中に含むポリペプチドを意味する。キメラポリペプチドは、異なる遺伝子、異なる cDNA、または異なる動物もしくは他の種、のような異なる供給源からの、例えば、2、3、4、5、6、7、またはそれ以上のポリペプチドを含み得る。キメラポリペプチドは、例えば、異なるサブシーケンスを結合する 1 つまたはそれ以上のリンカーを含み得る。このように、単一のキメラポリペプチド内で、サブシーケンスは直接結合され得、もしくは、サブシーケンスは間接的にリンカーを介して結合され得、または両方である。キメラポリペプチドは、例えば、シグナル配列のような追加のポリペプチド、および、タンパク質の精製または検出にお

50

いて補助する 6 H i s および F L A G のような配列を含み得る。また、キメラポリペプチドは、N - および / または C - 末端にアミノ酸またはペプチドの追加を有し得る。

【 0 0 6 1 】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、凝固因子部分（例えば、F V I I I 部分）および非凝固因子部分（例えば、非 F V I I I 部分）を含む。例となる非凝固因子部分（例えば、非 F V I I I 部分）は、例えば、F c を含む。例となるキメラ F V I I I - F c ポリペプチドは、例えば、シグナル配列および配列番号 4（表 2）のキメラ F c ポリペプチドを有しまたは有しないで、配列番号 2 または 6（表 2）を含む。

【 0 0 6 2 】

本明細書で使用される場合、キメラポリペプチドに適用されるときの「部分」という用語は、このようなキメラポリペプチド（例えば、「F V I I I 部分および F c 部分を含むキメラポリペプチド」または「キメラポリペプチドの F V I I I 部分」）の成分または部分の 1 つを指す。つまり、「部分」という用語は、キメラポリペプチドの異なる成分の供給源を示すために用いられるが、F V I I I タンパク質の断片または F c 領域の断片を示すためには用いられない。

【 0 0 6 3 】

キメラポリペプチドは、シグナル配列を有しない表 2 A ( i ) に示される F V I I I および F c アミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 2 0 ~ 1 6 8 4）と少なくとも 9 0 % または 9 5 % 同一の配列、または、シグナル配列を有する表 2 A ( i ) に示される F V I I I および F c アミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 1 6 8 4）と少なくとも 9 0 % または 9 5 % 同一の配列を含み得、配列は F V I I I 活性を有する。F V I I I 活性は、活性化部分トロンボプラスチン時間（a P P T）分析、発色アッセイ（c h r o m o g e n i c a s s a y）、または他の既知の方法により測定され得る。キメラポリペプチドは、シグナル配列を有しない表 2 A ( i ) に示される F V I I I および F c アミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 2 0 ~ 1 6 8 4）と同じ配列、または、シグナル配列を有する表 2 A ( i ) に示される F V I I I および F c アミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 1 6 8 4）と同じ配列を含み得る。

【 0 0 6 4 】

いくつかの実施形態では、F V I I I 部分は、F V I I I A 3 ドメインを含む。いくつかの実施形態では、F V I I I 部分は、ヒト F V I I I を含む。いくつかの実施形態では、F V I I I 部分は、B ドメインの全部または部分的な欠失を有する。いくつかの実施形態では、F V I I I 部分は、シグナル配列を有しない表 2 に示される F V I I I アミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 2 0 ~ 1 4 5 7；配列番号 6 のアミノ酸 2 0 ~ 2 3 5 1）と少なくとも 9 0 % または 9 5 % 同一である。いくつかの実施形態では、F V I I I 部分は、シグナル配列を有しない表 2 に示される F V I I I アミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 2 0 ~ 1 4 5 7 または配列番号 6 のアミノ酸 2 0 ~ 2 3 5 1）と同一である。F V I I I 部分は、シグナル配列を有する表 2 に示される F V I I I アミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 1 4 5 7 または配列番号 6 のアミノ酸 1 ~ 2 3 5 1）と少なくとも 9 0 % または 9 5 % 同一である。いくつかの実施形態では、F V I I I 部分は、シグナル配列を有する表 2 に示される F V I I I アミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 1 4 5 7 または配列番号 6 のアミノ酸 1 ~ 2 3 5 1）と同一である。いくつかの実施形態では、F V I I I 部分は、凝固活性を有する。

【 0 0 6 5 】

いくつかの実施形態では、F c 部分は、表 2 に示される F c アミノ酸配列と同一である（配列番号 2 のアミノ酸 1 4 5 8 ~ 1 6 8 4 または配列番号 6 のアミノ酸 2 3 5 2 ~ 2 5 7 8）。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、キメラポリペプチドに伴って第 2 のポリペプチドを含むハイブリッドの形態であり、第 2 のポリペプチドは、実質的に F c 部分または F c R n 結合パートナーからなり、または、F c 部分または F c R n 結合パートナーからなる。

【 0 0 6 6 】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドの凝固因子部分は、第 I X 因子を含む。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドの第 I X 因子部分は、シグナル配列を有しない表 2 に示される F I X アミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 20 ~ 1457；配列番号 6 のアミノ酸 20 ~ 2351）と少なくとも 90%、95%、または 100% 同一である。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、F I X 部分および F c 部分を含む第 1 の鎖と、実質的に F c 部分からなるまたは F c 部分からなる第 2 の鎖とを含む単量体と二量体のハイブリッドである。

#### 【0067】

いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、第 V I I 因子部分を含む。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドは、F V I I 部分および F c 部分を含む第 1 の鎖と、実質的に F c 部分からなるまたは F c 部分からなる第 2 の鎖とを含む単量体と二量体のハイブリッドである。いくつかの実施形態では、F V I I 部分は、不活性の F V I I、活性化した F V I I、または活性化可能な F V I I である。

10

#### 【0068】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるキメラポリペプチドは、例えば、F V I I、F V I I a、または F I X のような、F V I I I 以外の凝固因子を含む。一例では、F V I I は、第 V I I 因子酵素前駆体（F V I I の不活性の形態）、活性化した F V I I、または活性化可能な F V I I である。他の例では、F I X は、F I X 酵素前駆体または活性化した F I X である。ポリペプチドの半減期を増加させることができる種々の非凝固因子部分が、当該技術分野で知られている。

20

#### 【0069】

いくつかの実施形態では、F V I I I 部分を含むキメラポリペプチドは、非 F V I I I 部分を有しない同じ F V I I I 部分からなるポリペプチドを超えて増加した半減期（ $t_{1/2}$ ）を有する。増加した  $t_{1/2}$  を有するキメラ F V I I I ポリペプチドは、長時間作用性の F V I I I として本明細書で言及され得る。長時間作用性のキメラ F V I I I ポリペプチドは、例えば、F c に融合した F V I I I（例えば、F V I I I F c 単量体と二量体のハイブリッドのようなハイブリッドの形態のキメラ F V I I I ポリペプチドを含む；実施例 1、図 1、および表 2 A；並びに米国特許第 7,404,956 号および米国特許第 7,348,004 号参照）と、アルブミンに融合した F V I I I を含む。

30

#### 【0070】

本明細書で使用される「培養」、「培養すること」、「培養している」は、細胞の増殖もしくは分裂を可能にするために、または、生きている状態で細胞を維持するために、*in vitro* 条件下で細胞をインキュベートすることを意味する。本明細書で使用される「培養細胞」は、*in vitro* で増殖させた細胞を意味する。

#### 【0071】

本明細書で使用される、「F V I I I」として本出願にわたって略記されている「第 V I I I 因子」は、特に指定がない限り、凝固時のその通常の役割における、機能的な F V I I I ポリペプチドを意味する。このように、F V I I I という用語は、機能的である変異体ポリペプチドを含む。F V I I I タンパク質は、ヒト、ブタ、イヌ、およびネズミ F V I I I タンパク質であり得る。背景技術の欄に記載されているように、全長のポリペプチドおよびポリヌクレオチド配列、および多くの機能的な断片、突然変異体、および修飾されたバージョンが知られている。ヒト F V I I I の例は、配列番号 2 または 6（表 2）におけるサブシーケンスとして示される。F V I I I ポリペプチドは、例えば、全長 F V I I I、N 末端に M e t が不在の全長 F V I I I、成熟した F V I I I（シグナル配列がない）、N 末端に追加の M e t を有する成熟した F V I I I、および / または B ドメインの全部もしくは部分欠失を有する F V I I I を含む。F V I I I 変異体は、部分的または全部の B ドメイン欠失を含む。

40

#### 【0072】

上述または後述されるように、非常に多くの機能的な F V I I I 変異体が知られる。さらに、F V I I I における、数百の非機能的突然変異が血友病患者で確認され、これらの

50

突然変異のF V I I I機能への影響は、置換の性質上のものよりも、F V I I Iの三次元構造内でそれらが位置するところに、より起因することが特定され(Cutler et al., Hum. Mutat. 19:274-8 (2002))、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。さらに、ヒト由来のF V I I Iおよび他の種間の比較は、機能のために必要とされそうな保存残基を特定し(Cameron et al., Thromb. Haemost. 79:317-22 (1998); US 6,251,632)、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0073】

ヒトF V I I I遺伝子は分離され、哺乳類細胞で発現され(Toole, J. J., et al., Nature 312:342-347 (1984); Gitschier, J., et al., Nature 312:326-330 (1984); Wood, W. I., et al., Nature 312:330-337 (1984); Vehar, G. A., et al., Nature 312:337-342 (1984); 国際公開第87/04187号; 国際公開第88/08035号; 国際公開第88/03558号; 米国特許第4,757,006号)、それぞれが参照によりその全体において本明細書に組み込まれ、アミノ酸配列がcDNAから推定された。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Capon et al.、米国特許第4,965,199号は、哺乳類宿主細胞におけるF V I I Iの産生およびヒトF V I I Iの精製のための、組換えDNAの方法を開示する。CHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞およびBHKC(ベビーハムスター腎臓細胞)における、ヒトF V I I Iの発現が報告されている。ヒトF V I I Iが、Bドメインの一部または全部を欠失させるために修飾され(それぞれが参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第4,994,371号および米国特許第4,868,112号)、ヒト第V因子のBドメインによるヒトF V I I IのBドメインの置換が行われている(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第5,004,803号)。ヒトF V I I IをコードするcDNA配列および予測されるアミノ酸配列は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2005/0100990号の配列番号1および2にそれぞれ示される。

【0074】

参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第5,859,204号、Lollar, J. S.は、低減された抗原性および低減された免疫活性を有するF V I I Iの機能的な突然変異体を報告する。また、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第6,376,463号、Lollar, J. S.は、低減された免疫活性を有するF V I I Iの突然変異体を報告する。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2005/0100990号、Saenko et al.は、F V I I IのA2ドメインにおける機能的な突然変異を報告する。

【0075】

いくつかの機能的なF V I I I分子は、Bドメイン欠失を含み、以下の特許、ともにBaxterに譲渡された米国特許第6,316,226号および米国特許第6,346,513号; In2Genに譲渡された米国特許第7,041,635号; Chironに譲渡された米国特許第5,789,203号、米国特許第6,060,447号、米国特許第5,595,886号、および米国特許第6,228,620号; Biovitrumに譲渡された米国特許第5,972,885号および米国特許第6,048,720号、Novo Nordiskに譲渡された米国特許第5,543,502号および米国特許第5,610,278号; Immuno Agに譲渡された米国特許第5,171,844号; Transgene S.A.に譲渡された米国特許第5,112,950号; Genetics Instituteに譲渡された米国特許第4,868,112号に開示され、それぞれが参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0076】

ブタF V I I I配列が公表され、(Toole, J. J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5939-5942(1986))、参照によりその全体が本明細書に組み込まれ、ブタ脾臓cDNAライブラリーからF V I I I配列のPCR増幅により得られた完全なブタcDNA配列が報告されている(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Healey, J. F. et al., Blood 88:4209-4214 (1996))。全てのドメイン、全てのサブユニット、および特

10

20

30

40

50

定のアミノ酸配列の置換を有するハイブリッドヒト/ブタF V I I Iは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、LollaおよびRungeによる米国特許第5,364,771号および国際公開93/20093号に開示された。最近では、ヌクレオチド、並びに、ブタF V I I IのA1およびA2ドメインの対応するアミノ酸配列、および、対応するヒトドメインに置換されたブタA1および/またはA2ドメインを有するキメラF V I I Iが、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第94/11503号で報告された。また、米国特許第5,859,204号、Lollar, J. S.は、ブタcDNAおよび推定されるアミノ酸配列を開示する。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Emoryに譲渡された米国特許第6,458,563号は、Bドメイン欠失ブタF V I I Iを開示する。

10

## 【0077】

F V I I I (または、キメラポリペプチドのF V I I I部分)は、シグナル配列を有しない表2に示されるF V I I Iアミノ酸配列(配列番号2のアミノ酸20~1457;および配列番号6のアミノ酸20~2351)と少なくとも90%または95%同一であり得、上記F V I I I部分は、F V I I I活性を有する。F V I I I (またはキメラポリペプチドのF V I I I部分)は、シグナル配列を有しない表2に示されるF V I I Iアミノ酸配列(配列番号2のアミノ酸20~1457;および配列番号6のアミノ酸20~2351)と同一であり得る。

## 【0078】

F V I I I (または、キメラポリペプチドのF V I I I部分)は、シグナル配列を有する表2に示されるF V I I Iアミノ酸配列(配列番号2のアミノ酸1~1457および配列番号6アミノ酸1~2351)と少なくとも90%または95%同一であり得、上記F V I I I部分はF V I I I活性を有する。F V I I I (または、キメラポリペプチドのF V I I I部分)は、シグナル配列を有する表2に示されるF V I I Iアミノ酸配列(配列番号2のアミノ酸1~1457および配列番号6のアミノ酸1~2351)と同じであり得る。

20

## 【0079】

いくつかの実施形態では、凝固因子は、第V I I因子酵素前駆体、活性化したF V I I (F V I I a)、もしくは活性化可能なF V I I、またはその変異体の成熟した形態である。第V I I因子(F V I I、F7;第7因子としても言及される、凝固第V I I因子、血清第V I I因子、血清プロトロンビン転化促進因子、S P C A、プロコンベルチンおよびエプタコグアルファ)は、凝固カスケードの一部であるセリンプロテアーゼである。F V I Iは、G l aドメイン、2つのE G Fドメイン(E G F - 1およびE G F - 2)、並びに、例えばキモトリプシンを有するような、セリンプロテアーゼのペプチダーゼS1ファミリーの全てのメンバーの中で高度に保存されるセリンプロテアーゼドメイン(またはペプチダーゼS1ドメイン)を含む。F V I Iは、単鎖酵素前駆体、活性化された酵素前駆体様二本鎖ポリペプチド、および十分に活性化された二本鎖形態として発生する。本明細書で使用される、「酵素前駆体様」タンパク質またはポリペプチドは、タンパク質切断により活性化されているが、例えば、活性が低いもしくは活性がないような酵素前駆体に関連する特性を示したままのタンパク質、または、タンパク質の酵素前駆体形態の立体構造に類似する立体構造を指す。例えば、組織因子に結合しない場合、2本鎖の活性化形態のF V I Iは、酵素前駆体様タンパク質であり、それは、非切断F V I I酵素前駆体に似ている立体構造を保持し、これにより、非常に低い活性を示す。組織因子への結合時に、2本鎖の活性化形態のF V I Iは、立体構造の変化が起こり、凝固因子としてのその十分な活性を得る。例となるF V I I変異体は、例えば、その酵素活性(K c a tまたはK m)の増加によりF V I Iの活性を増加させる突然変異のような、比活性が増加したものを含む。このような変異体は当該分野で記載されており、例えば、Persson et al. 2001. PN AS 98:13583; Petrovan and Ruf. 2001. J. Biol.Chem. 276:6616; Persson et al. 2001 J. Biol. Chem. 276:29195; Soejima et al.2001. J. Biol.Chem. 276:17229; Soejima et al. 2002. J. Biol. Chem. 247:49027に記載されるように、例えば、分子の突然変

30

40

50

異体の形態を含む。一実施形態では、F V I Iの変異体形態は、突然変異を含む。例となる突然変異は、V 1 5 8 D - E 2 9 6 V - M 2 9 8 Qを含む。他の実施形態では、F V I Iの変異体形態は、トリプシンの170ループ由来のアミノ酸E A S Y P G Kを有するF V I I成熟シーケンス由来のアミノ酸608 ~ 619 (170ループに対応するL Q Q S R K V G D S P N)の置換を含む。F I Xの高い比活性変異体も、当該技術分野で知られる。例えば、Simioniet al. (2009 N.E. Journal of Medicine361:1671)は、R 3 3 8 L突然変異について記載している。Chang et al. (1988 JBC 273:12089)およびPierri e t al. (2009 HumanGene Therapy 20:479)は、R 3 3 8 A突然変異について記載している。他の突然変異は当該技術分野で知られ、例えば、Zogg and Brandstetter. 2009 Stru cture 17:1669; Sichleret l al. 2003.J. Biol. Chem. 278:4121;およびSturzebecher et al. 1997.FEBS Lett412:295に開示されているものを含む。これらの参考文献の内容は、参照により本明細書において組み込まれる。酵素前駆体様形態から立体構造が変化したときに生じる完全な活性化は、結合時に発生し、補助因子組織因子となる。また、組織因子の欠損における立体構造変化をもたらす突然変異を導入し得る。従って、F V I I aへの言及は、酵素前駆体様形態、十分に活性化した二本鎖形態、または、活性化可能な形態を含む。「活性化可能な第V I I因子」は、活性化形態に変換され得る不活性形態(例えば、その酵素前駆体形態)における第V I I因子である。

#### 【0080】

いくつかの実施形態では、凝固因子は、第I X因子またはその変異体の成熟した形態である。第I X因子は415アミノ酸、単鎖血漿酵素前駆体として循環する(A.Vysotchin et al., J. Biol. Chem. 268, 8436 (1993))。F I Xの酵素前駆体は、F X I aにより、または、組織因子/F V I I a複合体により活性化される。アルギニン - アラニン145 ~ 146およびアルギニン - パリン180 ~ 181間の特定の切断は、システイン132およびシステイン289間の単一のジスルフィド結合により結合される軽鎖および重鎖をもたらす(S.Bajaj et al., Biochemistry 22, 4047 (1983))。

#### 【0081】

F I Xの構造構成は、ビタミンK依存性血液凝固タンパクF V I I、F XおよびプロテインC(前述のB. FurieおよびB. Furie)の構造構成に類似する。そのアミノ末端の約45のアミノ酸は、ガンマカルボキシグルタミン酸、またはG l a、ドメインを含む。これに、2つの表皮成長因子相同ドメイン(E G F)、活性化ペプチド、およびセリンプロテアーゼファミリーのメンバーである触媒性の「重鎖」が続く(A.Vysotchin et al., J. Biol. Chem. 268, 8436 (1993); S. Spitzer et al., Biochemical Journal 265, 219 (1990); H. Brandstetter et al., Proc. Natl.AcadSci. USA 92, 9796 (1995))。

#### 【0082】

本明細書で使用される「同等投与量」は、当該ポリペプチドの分子量からは独立している、国際単位で表されるF V I I I活性の同一の投与量を意味する。F V I I I活性の1つの国際単位(I U)は、正常なヒト血漿1ミリリットル中のF V I I Iの量と略対応している。ヨーロッパ薬局方の発色基質分析およびワンステージ凝固分析(one s t a g e c l o t t i n g a s s a y)を含む、F V I I I活性を測定するための、いくつかの分析が可能である。

#### 【0083】

本明細書で使用される「F c」は、特に指定がない限り、機能的な新生児F c受容体(F c R n)結合パートナーを意味する。F c R n結合パートナーは、F c R n結合パートナーのF c R n受容体により結果として生じる能動輸送で、F c R n受容体により特異的に結合され得るあらゆる分子である。したがって、F cという用語は、機能的であるI g G F cのあらゆる変異体を含む。F c R n受容体に結合するI g GのF c部分の領域は、X線結晶構造解析に基づいて記載されている(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Burmeister et al., Nature 372:379 (1994))。F cのF c R nとの主要な接触域は、C H 2とC H 3ドメインの接合部の近くである。F c - F c R n接触は全て単一のI g重鎖内である。F c R n結合パートナーは、例えば、I g G全体、I g GのF c断片

、および F c R n の完全な結合領域を含む I g G の他の断片を含む。主要な接触部位は、C H 2 ドメインのアミノ酸残基 2 4 8、2 5 0 ~ 2 5 7、2 7 2、2 8 5、2 8 8、2 9 0 ~ 2 9 1、3 0 8 ~ 3 1 1、および 3 1 4、並びに、C H 3 ドメインのアミノ酸残基 3 8 5 ~ 3 8 7、4 2 8、および 4 3 3 ~ 4 3 6 を含む。

【 0 0 8 4 】

免疫グロブリンもしくは免疫グロブリン断片、または領域のアミノ酸番号への言及は、全て、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Kabat et al.1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Public Health, Bethesda; MD に基づく。( F c R n 受容体は、ヒトを含むいくつかの哺乳類の種から分離されている。ヒト F c R n、ラット F c R n、およびマウス F c R n の配列が知られる ( 参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Story et al., J. Exp. Med. 180: 2377 (1994) )。F c は、免疫グロブリンのヒンジ領域を有するまたは有しない、免疫グロブリンの C H 2 および C H 3 ドメインを含み得る。例となる F c 変異体は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第 2 0 0 4 / 1 0 1 7 4 0 号および国際公開第 2 0 0 6 / 0 7 4 1 9 9 号で提供される。

10

【 0 0 8 5 】

F c ( またはキメラポリペプチドの F c 部分 ) は、1 つまたはそれ以上の突然変異および突然変異の組み合わせを含み得る。例えば、F c ( またはキメラポリペプチドの F c 部分 ) は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる Oganesyant et al., Mol. Immunol. 46:1750 (2009) に開示される、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、T 2 5 6 E、およびこれらの組み合わせ ; 参照によりその全体が本明細書に組み込まれる Vaccaro et al., Nat. Biotechnol. 23:1283 (2005) に開示される H 4 3 3 K、N 4 3 4 F、およびこれらの組み合わせ ; 参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 2 6 4 6 2 7 号の 1 ~ 2 ページ目、段落 [ 0 0 1 2 ]、並びに実施例 9 および実施例 1 0 に開示される突然変異体 ; 参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2 0 0 9 0 1 6 3 6 9 9 号の 2 ページ目、段落 [ 0 0 1 4 ] ~ [ 0 0 2 1 ] に開示される突然変異体のような、増加した半減期を付与する突然変異を含み得る。

20

【 0 0 8 6 】

また、F c ( またはキメラポリペプチドの F c 部分 ) は、例えば、以下の突然変異をも含み得る : I g G の F c 領域が、F c R n により結合されるであろう、修飾された I g G もしくは F c 断片またはその部分を産生するための突然変異誘発等に関する場所のような、よく認識された手順に従って修飾され得る。このような修飾は、例えば、F c R n 接触部位から遠く離れている修飾、並びに、F c R n に結合を保持するまたはさらに高める接触部位内の修飾を含む。例えば、以下の、ヒト I g G 1 F c ( F c y 1 ) における単一アミノ酸残基は、F c R n に関する F c 結合親和性が著しく減少することなく置換され得る : P 2 3 8 A、S 2 3 9 A、K 2 4 6 A、K 2 4 8 A、D 2 4 9 A、M 2 5 2 A、T 2 5 6 A、E 2 5 8 A、T 2 6 0 A、D 2 6 5 A、S 2 6 7 A、H 2 6 8 A、E 2 6 9 A、D 2 7 0 A、E 2 7 2 A、L 2 7 4 A、N 2 7 6 A、Y 2 7 8 A、D 2 8 0 A、V 2 8 2 A、E 2 8 3 A、H 2 8 5 A、N 2 8 6 A、T 2 8 9 A、K 2 9 0 A、R 2 9 2 A、E 2 9 3 A、E 2 9 4 A、Q 2 9 5 A、Y 2 9 6 F、N 2 9 7 A、S 2 9 8 A、Y 3 0 0 F、R 3 0 1 A、V 3 0 3 A、V 3 0 5 A、T 3 0 7 A、L 3 0 9 A、Q 3 1 1 A、D 3 1 2 A、N 3 1 5 A、K 3 1 7 A、E 3 1 8 A、K 3 2 0 A、K 3 2 2 A、S 3 2 4 A、K 3 2 6 A、A 3 2 7 Q、P 3 2 9 A、A 3 3 0 Q、A 3 3 0 S、P 3 3 1 A、P 3 3 1 S、E 3 3 3 A、K 3 3 4 A、T 3 3 5 A、S 3 3 7 A、K 3 3 8 A、K 3 4 0 A、Q 3 4 2 A、R 3 4 4 A、E 3 4 5 A、Q 3 4 7 A、R 3 5 5 A、E 3 5 6 A、M 3 5 8 A、T 3 5 9 A、K 3 6 0 A、N 3 6 1 A、Q 3 6 2 A、Y 3 7 3 A、S 3 7 5 A D 3 7 6 A、A 3 7 8 Q、E 3 8 0 A、E 3 8 2 A、S 3 8 3 A、N 3 8 4 A、Q 3 8 6 A、E 3 8 8 A、N 3 8 9 A、N 3 9 0 A、Y 3 9 1 F、K 3 9 2 A、L 3 9 8 A、S 4 0 0 A、D 4 0 1 A、D 4 1 3 A、K 4 1 4 A、R 4 1 6 A、Q 4 1 8 A、Q 4 1 9 A、N 4 2 1 A、V 4 2 2 A、S 4 2 4 A、E 4 3 0 A、N 4 3 4 A、T 4 3 7 A、Q 4 3 8 A、K 4 3 9

30

40

50

A、S440A、S444A、およびK447A。ここで、例えば、P238Aは、配置番号238のアラニンにより置換された野生型プロリンを表す。アラニンに加えて、他のアミノ酸は、上記の特定の位置で、野生型のアミノ酸を置換し得る。

#### 【0087】

突然変異は、天然のFcとは異なる、100以上のFcRn結合パートナーを発生するFc内に単独で導入され得る。さらに、2、3、またはそれ以上の個々の突然変異の組み合わせがともに導入されて、何百ものさらなるFcRn結合パートナーをもたらす。これらの突然変異のいくつかは、FcRn結合パートナーに新たな機能性を付与し得る。例えば、一実施形態は、高度に保存されるN-グリコシル化部位を取り除く、N297Aを組み入れる。この突然変異の効果は、免疫原性を低減し、これによりFcRn結合パートナーの循環半減期を高めること、および、FcRnに関する親和性を損なうことなく、FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、およびFcγRIIIAに対して結合できないFcRn結合パートナーを付与することである（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847；参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632；参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591）。

10

#### 【0088】

さらに、少なくとも3つのヒトFcガンマ受容体が、低ヒンジ領域、一般的にはアミノ酸234～237内でのIgG上の結合部位を認識すると思われる。よって、新たな機能性および潜在的に低減された免疫原性の他の例は、例えば、ヒトIgG1「ELLG」アミノ酸233～236を、IgG2「PVA」由来の対応する配列（1つのアミノ酸欠失を有する）に置換することによる、この領域の突然変異から生じ得る。このような突然変異が導入された場合に、種々のエフェクター機能を媒介するFcRI、FcRII、およびFcRIIIは、IgG1に結合しないであろうということが示されている（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ward and Ghetie, Therapeutic Immunology 2:77 (1995)；および参照によりその全体が本明細書に組み込まれるArmouret et al., Eur. J. Immunol. 29:2613 (1999)）。上記突然変異から生じる新たな機能性の更なる例として、FcRnに関する親和性が、いくつかの場合には、野生型の親和性を超えて増加し得る。この増加した親和性は、増加した「オン」（結合）速度、減少した「オフ」（解離）速度、または増加した「オン」速度および減少した「オフ」速度の両方を反映し得る。FcRnに関する増加した親和性を付与すると考えられる突然変異は、例えば、T256A、T307A、E380A、およびN434Aを含む（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Shieldset al., J. Biol. Chem. 276:6591 (2001)）。

20

30

#### 【0089】

Fc（またはキメラポリペプチドのFc部分）は、表2に示されるFcアミノ酸配列と少なくとも90%または95%同一であり得る（配列番号2のアミノ酸1458～1684または配列番号6のアミノ酸2352～2578）。Fc（またはキメラポリペプチドのFc部分）は、表2に示されるFcアミノ酸配列と同一であり得る（配列番号2のアミノ酸1458～1684および配列番号6のアミノ酸2352～2578）。

#### 【0090】

本明細書で使用される、「ハイブリッド」ポリペプチドおよびタンパク質は、キメラポリペプチドの、第2のポリペプチドとの組み合わせを意味する。ハイブリッドにおける第2のポリペプチドおよびキメラポリペプチドは、電荷 電荷または疎水性相互作用のような、タンパク質間相互作用を介して互いに関連し得る。ハイブリッドにおける第2のポリペプチドおよびキメラポリペプチドは、ジスルフィドまたは他の共有結合（複数を含む）を介して互いに関連し得る。ハイブリッドは、それぞれが参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第2004/101740号および国際公開第2006/074199号に記載される。また、それぞれが参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第7,404,956号および米国特許第7,348,004号参照。第2のポリペプチドは、同じキメラポリペプチドの第2の複製であり得、または、それは非同

40

50

一のキメラポリペプチドであり得る。例えば、図1、実施例1、および表2参照。

【0091】

一実施形態では、第2のポリペプチドは、Fcを含むポリペプチドである。他の実施形態では、キメラポリペプチドは、キメラFV I I I - Fcポリペプチド、および、例えば、介在性のリンカー配列を有しないヒトIgG1の二量体Fcドメインに融合した組換えBドメイン欠失ヒトFV I I I (BDD - rFV I I I)の単一分子からなるrFV I I I Fc組換え融合タンパク質である実施例1のハイブリッドポリペプチドのような、実質的にFcからなる第2のポリペプチドである。このハイブリッドポリペプチドは、FV I I I Fc単量体のFc融合タンパク質、FV I I I Fc単量体のハイブリッド、単量体FV I I I I Fcハイブリッド、およびFV I I I Fc単量体 - 二量体として本明細書で言

10

【0092】

ハイブリッドにおける第2のポリペプチドは、シグナル配列を含まない表2A(i i)に示されるアミノ酸配列(配列番号4のアミノ酸21~247)と少なくとも90%または95%同一の配列、または、シグナル配列を含む表2A(i i)に示されるアミノ酸配列(配列番号4のアミノ酸1~247)と少なくとも90%または95%同一の配列、を含み、または、実質的にその配列からなり得る。第2のポリペプチドは、シグナル配列を含まない表2A(i i)に示されるアミノ酸配列(配列番号4のアミノ酸21~247)と同一の配列、または、シグナル配列を含む表2A(i i)に示されるアミノ酸配列(配

20

【0093】

図1は、Bドメイン欠失FV I I I - Fcキメラポリペプチドの構造、および、Fcポリペプチドである第2のポリペプチドとのその関連を示す概略図である。このハイブリッドを得るために、ヒト組換えBドメイン欠失FV I I Iのコード配列が、FV I I I特異的ポリマーを用いて、ヒト肝臓ポリA RNA(Clontech)から逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により得られた。FV I I I配列は、FV I I Iに関する天然のシグナル配列を含む。Bドメイン欠失は、全体で2682bpの欠失に関する、セリン743(S743; 2287bp)からグルタミン1638(Q1638; 4969bp)までであった。次いで、ヒト組換えFcに関するコード配列が、Fc特異的プライマーを用いて、ヒト白血球cDNAライブラリー(Clontech)からRT-PCRにより得られた。プライマーは、Bドメイン欠失FV I I I配列が、介在性のリンカーを用いずFc配列のN末端に直接融合されるように設計された。FV I I I Fc DNA配列が、CMVプロモーターのコントロール下で、哺乳類の重発現ベクター(dual expressionベクター)pBUDCE4.1(Invitrogen)内にクローニングされた。マウスIgkシグナル配列を含む第2の同じFc配列がRT-PCRにより得られ、発現ベクターpBUDCE4.1における、第2のプロモーター、EF1の下流でクローニングされた。

30

【0094】

rFV I I I Fc発現ベクターが、リポフェクタミン2000遺伝子導入試薬(Invitrogen)を用いて、ヒト胚性腎臓293細胞(HEK293H; Invitrogen)内に遺伝子導入された。安定したクローン細胞株が、Zeocin(Invitrogen)を用いる選択により生成された。1つのクローン細胞株、3C4-22を、in vivoでの特徴づけに関するFV I I I Fcを生成するために使用した。組換えFV I I I Fcが、Biogen Idec(Cambridge, MA)で産生され、精製された(McCue et al. 2009)。上記遺伝子導入ストラテジーは、3つの製品、つまり、単量体rFV I I I Fcハイブリッド、二量体rFV I I I Fcハイブリッド、および二量体Fcを産出することが期待された。しかしながら、これらの細胞からの馴化培地で二量体rFV I I I Fcは実質的に検出されなかった。そうではなく、馴化培地は、F

40

50

c および単量体 r F V I I I F c を含んでいた。二量体 r F V I I I F c のサイズはあまりに大きく、細胞からの効率的分泌が妨げられたかもしれない。全ての3つのタンパク質が存在する場合よりも複雑はでない単量体の精製を付与したため、この結果は有益であった。これらの研究で使用された材料は、約 9 0 0 0 I U / m g の比活性を有した。

【 0 0 9 5 】

本明細書で使用される「投与間隔」は、対象に投与された複数回投与の間に経過する時間の量を意味する。投与間隔の比較は、単一の対象または対象の個体群で行われ得、その後、個体群から得られた平均が算出され得る。

【 0 0 9 6 】

キメラ F V I I I ポリペプチド、例えば、本開示のキメラ F V I I I - F c ポリペプチド ( F V I I I またはハイブリッドを含むポリペプチド ) を投与する際の投与間隔は、非 F V I I I 部分を有しない、例えば、F c 部分を有しない ( 上記 F V I I I からなるポリペプチド ) 、上記 F V I I I の同等投与量に関して必要とされる投与間隔よりも少なくとも約 1 . 5 倍長くなり得る。非 F V I I I 部分を有しない、例えば、F c 部分を有しない ( 上記 F V I I I からなるポリペプチド ) 、上記 F V I I I の同等投与量に関して必要とされる投与間隔よりも、投与間隔を少なくとも約 1 . 5 ~ 6 倍長く、約 1 . 5 ~ 5 倍長く、約 1 . 5 ~ 4 倍長く、約 1 . 5 ~ 3 倍長く、または約 1 . 5 ~ 2 倍長くすることができる。

【 0 0 9 7 】

非 F V I I I 部分を有しない、例えば、F c 部分を有しない ( 上記 F V I I I からなるポリペプチド ) 、上記 F V I I I の同等投与量に関して必要とされる投与間隔よりも、投与間隔を少なくとも約 1 . 5 、 2 、 2 . 5 、 3 、 3 . 5 、 4 、 4 . 5 、 5 、 5 . 5 、 または 6 倍長くすることができる。投与間隔を、約 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 もしくは 1 4 日ごと、またはこれらより長くすることができる。投与間隔を、少なくとも約 1 . 5 ~ 5 、 1 . 5 、 2 、 3 、 4 、 もしくは 5 日、またはこれらより長くすることができる。オンデマンドでの治療に関し、上記キメラポリペプチドまたはハイブリッドの投与間隔は、約 2 4 ~ 3 6 、 2 4 ~ 4 8 、 2 4 ~ 7 2 、 2 4 ~ 9 6 、 2 4 ~ 1 2 0 、 2 4 ~ 1 4 4 、 2 4 ~ 1 6 8 、 2 4 、 2 5 、 2 6 、 2 7 、 2 8 、 2 9 、 3 0 、 3 1 、 3 2 、 3 3 、 3 4 、 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 、 3 9 、 4 0 、 4 1 、 4 2 、 4 3 、 4 4 、 4 5 、 4 6 、 4 7 、 4 8 、 4 9 、 5 0 、 5 1 、 5 2 、 5 3 、 5 4 、 5 5 、 5 6 、 5 7 、 5 8 、 5 9 、 6 0 、 6 1 、 6 2 、 6 3 、 6 4 、 6 5 、 6 6 、 6 7 、 6 8 、 6 9 、 7 0 、 7 1 、 もしくは 7 2 時間ごとに 1 回、または、これらより長い。

【 0 0 9 8 】

一実施形態では、有効量は、2 5 ~ 6 5 I U / k g ( 2 5 、 2 6 、 2 7 、 2 8 、 2 9 、 3 0 、 3 1 、 3 2 、 3 3 、 3 4 、 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 、 3 9 、 4 0 、 4 1 、 4 2 、 4 3 、 4 4 、 4 5 、 4 6 、 4 7 、 4 8 、 4 9 、 5 0 、 5 1 、 5 2 、 5 3 、 5 4 、 5 5 、 5 6 、 5 7 、 5 8 、 5 9 、 6 0 、 6 1 、 6 2 、 6 2 、 6 4 、 または 6 5 I U / k g ) であり、投与間隔は、3 ~ 5 、 3 ~ 6 、 3 ~ 7 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 もしくは 8 日、またはそれ以上の日ごとに 1 回、または週に 3 回、または週に 3 回以下である。他の実施形態では、有効量は 6 5 I U / k g であり、投与間隔は 1 週間に 1 回、または 6 ~ 7 日ごとに 1 回である。投与量は、必要とされる限り、繰り返し投与され得る ( 例えば、少なくとも 1 0 、 2 0 、 2 8 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 5 2 、 または 5 7 週、少なくとも 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 または 1 0 年 ) 。

【 0 0 9 9 】

ある実施形態では、オンデマンドでの治療に関する有効量は、2 0 ~ 5 0 I U / K g ( 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、 2 5 、 2 6 、 2 7 、 2 8 、 2 9 、 3 0 、 3 1 、 3 2 、 3 3 、 3 4 、 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 、 3 9 、 4 0 、 4 1 、 4 2 、 4 3 、 4 4 、 4 5 、 4 6 、 4 7 、 4 8 、 4 9 、 または 5 0 I U / k g ) である。オンデマンドでの治療は、1 回の投与または繰り返し投与であり得る。繰り返し投与に関し、投与間隔は、1 2 ~ 2 4 時間ごと、2 4 ~ 3 6 時間ごと、2 4 ~ 4 8 時間ごと、3 6 ~ 4 8 時間ごと、または 4 8 ~ 7

10

20

30

40

50

2時間ごとであり得る。よって、「繰り返し投与」という用語は、ある期間にわたって1回の投与よりも多い投与を指す。「繰り返し投与」計画下で投与された投与量は、「繰り返す投与」を指す。いくつかの実施形態では、繰り返す投与のそれぞれは、少なくとも約12時間、少なくとも約24時間、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約4日、少なくとも約5日、少なくとも約6日、少なくとも約7日、少なくとも約8日、少なくとも約9日、少なくとも約10日、少なくとも約11日、少なくとも約12日、少なくとも約13日、少なくとも約14日、または少なくとも約15日により、他から隔てられている。いくつかの実施形態では、繰り返す投与は、少なくとも約2回の投与、少なくとも約5回の投与、少なくとも約10回の投与、少なくとも約20回の投与、少なくとも約25回の投与、少なくとも約30回の投与、少なくとも約35回の投与、少なくとも約40回の投与、少なくとも約45回の投与、少なくとも約50回の投与、少なくとも約55回の投与、少なくとも約60回の投与、少なくとも約65回の投与、または少なくとも約70回の投与、を含む。繰り返す投与は、約2回の投与～約100回の投与、約5回の投与～約80回の投与、約10回の投与～約70回の投与、約10回の投与～約60回の投与、約10回の投与～約50回の投与、約15回の投与～約40回の投与、約15回の投与～約30回の投与、約20回の投与～約30回の投与、または約20回の投与～約40回の投与、を含む。繰り返す投与は、約2回の投与、約5回の投与、約10回の投与、約15回の投与、約20回の投与、約25回の投与、約30回の投与、約35回の投与、約40回の投与、約45回の投与、約50回の投与、約55回の投与、約60回の投与、約65回の投与、約70回の投与、約75回の投与、約80回の投与、約90回の投与、または約100回の投与を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0100】

いくつかの実施形態では、繰り返す投与の後に、対象は、さらに、凝固因子を含むがFc部分を含まない、凝固因子タンパク質を含む医薬組成物を投与される。この凝固因子は、全長または成熟した凝固因子であり得る。いくつかの実施形態では、このような凝固因子は、ADVATE（登録商標）、RECOMBINATE（登録商標）、KOGENATE FS（登録商標）、HELIXATE FS（登録商標）、XYNTHA（登録商標）/REFACTO AB（登録商標）、HEMOFIL-M（登録商標）、MONARC-M（登録商標）、MONOCLATE-P（登録商標）、HUMATE-P（登録商標）、ALPHANATE（登録商標）、KOATE-DVI（登録商標）、およびHYATE：C（登録商標）であり得る。

#### 【0101】

「長時間作用性の」および「持続性の」という用語は、本明細書で互換的に用いられる。「持続性の凝固因子」または「長時間作用性の凝固因子」（例えば、長時間作用性のFVII、長時間作用性のFVII、および長時間作用性のFIX）は、例えばFVII、FVII、またはFIXのような参照凝固因子を超える、増加した半減期（また、本明細書で $t_{1/2}$ 、 $t_{1/2}$  ベータ、排泄半減期、およびHLとして言及される）を有するFVII、FVII、またはFIXのような凝固因子である。「より長い」FVII活性は、当該技術分野におけるあらゆる既知の方法、例えば、aPTT分析、発色アッセイ、ROTEM、TGA等により測定され得る。一実施形態では、「より長い」FVII活性は、 $T_{1/2}$  ベータ（活性）により示され得る。他の実施形態では、「より長い」FVII活性は、血漿中に存在するFVII抗原のレベルにより、例えば、 $T_{1/2}$  ベータ（抗原）により示され得る。他の実施形態では、長時間作用性のまたは持続性のFVIIポリペプチドは、野生型FVIIポリペプチド、REFACTO（登録商標）、またはADVATE（登録商標）と比較して、凝固カスケードにおいてより長く機能し、例えば、より長い期間作用している。長時間作用性凝固因子、例えば、長時間作用性のFVIIの増加した半減期は、例えば、Fcのような、1つまたはそれ以上の非凝固因子ポリペプチドへの融合に起因し得る。増加した半減期は、例えば、ペグ化のような、1つまたはそれ以上の修飾に起因し得る。例となる長時間作用性凝固因子（例えば、長時間作用性のFVIIポリペプチド）は、例えば、キメラ凝固因子（例えば、Fcを含む

キメラF V I I Iポリペプチド)、およびアルブミンを含むキメラ凝固因子(例えば、アルブミンを含むキメラF V I I Iポリペプチド)を含む。追加的な例示の長時間作用性の凝固因子(例えば、長時間作用性のF V I I Iポリペプチド)は、例えば、ペグ化凝固因子を含む(例えば、ペグ化F V I I I)。

【0102】

「参照」ポリペプチドは、例えば、長時間作用性のキメラ凝固因子(例えば、長時間作用性キメラF V I I Iポリペプチド)の場合、実質的にキメラポリペプチドの凝固因子部分からなるポリペプチドである。例えば、長時間作用性F V I I Iの場合、参照ポリペプチドは、キメラポリペプチドのF V I I I部分、例えば、Fc部分を有しないまたはアルブミンを有しない、同じF V I I I部分である。同様に、修飾されたF V I I Iの場合における参照ポリペプチドは、修飾がない同じF V I I I、例えば、ペグ化を有しないF V I I Iである。

10

【0103】

いくつかの実施形態では、長時間作用性F V I I Iは、対象に投与した場合に、1つまたはそれ以上の以下の特性を有する：

上記対象における、約14~41.3時間の平均滞留時間(MRT)(活性)；

上記対象における、約1.22~5.19 mL/時間/kgまたはそれ未満のクリアランス(CL)(活性)；

上記対象における、約11~26.4時間の $t_{1/2}$ ベータ(活性)；

上記対象における、IU/kgあたり約1.38~2.88 IU/dLの増分回収率(20  
incremental recovery)(K値)(活性；観察値)；

上記対象における、約37.7~79.4 mL/kgの $V_{ss}$ (活性)；

上記対象における、IU/kgあたり約19.2~81.7 IU\*h/dL AUC/投与。

20

【0104】

いくつかの実施形態では、長時間作用性のF V I I Iは、患者の個体群に投与した場合に、1つまたはそれ以上の以下の特性を有する：

IU/kgあたり1.38 IU/dLより高い平均増分回収率(K値)(活性；観察値)；

IU/kgあたり、少なくとも約1.5、少なくとも約1.85、または少なくとも約30  
2.46 IU/dLの平均増分回収率(K値)(活性；観察値)；

上記患者の個体群における、約2.33±1.08 mL/時間/kgまたはそれ未満の平均クリアランス(CL)(活性)；

上記患者の個体群における、約1.8~2.69 mL/時間/kgの平均クリアランス(CL)(活性)；

上記患者の個体群における、修飾がない上記F V I I Iを含むポリペプチドの約65%のクリアランスである平均クリアランス(CL)(活性)；

上記患者の個体群における、少なくとも約26.3±8.33時間の平均の平均滞留時間(MRT)(活性)；

上記患者の個体群における、約25.9~26.5時間の平均(MRT)(活性)；

40

上記患者の個体群における、修飾がない上記F V I I Iを含むポリペプチドの平均MRTよりも約1.5倍長い平均(MRT)(活性)；

上記患者の個体群における、約18.3±5.79時間の平均 $t_{1/2}$ ベータ(活性)；

上記患者の個体群における、約18~18.4時間である平均 $t_{1/2}$ ベータ(活性)；

上記患者の個体群における、修飾がない上記F V I I Iを含むポリペプチドの平均 $t_{1/2}$ ベータよりも約1.5倍長い平均 $t_{1/2}$ ベータ(活性)；

上記患者の個体群における、IU/kgあたりの約2.01±0.44 IU/dL平均増分回収率(K値)(活性；観察値)；

50

上記患者の個体群における、IU/kgあたり約1.85~2.46 IU/dLの平均増分回収率(K値)(活性;観察値);

上記患者の個体群における、修飾がない上記FVIIを含むポリペプチドの平均増分回収率の約90%である平均増分回収率(K値)(活性;観察値);

上記患者の個体群における、約55.1±12.3 mL/kgの平均 $V_{ss}$ (活性);

上記患者の個体群における、約45.3~56.1 mL/kgの平均 $V_{ss}$ (活性);

上記患者の個体群における、IU/kgあたりの約49.9±18.2 IU\* h/dLの平均AUC/投与量(活性);

上記患者の個体群における、IU/kgあたりの約44.8~57.6 IU\* h/dLの平均AUC/投与量(活性)。

10

#### 【0105】

他の実施形態では、長時間作用性のFVIIは、患者の個体群に投与した場合に、1つまたはそれ以上の以下の特性を有する:

キメラポリペプチドで投与された上記対象における $C_{max}$ —OBSは、ワンステージ(aPTT)分析またはツーステージ(two stage)(色素生産性)分析により測定した際、全長の、成熟したFVIIからなる、同じ量のポリペプチドで投与された対象における $C_{max}$ —OBSと同等である;

約25 IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ(aPTT)分析により測定して、約60.5 IU/dL、約60.5±1 IU/dL、約60.5±2 IU/dL、約60.5±3 IU/dL、約60.5±4 IU/dL、約60.5±5 IU/dL、約60.5±6 IU/dL、約60.5±7 IU/dL、約60.5±8 IU/dL、約60.5±9 IU/dL、もしくは約60.5±10 IU/dLの対象における $C_{max}$ —OBS;

20

約25 IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ(aPTT)分析により測定して、約53.1~69 IU/dLの対象における $C_{max}$ —OBS;

約65 IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ(aPTT)分析により測定して、約119 IU/dL、約119±1 IU/dL、約119±2 IU/dL、約119±3 IU/dL、約119±4 IU/dL、約119±5 IU/dL、約119±6 IU/dL、約119±7 IU/dL、約119±8 IU/dL、約119±9 IU/dL、約119±10 IU/dL、約119±11 IU/dL、約119±12 IU/dL、約119±13 IU/dL、約119±14 IU/dL、約119±15 IU/dL、約119±16 IU/dL、約119±17 IU/dL、もしくは約119±18 IU/dLの対象における $C_{max}$ —OBS;

30

約65 IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ(aPTT)分析により測定して、約103~136 IU/dLの対象における $C_{max}$ —OBS;

約25 IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ(色素生産性)分析により測定して、約76.5 IU/dL、約76.5±1 IU/dL、約76.5±2 IU/dL、約76.5±3 IU/dL、約76.5±4 IU/dL、約76.5±5 IU/dL、約76.5±6 IU/dL、約76.5±7 IU/dL、約76.5±8 IU/dL、約76.5±9 IU/dL、約76.5±10 IU/dL、約76.5±11 IU/dL、約76.5±12 IU/dL、約76.5±13 IU/dL、約76.5±14 IU/dL、もしくは約76.5±15 IU/dLの対象における $C_{max}$ —OBS;

40

約25 IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ(色素生産性)分析により測定して、約64.9~90.1 IU/dLの対象における $C_{max}$ —OBS;

約65 IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ(色素生産性)分析により測定して、約182 IU/dL、約182±2 IU/dL、約182±4 IU/dL、約182±6 IU/dL、約182±8 IU/dL、約182±10 IU/dL、約182±12 IU/dL、約182±14 IU/dL、約182±16 IU/dL、約182±18 IU/dL、もしくは約182±20 IU/dLの対象における $C_{max}$ —OBS;または

50

約 65 IU/kg キメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ（色素生産性）分析により測定して、約 146 ~ 227 IU/dL、約 146 ± 5 IU/dL、約 146 ± 10 IU/dL、約 227 ± 5 IU/dL、もしくは約 146 ± 10 IU/dL の対象における  $C_{max}$ —OBS。

【0106】

ある実施形態では、長時間作用性の FVII は、患者の個体群に投与した場合に、1 つまたはそれ以上の以下の特性を有する：

ワンステージ（aPTT）分析またはツーステージ（色素生産性）分析により測定した場合に、全長の、成熟した FVII からなる、同じ量のポリペプチドで投与された対象における  $t_{1/2}$  ベータ（活性）より、少なくとも 1.48、1.49、1.50、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、1.57、1.58、1.59、1.60、1.61、1.62、1.63、1.64、1.65、1.66、1.67、1.68、1.69、1.70、1.71、1.72、1.73、1.74、1.75、1.76、1.77、1.78、1.79、1.80、1.81、1.82、1.83、1.84、1.85、1.86、1.87、1.88、1.89、または 1.90 倍高い、上記対象における  $t_{1/2}$  ベータ（活性）；

ワンステージ（aPTT）分析により測定して、約 18.8 時間、18.8 ± 1 時間、18.8 ± 1 時間、18.8 ± 2 時間、18.8 ± 3 時間、18.8 ± 4 時間、18.8 ± 5 時間、18.8 ± 6 時間、18.8 ± 7 時間、18.8 ± 8 時間、18.8 ± 9 時間、18.8 ± 10 時間、もしくは 18.8 ± 11 時間の上記対象における  $t_{1/2}$  ベータ（活性）；

ワンステージ（aPTT）分析により測定した、約 14.3 ~ 24.5 時間の上記対象における  $t_{1/2}$  ベータ（活性）；

ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、約 16.7 時間、16.7 ± 1 時間、16.7 ± 2 時間、16.7 ± 3 時間、16.7 ± 4 時間、16.7 ± 5 時間、16.7 ± 6 時間、16.7 ± 7 時間、16.7 ± 8 時間、16.7 ± 9 時間、16.7 ± 10 時間、もしくは 16.7 ± 11 時間の上記対象における  $t_{1/2}$  ベータ（活性）；

ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、約 13.8 ~ 20.1 時間の上記対象における  $t_{1/2}$  ベータ（活性）；

ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、約 19.8 時間、19.8 ± 1 時間、19.8 ± 2 時間、19.8 ± 3 時間、19.8 ± 4 時間、19.8 ± 5 時間、19.8 ± 6 時間、19.8 ± 7 時間、19.8 ± 8 時間、19.8 ± 9 時間、19.8 ± 10 時間、もしくは 19.8 ± 11 時間の上記対象における  $t_{1/2}$  ベータ（活性）；または

ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、約 14.3 ~ 27.5 時間の上記対象における  $t_{1/2}$  ベータ（活性）。

【0107】

ある実施形態では、長時間作用性の FVII は、患者の個体群に投与した場合に、1 つまたはそれ以上の以下の特性を有する：

ワンステージ（aPTT）分析またはツーステージ（色素生産性）分析により測定した場合に、全長の、成熟した FVII からなる、同じ量のポリペプチドで投与された対象におけるクリアランスより、0.51、0.52、0.53、0.54、0.55、0.56、0.57、0.58、0.59、0.60、0.61、0.62、0.63、0.64、0.65、0.66、0.67、0.68、0.69、もしくは 0.70 倍低い、上記対象におけるクリアランス（CL）（活性）；

約 25 IU/kg キメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ（aPTT）分析により測定した、約 1.68 mL/時間/kg、1.68 ± 0.1 mL/時間/kg、1.68 ± 0.2 mL/時間/kg、1.68 ± 0.3 mL/時間/kg、1.68 ± 0.4 mL/時間/kg、1.68 ± 0.5 mL/時間/kg、1.68 ± 0.6 mL/時間/kg、もしくは 1.68 ± 0.7 mL/時間/kg の上記対象におけるクリアランス（CL）（活性）；

10

20

30

40

50

約 25 IU/kg キメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ (aPTT) 分析により測定した、約 1.31 ~ 2.15 mL/時間/kg の上記対象におけるクリアランス (CL) (活性) ;

約 65 IU/kg キメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ (aPTT) 分析により測定した、約 2.32 mL/時間/kg、 $2.32 \pm 0.1$  mL/時間/kg、 $2.32 \pm 0.2$  mL/時間/kg、 $2.32 \pm 0.3$  mL/時間/kg、 $2.32 \pm 0.4$  mL/時間/kg、 $2.32 \pm 0.5$  mL/時間/kg、 $2.32 \pm 0.6$  mL/時間/kg、もしくは  $2.32 \pm 0.7$  mL/時間/kg の上記対象におけるクリアランス (CL) (活性) ;

約 65 IU/kg キメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ (aPTT) 分析により測定した、約 1.64 ~ 3.29 mL/時間/kg の上記対象におけるクリアランス (CL) (活性) ;

約 25 IU/kg キメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ (色素生産性) 分析により測定した、約 1.49 mL/時間/kg、 $1.49 \pm 0.1$  mL/時間/kg、 $1.49 \pm 0.2$  mL/時間/kg、 $1.49 \pm 0.3$  mL/時間/kg、 $1.49 \pm 0.4$  mL/時間/kg、 $1.49 \pm 0.5$  mL/時間/kg、 $1.49 \pm 0.6$  mL/時間/kg、もしくは  $1.49 \pm 0.7$  mL/時間/kg の上記対象におけるクリアランス (CL) (活性) ;

約 25 IU/kg キメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ (色素生産性) 分析により測定した、約 1.16 ~ 1.92 mL/時間/kg の上記対象におけるクリアランス (CL) (活性) ;

約 65 IU/kg キメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ (色素生産性) 分析により測定した、約 1.52 mL/時間/kg、 $1.52 \pm 0.1$  mL/時間/kg、 $1.52 \pm 0.2$  mL/時間/kg、 $1.52 \pm 0.3$  mL/時間/kg、 $1.52 \pm 0.4$  mL/時間/kg、 $1.52 \pm 0.5$  mL/時間/kg、 $1.52 \pm 0.6$  mL/時間/kg、もしくは  $1.52 \pm 0.7$  mL/時間/kg の上記対象におけるクリアランス (CL) (活性) ; または

約 65 IU/kg キメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ (色素生産性) 分析により測定した、約 1.05 ~ 2.20 mL/時間/kg の上記対象におけるクリアランス (CL) (活性)。

#### 【0108】

いくつかの実施形態では、長時間作用性の FVII は、患者の個体群に投与した場合に、1つまたはそれ以上の以下の特性を有する :

ワンステージ (aPTT) 分析またはツーステージ (色素生産性) 分析により測定した場合に、全長の、成熟した FVII からなる、同じ量のポリペプチドで投与された対象における MRT より、少なくとも 1.46、1.47、1.48、1.49、1.50、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、1.57、1.58、1.59、1.60、1.61、1.62、1.63、1.64、1.65、1.66、1.67、1.68、1.69、1.70、1.71、1.72、1.73、1.74、1.75、1.76、1.77、1.78、1.79、1.80、1.81、1.82、1.83、1.84、1.85、1.86、1.87、1.88、1.89、1.90、1.91、1.92、もしくは 1.93 倍高い、上記対象における MRT ;

ワンステージ (aPTT) 分析により測定した、約 27 時間、 $27 \pm 1$  時間、 $27 \pm 2$  時間、 $27 \pm 3$  時間、 $27 \pm 4$  時間、 $27 \pm 5$  時間、 $27 \pm 6$  時間、 $27 \pm 7$  時間、 $27 \pm 8$  時間、 $27 \pm 9$  時間、もしくは  $27 \pm 10$  時間の上記対象における MRT (活性) ;

ワンステージ (aPTT) 分析により測定した、約 20.6 ~ 35.3 時間の上記対象における MRT (活性) ;

ツーステージ (色素生産性) 分析により測定した、約 23.9 ~ 28.5 時間の上記対象における MRT (活性) ;

ツーステージ (色素生産性) 分析により測定した、約 19.8 ~ 28.9 時間の上記対

10

20

30

40

50

象におけるMRT（活性）；または

ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、約20.5～39.6時間の上記対象におけるMRT（活性）。

【0109】

他の実施形態では、長時間作用性のFVIIは、患者の個体群に投与した場合に、1つまたはそれ以上の以下の特性を有する：

ワンステージ（aPTT）分析またはツーステージ（色素生産性）分析により測定した場合に、全長の、成熟したFVIIからなる、同じ量のポリペプチドで投与された対象における増分回収率と同等である、上記対象における増分回収率；

約25IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ（aPTT）分析により測定した、IU/kgあたり約2.44IU/dL、IU/kgあたり2.44±0.1IU/dL、IU/kgあたり2.44±0.2IU/dL、IU/kgあたり2.44±0.3IU/dL、IU/kgあたり2.44±0.4IU/dL、IU/kgあたり2.44±0.5IU/dL、IU/kgあたり2.44±0.6IU/dL、IU/kgあたり2.44±0.7IU/dL、IU/kgあたり2.44±0.8IU/dL、IU/kgあたり2.44±0.9IU/dL、IU/kgあたり2.44±1.0IU/dL、IU/kgあたり2.44±1.1IU/dL、もしくはIU/kgあたり2.44±1.2IU/dLの上記対象における増分回収率；

約25IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ（aPTT）分析により測定した、IU/kgあたり約2.12～2.81IU/dLの上記対象における増分回収率；

約65IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ（aPTT）分析により測定した、IU/kgあたり約1.83IU/dL、IU/kgあたり1.83±0.1IU/dL、IU/kgあたり1.83±0.2IU/dL、IU/kgあたり1.83±0.3IU/dL、IU/kgあたり1.83±0.4IU/dL、IU/kgあたり1.83±0.5IU/dL、IU/kgあたり1.83±0.6IU/dL、IU/kgあたり1.83±0.7IU/dL、IU/kgあたり1.83±0.8IU/dL、IU/kgあたり1.83±0.9IU/dL、IU/kgあたり1.83±1.0IU/dL、もしくはIU/kgあたり1.83±1.1IU/dLの上記対象における増分回収率；

約65IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ（aPTT）分析により測定した、IU/kgあたり約1.59～2.10IU/dLの上記対象における増分回収率；

約25IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、IU/kgあたり約3.09IU/dL、IU/kgあたり3.09±0.1IU/dL、IU/kgあたり3.09±0.2IU/dL、IU/kgあたり3.09±0.3IU/dL、IU/kgあたり3.09±0.4IU/dL、IU/kgあたり3.09±0.5IU/dL、IU/kgあたり3.09±0.6IU/dL、IU/kgあたり3.09±0.7IU/dL、IU/kgあたり3.09±0.8IU/dL、IU/kgあたり3.09±0.9IU/dL、IU/kgあたり3.09±1.0IU/dL、IU/kgあたり3.09±1.1IU/dL、IU/kgあたり3.09±1.2IU/dL、もしくはIU/kgあたり3.09±1.3IU/dLの上記対象における増分回収率；

約65IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、IU/kgあたり約2.80IU/dL、IU/kgあたり2.80±0.1IU/dL、IU/kgあたり2.80±0.2IU/dL、IU/kgあたり2.80±0.3IU/dL、IU/kgあたり2.80±0.4IU/dL、IU/kgあたり2.80±0.5IU/dL、IU/kgあたり2.80±0.6IU/dL、IU/kgあたり2.80±0.7IU/dL、IU/kgあたり2.80±0.8IU/dL、IU/kgあたり2.80±0.9IU/dL、IU/kgあたり2.80±1.0IU/dL、IU/kgあたり2.80±1.1IU/dL、IU/kgあたり2.80±1.2IU/dL、もしくはIU/kgあたり2.80±1.3IU/dLの上記対象における増分回収率；

10

20

30

40

50

・ 0 IU / d L、IU / k g あたり 2 . 8 0 ± 1 . 1 IU / d L、もしくは IU / k g あたり 2 . 8 0 ± 1 . 2 IU / d L の上記対象における増分回収率；

約 2 5 IU / k g キメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、IU / k g あたり約 2 . 6 1 ~ 3 . 6 6 IU / d L の上記対象における増分回収率；または

約 6 5 IU / k g キメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、IU / k g あたり約 2 . 2 4 ~ 3 . 5 0 IU / d L の上記対象における増分回収率。

【 0 1 1 0 】

さらに他の実施形態では、長時間作用性の F V I I I は、患者の個体群に投与した場合に、1 つまたはそれ以上の以下の特性を有する；

ワンステージ（a P T T）分析またはツーステージ（色素生産性）分析により測定した場合に、全長の、成熟した F V I I I からなる、同じ量のポリペプチドで投与された対象における  $V_{ss}$ （活性）と同等である、上記対象における  $V_{ss}$ （活性）；

約 2 5 IU / k g キメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ（a P T T）分析により測定した、約 4 5 . 5 m L / k g、4 5 . 5 ± 1 m L / k g、4 5 . 5 ± 2 m L / k g、4 5 . 5 ± 3 m L / k g、4 5 . 5 ± 4 m L / k g、4 5 . 5 ± 5 m L / k g、4 5 . 5 ± 6 m L / k g、4 5 . 5 ± 7 m L / k g、4 5 . 5 ± 8 m L / k g、4 5 . 5 ± 9 m L / k g、4 5 . 5 ± 1 0 m L / k g、もしくは 4 5 . 5 ± 1 1 m L / k g の上記対象における  $V_{ss}$ （活性）；

約 2 5 IU / k g キメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ（a P T T）分析により測定した、約 3 9 . 3 ~ 5 2 . 5 m L / k g の上記対象における  $V_{ss}$ （活性）；

約 6 5 IU / k g キメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ（a P T T）分析により測定した、約 6 2 . 8 m L / k g、6 2 . 8 ± 1 m L / k g、6 2 . 8 ± 2 m L / k g、6 2 . 8 ± 3 m L / k g、6 2 . 8 ± 4 m L / k g、6 2 . 8 ± 5 m L / k g、6 2 . 8 ± 6 m L / k g、6 2 . 8 ± 7 m L / k g、6 2 . 8 ± 8 m L / k g、6 2 . 8 ± 9 m L / k g、6 2 . 8 ± 1 0 m L / k g、6 2 . 8 ± 1 1 m L / k g、6 2 . 8 ± 1 2 m L / k g、6 2 . 8 ± 1 3 m L / k g、6 2 . 8 ± 1 4 m L / k g、6 2 . 8 ± 1 5 m L / k g、もしくは 6 2 . 8 ± 1 6 m L / k g の上記対象における  $V_{ss}$ （活性）；

約 6 5 IU / k g キメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ（a P T T）分析により測定した、約 5 5 . 2 ~ 7 1 . 5 m L / k g の上記対象における  $V_{ss}$ （活性）；

約 2 5 IU / k g キメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、約 3 5 . 9 m L / k g、3 5 . 9 ± 1 m L / k g、3 5 . 9 ± 2 m L / k g、3 5 . 9 ± 3 m L / k g、3 5 . 9 ± 4 m L / k g、3 5 . 9 ± 5 m L / k g、3 5 . 9 ± 6 m L / k g、3 5 . 9 ± 7 m L / k g、3 5 . 9 ± 8 m L / k g、3 5 . 9 ± 9 m L / k g、3 5 . 9 ± 1 0 m L / k g、3 5 . 9 ± 1 1 m L / k g、3 5 . 9 ± 1 2 m L / k g、もしくは 3 5 . 9 ± 1 3 m L / k g の上記対象における  $V_{ss}$ （活性）；

約 2 5 IU / k g キメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、約 3 0 . 4 ~ 4 2 . 3 m L / k g の上記対象における  $V_{ss}$ （活性）；

約 6 5 IU / k g キメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、約 4 3 . 4 m L / k g、4 3 . 4 ± 1 m L / k g、4 3 . 4 ± 2 m L / k g、4 3 . 4 ± 3 m L / k g、4 3 . 4 ± 4 m L / k g、4 3 . 4 ± 5 m L / k g、4 3 . 4 ± 6 m L / k g、4 3 . 4 ± 7 m L / k g、4 3 . 4 ± 8 m L / k g、4 3 . 4 ± 9 m L / k g、4 3 . 4 ± 1 0 m L / k g、4 3 . 4 ± 1 1 m L / k g、4 3 . 4 ± 1 2 m L / k g、4 3 . 4 ± 1 3 m L / k g、4 3 . 4 ± 1 4 m L / k g、4 3 . 4 ± 1 5 m L / k g、もしくは 4 3 . 4 ± 1 6 m L / k g の上記対象における  $V_{ss}$ （活性）；または

約 6 5 IU / k g キメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、約 3 8 . 2 ~ 4 9 . 2 m L / k g の上記対象における  $V_{ss}$ （活性）

10

20

30

40

50

。

## 【0111】

さらなる他の実施例では、長時間作用性のFVIIIは、患者の個体群に投与した場合に、1つまたはそれ以上の以下の特性を有する：

ワンステージ（aPTT）分析またはツーステージ（色素生産性）分析により測定した場合に、全長の、成熟したFVIIIからなる、同じ量のポリペプチドで投与された対象におけるAUC<sub>INF</sub>よりも少なくとも1.45、1.46、1.47、1.48、1.49、1.50、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、1.57、1.58、1.59、1.60、1.61、1.62、1.63、1.64、1.65、1.66、1.67、1.68、1.69、1.70、1.71、1.72、1.73、1.74、1.75、1.76、1.77、1.78、1.79、1.80、1.81、1.82、1.83、1.84、1.85、1.86、1.87、1.88、1.89、1.90倍高い、上記対象におけるAUC<sub>INF</sub>；

10

約25 IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ（aPTT）分析により測定した、IU/kgあたり約1440 ± 316 hr \* IU/dLの上記対象におけるAUC<sub>INF</sub>；

約25 IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ（aPTT）分析により測定した、IU/kgあたり約1160 ~ 1880 hr \* IU/dLの上記対象におけるAUC<sub>INF</sub>；

約25 IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ（aPTT）分析により測定した、IU/kgあたり約1480 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1480 ± 100 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1480 ± 200 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1480 ± 300 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1480 ± 400 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1480 ± 500 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1480 ± 600 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1480 ± 700 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1480 ± 800 hr \* IU/dL、もしくはIU/kgあたり1480 ± 1000 hr \* IU/dLの上記対象におけるAUC<sub>INF</sub>；

20

約65 IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ（aPTT）分析により測定した、IU/kgあたり約2910 ± 1320 hr \* IU/dLの上記対象におけるAUC<sub>INF</sub>；

30

約65 IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ（aPTT）分析により測定した、IU/kgあたり約1980 ~ 3970 hr \* IU/dLの上記対象におけるAUC<sub>INF</sub>；

約65 IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ワンステージ（aPTT）分析により測定した、IU/kgあたり約2800 hr \* IU/dL、IU/kgあたり2800 ± 100 hr \* IU/dL、IU/kgあたり2800 ± 200 hr \* IU/dL、IU/kgあたり2800 ± 300 hr \* IU/dL、IU/kgあたり2800 ± 400 hr \* IU/dL、IU/kgあたり2800 ± 500 hr \* IU/dL、IU/kgあたり2800 ± 600 hr \* IU/dL、IU/kgあたり2800 ± 700 hr \* IU/dL、IU/kgあたり2800 ± 800 hr \* IU/dL、もしくはIU/kgあたり2800 ± 1000 hr \* IU/dLの上記対象におけるAUC<sub>INF</sub>；

40

約25 IU/kgキメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、IU/kgあたり約1660 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1660 ± 100 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1660 ± 200 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1660 ± 300 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1660 ± 400 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1660 ± 500 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1660 ± 600 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1660 ± 700 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1660 ± 800 hr \* IU/dL、IU/kgあたり1

50

660 ± 900 hr \* IU / dL、もしくはIU / kgあたり1660 ± 1000 hr \* IU / dLの上記対象におけるAUC<sub>INF</sub>；

約25 IU / kgキメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、IU / kgあたり約1300 ~ 2120 hr \* IU / dLの上記対象におけるAUC<sub>INF</sub>；

約65 IU / kgキメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、IU / kgあたり約4280 hr \* IU / dL、IU / kgあたり4280 ± 100 hr \* IU / dL、IU / kgあたり4280 ± 200 hr \* IU / dL、IU / kgあたり4280 ± 300 hr \* IU / dL、IU / kgあたり4280 ± 400 hr \* IU / dL、IU / kgあたり4280 ± 500 hr \* IU / dL、IU / kgあたり4280 ± 600 hr \* IU / dL、IU / kgあたり4280 ± 700 hr \* IU / dL、IU / kgあたり4280 ± 800 hr \* IU / dL、IU / kgあたり4280 ± 900 hr \* IU / dL、IU / kgあたり4280 ± 1000 hr \* IU / dL、IU / kgあたり4280 ± 1100 hr \* IU / dL、IU / kgあたり4280 ± 1200 hr \* IU / dL、IU / kgあたり4280 ± 1300 hr \* IU / dL、IU / kgあたり4280 ± 1400 hr \* IU / dL、IU / kgあたり4280 ± 1500 hr \* IU / dL、もしくはIU / kgあたり4280 ± 1600 hr \* IU / dLの上記対象におけるAUC<sub>INF</sub>；または

約65 IU / kgキメラポリペプチドが投与される際、ツーステージ（色素生産性）分析により測定した、IU / kgあたり約2960 ~ 6190 hr \* IU / dLの上記対象におけるAUC<sub>INF</sub>。

#### 【0112】

本明細書で使用される「オンデマンドでの治療」は、短い時間にわたって行うことを意図しており、出血の発症のような現状にまたは予定した手術のような認識された必要性に応じた治療を意味する。「オンデマンドでの治療」および「発症時治療」という用語は、互換的に使用される。オンデマンドでの（突発的）治療を必要とし得る状況は、例えば、出血の発症、関節出血、筋肉出血、経口出血、出血（hemorrhage）、筋肉内出血、経口出血、外傷、頭部の外傷、消化管出血、頭蓋内出血、腹腔内出血、胸腔内出血、骨折、中枢神経系出血、咽頭後隙での出血、腹膜後隙での出血、または腸腰筋鞘（iliopsoas sheath）での出血を含む。対象は、外科的予防、周術期管理、または外科的処置に関する治療を必要とし得る。そのような外科的処置は、例えば、小手術、大手術、抜歯、扁桃摘出術、鼠径部ヘルニア切開術、滑膜切除術、人工膝関節全置換、開頭術、骨接合術、外傷の手術、頭蓋内手術、腹腔内手術、胸腔内手術、または関節置換術を含む。

#### 【0113】

一実施形態では、オンデマンドでの（突発的）治療は、単一用量で、出血（例えば、自然発症の出血）の80%超（80%超、81%超、82%超、83%超、84%超、85%超、86%超、87%超、88%超、89%超、90%超、91%超、92%超、93%超、94%超、95%超、96%超、97%超、98%超、99%超、もしくは100%）または80 ~ 100%、80 ~ 90%、85 ~ 90%、90 ~ 100%、90 ~ 95%、もしくは95 ~ 100%を消散させる。他の実施形態では、80%超（81%超、82%超、83%超、84%超、85%超、86%超、87%超、88%超、89%超、90%超、91%超、92%超、93%超、94%超、95%超、96%超、97%超、98%超、もしくは100%）または、80 ~ 100%、80 ~ 90%、85 ~ 90%、90 ~ 100%、90 ~ 95%、もしくは95 ~ 100%の出血の発症は、オンデマンドでの（突発的）治療後に、医師により優または良であると評価される。他の実施形態では、出血の発症の5%超（6%超、7%超、8%超、9%超、10%超、11%超、12%超、13%超、14%超、15%超、16%超、17%超、18%超、19%超、20%超）または5 ~ 20%、5 ~ 15%、5 ~ 10%、10 ~ 20%、もしくは10 ~ 15%が、オンデマンドでの（突発的）治療後に、医師により可であると評価される。

## 【0114】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は互換的に使用され、共有結合したアミノ酸残基を含む高分子化合物を指す。

## 【0115】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」は互換的に使用され、共有結合したヌクレオチド残基からなる高分子化合物を指す。ポリヌクレオチドは、DNA、cDNA、RNA、一本鎖もしくは二本鎖、ベクター、プラスミド、ファージ、またはウイルスであり得る。ポリヌクレオチドは、例えば、表2のポリペプチドをコードする表1のものを含む(表1参照)。また、ポリヌクレオチドは、表2のFVIII、Fc、シグナル配列、His、およびポリペプチドの他の断片のような、例えば表2のポリペプチドの断片をコードするもの、例えば表1のポリヌクレオチドの断片を含む。

10

## 【0116】

本明細書で使用される「予防的処置」は、対象の血漿におけるFVIII活性のレベルを増加させるために、ある時間にわたって、対象に複数回投与でFVIIIポリペプチドを投与することを意味する。増加したレベルは、特発性出血の発生率を減少させるのに、または、例えば、不慮の負傷の場合に出血を防止するのに十分であり得る。予防的処置の間、対象における血漿タンパク質レベルは、その対象に関するベースラインレベル、または、重篤な血友病を特徴づけるFVIIIのレベル( $< 1 \text{ IU/dl} [1\%]$ )を下回り得ない。

20

## 【0117】

一実施形態では、予防計画は、例えば、各患者に関するPKデータを測定することおよび1~3% FVIII活性のトラフレベルを維持する投与間隔で本開示のFVIIIを投与することにより、個々の患者に対して「適合」されている。対象が経過(rolling)2か月の期間にわたって、2以上の特発性出血発症として定義される、許容できない出血の発症を経験する場合に、調節がなされ得る。この場合、調節は、3~5%のトラフレベルを目標とするであろう。他の実施形態では、予防的処置は、出血の防止および制御、出血の持続性の制御、出血からの持続する保護、および/または持続する利益をもたらす。予防、例えば、持続する保護は、最後に測定した時点(AUC-LAST)に対して増加したAUCおよび減少したクリアランスにより示され得、短く作用するFVIIIと比較して増加した終末 $t_{1/2}$ をもたらす。予防は、短期間作用のFVIIIに対して、

よりよい $C_{max}$ 、よりよい $T_{max}$ 、および/またはより長い平均滞留時間により示され得る。いくつかの実施形態では、予防は、注入後(例えば、最後の注入)約24、36、48、72、または96時間(例えば、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、96、87、88、89、90、91、92、93、94、95、または96時間)以内に特発性出血の発症をもたらさない。ある実施形態では、予防は、週に1度の投与(例えば、65 IU/kgで)により、年率換算した出血の発症において、30%超(例えば、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、96、87、88、89、または90%以上、例えば、50%超)の平均減少をもたらす。

30

40

## 【0118】

本明細書で使用される「対象」は、ヒト個体を意味する。対象は、出血障害に現在苦しんでいる、または、そのような治療を必要とすることが予想される患者であり得る。いくつかの実施形態では、対象は、これまでに凝固因子により治療を受けたことがない(つま

50

り、対象はこれまでに治療を受けていない対象またはこれまでに治療を受けていない患者である)。いくつかの実施形態では、対象は胎児であり、本方法は、胎児の母親にキメラポリペプチドを投与すること、および、対象への投与は胎盤を介して母親から行うことを含む。いくつかの実施形態では、対象は子供または大人である。いくつかの実施形態では、対象は、1歳未満、2歳未満、3歳未満、4歳未満、5歳未満、6歳未満、7歳未満、8歳未満、9歳未満、10歳未満、11歳未満、または12歳未満の子供である。いくつかの実施形態では、子供は1歳未満である。いくつかの実施形態では、子供または大人は出血障害を発生し、出血障害の徴候の始まりは1歳以降である。いくつかの実施形態では、対象へのキメラポリペプチドの投与は、体液性の免疫応答、細胞媒介性の免疫応答、または凝固因子に対する体液性の免疫応答および細胞媒介性の免疫応答の両方、から選択される免疫応答の発生を防止、阻害、または低減するのに十分である。

10

## 【0119】

本明細書に記載されるいくつかの実施形態では、対象は、阻害性のFV III免疫応答の発生のリスクがある。例えば、対象はこれまでに阻害性のFV III免疫応答を発生し、または現在阻害性のFV III免疫応答を有しているため、対象は阻害性のFV III免疫応答の発生のリスクがあり得る。いくつかの実施形態では、対象は、血漿由来FV III製品による治療後に阻害性のFV III免疫応答を発生した。いくつかの実施形態では、対象は、組換えFV III製品による治療後に阻害性のFV III免疫応答を発生した。いくつかの実施形態では、対象は、全長FV IIIタンパク質による治療後に阻害性のFV III免疫応答を発生した。いくつかの実施形態では、対象は、欠失、例えば、Bドメインの全部または部分欠失を含むFV IIIタンパク質による治療後に阻害性のFV III免疫応答を発生した。

20

## 【0120】

いくつかの実施形態では、対象は、ADVATE (登録商標)、RECOMBINATE (登録商標)、KOGENATE FS (登録商標)、HELIXATE FS (登録商標)、XYNTHA (登録商標) / REFRACTO AB (登録商標)、HEMOFIL-M (登録商標)、MONARC-M (登録商標)、MONOCLATE-P (登録商標)、HUMATE-P (登録商標)、ALPHANATE (登録商標)、KOATEDVI (登録商標)、およびHYATE:C (登録商標) からなる群から選択されるFV III製品による治療後に阻害性のFV III免疫応答を発生した。

30

## 【0121】

いくつかの実施形態では、凝固因子、例えば、FV IIIによる治療後の免疫応答は、凝固因子に対する阻害抗体の産生を含む。いくつかの実施形態では、阻害抗体濃度は少なくとも0.6ベセスダ単位(BU)である。いくつかの実施形態では、阻害抗体濃度は少なくとも5BUである。いくつかの実施形態では、阻害抗体濃度は、少なくとも0.5、少なくとも0.6、少なくとも0.7、少なくとも0.8、少なくとも0.9、少なくとも1.0、少なくとも1.5、少なくとも2.0、少なくとも3.0、少なくとも4.0、少なくとも5.0、少なくとも6.0、少なくとも7.0、少なくとも8.0、少なくとも9.0または、少なくとも10.0BUである。

40

## 【0122】

いくつかの実施形態では、凝固因子、例えば、FV IIIによる治療後の免疫応答は、細胞媒介性の免疫応答を含む。いくつかの実施形態では、免疫応答は細胞媒介性の免疫応答を含む。細胞媒介性の免疫応答は、IL-12、IL-4、およびTNF- からなる群から選択されるサイトカインの放出を含み得る。

## 【0123】

いくつかの実施形態では、凝固因子、例えば、FV IIIによる治療後の免疫応答は、増加した出血傾向、高い凝固因子の消費、凝固因子治療に対する反応の欠如、凝固因子治療の減少した効能、および凝固因子の短くなった半減期、からなる群から選択される臨床症状を含む。いくつかの実施形態では、対象は、凝固因子遺伝子における突然変異または欠失を有する。いくつかの実施形態では、対象は、凝固因子遺伝子における再配置を有す

50

る。いくつかの実施形態では、対象は重篤な血友病を有する。いくつかの実施形態では、対象は、凝固因子に対する阻害性免疫応答を以前発生したことがある親族を有する。いくつかの実施形態では、対象は、インターフェロン療法を受けている。いくつかの実施形態では、対象は、抗ウイルス療法を受けている。

【0124】

いくつかの実施形態では、リスクのある対象は、F V I I I 以外の治療タンパク質に対する阻害性免疫応答を以前発生している。

【0125】

さらに、対象は、また、対象が阻害性免疫応答を発生する可能性を増加させる、多くの環境または遺伝因子の結果として、阻害性の F V I I I 免疫応答の発生のリスクを有し得る。対象が阻害性免疫応答を発生する可能性を増加させる因子が知られる。参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Kasper, C. "Diagnosis and Management of Inhibitors to Factors VIII and IX ~ An Introductory Discussion for Physicians," Treatment of Hemophilia 34 (2004) 参照。例えば、阻害物質は、軽度または中程度の血友病よりも、重篤な血友病（例えば、1%未満の F V I I I ベースラインレベル）において、より一般的に生じる。参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Report of Expert Meeting on FVIII Products and Inhibitor Development, European Medicines Agency (February 28, 2006-March 2, 2006) 参照。

10

【0126】

対象が阻害性免疫応答を発生する可能性を遺伝因子が増加させ得るという事実の結果として、F V I I I または他の治療タンパク質に対する阻害性免疫応答を発生したことがある少なくとも1人の家族（例えば、兄弟、親、子供、祖父母、叔母、叔父、またはいとこ）を有する対象は、阻害性の F V I I I 免疫応答発生の危険性があり得る。

20

【0127】

阻害物質は、大きな遺伝子欠失、未成熟終止コドンを生じさせるナンセンス突然変異、および F V I I I 遺伝子における大きな転移のような、F V I I I の発現を防止する遺伝子突然変異を有する患者において一般的である。このように、いくつかの実施形態では、阻害性の F V I I I 免疫応答の発生のリスクを有する対象は、F V I I I 遺伝子における突然変異、欠失、または再構成を含む。いくつかの実施形態では、阻害性の F V I I I 免疫応答の発生のリスクを有する対象は、F V I I I が T 細胞に結合することを妨げる、F V I I I における突然変異を含む。F V I I I 遺伝子の大きな再構成を有する阻害物質の関連性が観察されている。参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Astermark et al., Blood 107:3167-3172 (2006) 参照。したがって、いくつかの実施形態では、F V I I I - Fc 融合タンパク質は、F V I I I 遺伝子における大きな再構成、例えば、イントロン 2 2 転移またはイントロン 1 転移を有する対象に投与される。いくつかの実施形態では、F V I I I - Fc が、F V I I I における2つの大きな再構成を有する対象に投与される。ヌル突然変異との阻害物質の関連性も、観察している。Astermark et al., Blood 108:3739-3745 (2006)。したがって、いくつかの実施形態では、F V I I I - Fc 融合タンパク質が、ヌル突然変異を有する対象に投与される。

30

【0128】

また、阻害物質は、いくつかの場合のみにおいて、外因性の凝固因子による治療後により一般的に生じる。よって、いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答の発生のリスクを有する対象は、200、175、150、125、100、75、50、25、20、15、10、または5未満の暴露日を有している。いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答の発生のリスクを有する対象は、F V I I I による治療にこれまで暴露されていない。

40

【0129】

いくつかの実施形態では、対象は胎児である。免疫寛容は、胎児の母親に F V I I I 部分および Fc 部分を含むキメラポリペプチドを投与することにより、胎児において誘導され得る。

【0130】

50

また、阻害物質は、黒人のアフリカ系統でより一般的に生じる。参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Kasper, C. "Diagnosis and Management of Inhibitors to Factors VIII and IX-An Introductory Discussion for Physicians," Treatment of Hemophilia 34 (2004)参照。したがって、いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答の発生のリスクを有する対象は、黒人のアフリカ系統である。

#### 【0131】

FVII以外の遺伝子における遺伝子突然変異も、阻害性免疫応答を発生する増加したリスクと関連付けられている。例えば、TNFの増加した構成型および誘導転写レベルに関連する、Hap2内のTNF - 308G > A多型が、阻害性免疫応答の発生の増加したリスクと関連付けられている。参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Astermarket al., Blood 108: 3739-3745 (2006)参照。したがって、いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答の発生のリスクを有する対象は、増加したTNF - に関連する遺伝子多型を有する。いくつかの実施形態では、多型は、TNF - 308G > A多型である。いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答の発生のリスクを有する対象は、IL10遺伝子における多型、例えば、IL10の増加した分泌に関連する多型を有する。いくつかの実施形態では、FVII - Fcは、IL10遺伝子のプロモーター領域 (promote region) におけるIL10Gマイクロサテライトの対立遺伝子134により、対象に投与される。参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Astermarket al. Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Biology 108:3739-3745 (2006)参照。

#### 【0132】

いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答の発生のリスクを有する対象は、減少したCTLA-4 (細胞毒性Tリンパ球抗原4) 発現に関連する遺伝子多型を有する。いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答の発生のリスクを有する対象は、DR15 (HLA-DR15) またはDQB0602 MHC (主要組織適合性複合体) クラスII分子における突然変異を有する。血友病を有する対象における阻害性免疫応答の発生に関連する他のMHCクラスII分子は、A3、B7、C7、DQA0102、C2、DQA0103、DQB0603、およびDR13である (Inhibitors in Patients with Hemophilia, E.C. Rodriguez-Merchan & C.A. Lee, Eds., Blackwell Science, Ltd., 2002参照)。

#### 【0133】

いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答の発生のリスクを有する対象は、これまでに凝固因子、例えば、FVIIに暴露されていない。いくつかの実施形態では、凝固因子、例えば、FVIIに対する阻害性免疫応答の発生のリスクを有する対象は、FVIIに暴露されている。いくつかの実施形態では、凝固因子、例えば、FVIIに対する阻害性免疫応答の発生のリスクを有する対象は、150未満、50未満、または20未満のFVIIの暴露日を有する。いくつかの実施形態では、対象は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20日の凝固因子暴露を有している。いくつかの実施形態では、対象は、少なくとも25、30、35、40、45、または50日の凝固因子暴露を有している。いくつかの実施形態では、対象は、少なくとも60、70、80、90、100、110、120、130、140、または150日の凝固因子暴露を有している。

#### 【0134】

いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答は阻害性のFVII免疫応答である。いくつかの実施形態では、阻害性のFVII免疫応答は、ADVATE (登録商標)、RECOMBINATE (登録商標)、KOGENATE FS (登録商標)、HELIXATE FS (登録商標)、XYNTHA (登録商標) / REFRACTO AB (登録商標)、HEMOFIL-M (登録商標)、MONARC-M (登録商標)、MONOCLATE-P (登録商標)、HUMATE-P (登録商標)、ALPHANATE (登録商標)、KOATE-DVI (登録商標)、およびHYATE:C (登録商標) からなる群から選択されるFVII製品に対する応答を発生した。いくつかの実施形態では、阻害性

免疫応答は、組換え F V I I I 製品に応答して発生する阻害性の F V I I I 免疫応答である。

【 0 1 3 5 】

いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答の発生リスクを有する対象は、免疫賦活性の治療を受けているまたは最近受けた。例えば、阻害物質はまた、インターフェロンによる治療を受けている H C V 陽性血友病 A 患者において、並びに、抗レトロウイルス治療に関連する免疫再構築炎症反応症候群を有する H I V 陽性血友病 A 患者においても報告されている。参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Report of Expert Meeting on FVIII Products and Inhibitor Development, European Medicines Agency (February 28, 2006-March 2, 2006) 参照。したがって、いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答の発生リスクを有する対象はインターフェロン療法を受けている。いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答の発生リスクを有する対象は、抗レトロウイルス治療を受けており、免疫再構築炎症反応症候群を有している。

10

【 0 1 3 6 】

阻害性の F V I I I 免疫応答は、F V I I I 治療に対する臨床反応に基づいて測定され得る。F V I I I 阻害物質の臨床症状は知られており、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Kasper, C. "Diagnosis and Management of Inhibitors to Factors VIII and IX - An Introductory Discussion for Physicians," Treatment of Hemophilia 34 (2004) に記載されている。例えば、阻害物質の存在は出血のコントロールを難しくし、そのため、F V I I I に対する免疫応答は、増加した出血傾向、高い F V I I I 消費、F V I I I 治療に対する反応の欠如、F V I I I 治療の減少した効能、および/または F V I I I の短くなった半減期により特徴づけられる。

20

【 0 1 3 7 】

また、阻害 F V I I I I 免疫応答は、ベセスダ検査 (Bethesda test) またはベセスダ検査のナイメゲン変法 (Nijmegen modification) のような臨床検査を用いて測定され得る。少なくとも 0.6 ベセスダ単位 (BU) のレベルが、阻害性免疫応答の存在を示し得る。少なくとも 5 ベセスダ単位 (BU) のレベルが、高い力価の阻害物質の存在を示し得る。また、in vivo の急速投与 F V I I I 注入の半減期および回収率の測定が用いられる。

【 0 1 3 8 】

いくつかの実施形態では、阻害性免疫応答の発生リスクを有する対象は、これまでに、少なくとも 0.5、少なくとも 0.6、少なくとも 0.7、少なくとも 0.8、少なくとも 0.9、少なくとも 1.0、少なくとも 1.5、少なくとも 2.0、少なくとも 3.0、少なくとも 4.0、少なくとも 5.0、少なくとも 6.0、少なくとも 7.0、少なくとも 8.0、少なくとも 9.0、または少なくとも 10.0 BU ピーク力価の、阻害性免疫応答を発生している。

30

【 0 1 3 9 】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態では、本方法は、対象が阻害性の F V I I I 免疫応答を発生するリスクがあるかどうかを判定し、対象がリスクを有する場合には F V I I I 部分および Fc 部分を含むキメラポリペプチド対象に投与することを含む。したがって、いくつかの実施形態では、本方法は、対象が F V I I I における突然変異、欠失、または再構成を有するかどうかを判定し、対象が有する場合にはキメラポリペプチドを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、対象が F V I I I タンパク質を産生しているかどうかを判定し、対象が産生していない場合にはキメラポリペプチドを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、対象が軽度、中程度、または重篤な血友病であるかどうかを判定し、対象が重篤な血友病である場合にはキメラポリペプチドを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、対象が阻害性の F V I I I 免疫応答を有しているかどうかを、例えば、免疫応答の臨床症状を評価すること、抗 F V I I I 抗体のレベル、力価、もしくは活性を測定すること、または細胞媒介性の免疫応答を計測することにより (例えば、サイトカインのレベルを計測することにより) 判定

40

50

し、対象がこれらの指標のうち少なくとも1つを有する場合にはキメラポリペプチドを投与することを含む。

【0140】

本明細書で使用される「治療量」は、本明細書に記載されるように、治療目標を達成する投与量を意味する。FVIIの必要な用量の算出は、経験的な発見に基づき、平均してkg体重あたり1IUのFVIIが血漿FVII活性を約2IU/dLまで上昇させる。必要とされる用量は、以下の式を用いて決定される。

必要とされる単位数 = 体重 (kg) × 所望のFVII上昇 (IU/dLまたは正常時の%) × 0.5 (IU/dLあたりIU/kg)

【0141】

本開示の方法において用いられ得る治療量は、約10～100IU/kgであり、より具体的には、10～20、20～30、30～40、40～50、50～60、60～70、70～80、80～90、または90～100IU/kgであり、さらに具体的には、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100IU/kgである。

【0142】

本開示の方法において使用され得る追加の治療量は約10～約150IU/kg、より具体的には、約100～110、110～120、120～130、130～140、140～150IU/kg、およびさらに具体的には、約110、115、120、125、130、135、140、145、または150IU/kgである。

【0143】

本明細書で使用される「変異体」は、元のポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、例えば、FVII凝固活性またはFc (FcRn結合) 活性のような、その必須の特性を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。一般的に、変異体は、元のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと、全体として密接に類似し、多くの領域で同じである。変異体は、例えば、ポリペプチドおよびポリヌクレオチド断片、欠失、挿入、およびオリジナルのポリペプチドの修飾されたバージョンを含む。

【0144】

変異体ポリヌクレオチドは、例えば、配列番号1、3、もしくは5 (FVII部分、Fc部分について、別個にまたはともに) における配列をコードするヌクレオチドと少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヌクレオチド配列もしくはその相補鎖、本明細書で挙げている出版物および特許に開示されているもののような既知の突然変異体および組換えFVIIもしくはFcの配列をコードするヌクレオチドもしくはその相補鎖、配列番号2、4、もしくは6のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列 (FVII部分、Fc部分について、別個にまたはともに)、ならびに/またはあらゆるこれらの核酸分子のポリヌクレオチド断片 (例えば、本明細書に記載されるこれらの断片) を含み、または、代替的にこれらからなり得る。ストリンジентなハイブリダイゼーション条件または低ストリンジентな条件下で、これらの核酸分子とハイブリダイズするポリヌクレオチドも、変異体として含められ、これらのポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドも、それらが機能的である限り含められる。

【0145】

変異体ポリペプチドは、例えば、配列番号2、4、または6で示されるポリペプチド配列 (FVII部分、Fc部分について、別個にまたはともに)、および/または、これらのいずれかのポリペプチドのポリペプチド断片 (例えば、本明細書に記載されるこれらの断片) と少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一であるアミノ酸配列を含み、または、代替的にこれらからなり得る。

【0146】

参照ヌクレオチド配列に対して、少なくとも例えば95%「同一」のヌクレオチド配列を有する核酸にとは、核酸のヌクレオチド配列が、参照ヌクレオチド配列の各100ヌク

10

20

30

40

50

レオチドあたり5か所までの突然変異をヌクレオチド配列が含み得ること以外、参照配列と同一であることが意図される。言い換えると、参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を有する核酸を得るために、参照配列における5%までのヌクレオチドが、欠失され得もしくは他のヌクレオチドで置換され得、または、参照配列における全体のヌクレオチドのうち5%までのいくつかのヌクレオチドが、参照配列内に挿入され得る。問い合わせ配列 (query sequence) は、例えば、配列番号1または3に示される全体の配列、ORF (読み取り枠 (open reading frame))、または本明細書に記載されるように特定されるあらゆる断片であり得る。

#### 【0147】

実際問題として、任意の特定の核酸分子またはポリペプチドが、本開示のヌクレオチド配列またはポリペプチドと少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるかどうかは、既知のコンピュータプログラムを用いて従来法で測定され得る。一実施形態では、問い合わせ配列 (参照またはオリジナル配列) と全体的な配列アラインメントとも称される対象配列間の最良の全体的な適合を決定するための方法は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990) のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを用いて決定され得る。配列アラインメントにおいて、問い合わせ配列および対象配列は、ともにDNA配列である。RNA配列は、UをTに変換することにより比較され得る。上記全体的な配列アラインメントの結果は、同一性のパーセンテージで示される。他の実施形態では、同一性のパーセンテージを算出するために、DNA配列のFASTDBアラインメントで用いられるパラメータは以下の通りである：マトリクス = 単位 (Unitary)、k-タプル (tuple) = 4、ミスマッチペナルティ (Mismatch Penalty) = 1、ジョイニングペナルティ (Joining Penalty) = 30、ランダム化グループ長さ (Randomization Group Length) = 0、足きりスコア (Cutoff Score) = 1、ギャップペナルティ (Gap Penalty) = 5、ギャップサイズペナルティ (Gap Size Penalty) = 0.05、ウィンドウサイズ = 500または対象ヌクレオチド配列の長さのうちの短い方。

#### 【0148】

対象配列が、内部欠失のためではなく、5'または3'欠失のために問い合わせ配列よりも短い場合、結果に対して手動修正がなされなければならない。これは、同一性のパーセンテージを算出する場合に、FASTDBプログラムが対象配列の5'および3'トランケーションを考慮しないからである。問い合わせ配列に関連して、5'または3'末端で切断された対象配列に関し、同一性のパーセンテージが、問い合わせ配列の全体の塩基のパーセンテージとして、一致 (matched) / 整列 (aligned) されない、対象配列の5'および3'である問い合わせ配列の塩基の数を算出することにより修正される。ヌクレオチドが一致 / 整列されるかどうかは、FASTDB配列アラインメントの結果により決定される。このパーセンテージは、その後、最終的な同一性のパーセンテージのスコアにたどり着くために、特定のパラメータを用いて上記FASTDBプログラムにより算出された同一性のパーセンテージから減算される。この修正されたスコアは、本開示の目的で使用されるものである。FASTDBアラインメントにより表示されるように、問い合わせ配列と一致 / 整列されない、対象配列の5'および3'の塩基の外側の塩基のみが、同一性のパーセンテージスコアをマニュアルで調節する目的のために算出される。

#### 【0149】

例えば、90塩基の対象配列が、同一性のパーセンテージを測定するために100塩基の問い合わせ配列に対して配置される。欠失は、対象配列の5'末端で生じ、よって、FASTDBアラインメントは、5'末端の最初の10の塩基の一致 / アラインメントを示さない。10の非対の塩基は、配列の10%を表し (問い合わせ配列における塩基の総数

10

20

30

40

50

と適合しない、5'および3'末端の塩基の数)、そして、10%は、FASTDBプログラムにより算出された同一性のパーセンテージスコアから除算される。残りの90塩基が完全に一致する場合には、最終的な同一性のパーセンテージは90%である。他の例では、90塩基の対象配列は、100塩基の問い合わせ配列と比較される。このとき、欠失は内部欠失であるため、問い合わせと一致/整列されない対象配列の5'または3'の塩基を有しない。この場合、FASTDBにより算出される同一性のパーセンテージは、マニュアルで修正されない。繰り返すと、問い合わせ配列と一致/整列されない対象配列の5'および3'の塩基のみがマニュアルで修正される。他のマニュアル修正は、本開示の目的のためにはなされない。

#### 【0150】

本開示の問い合わせアミノ酸配列に対して例えば少なくとも95%「同一」であるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、対象ポリペプチドのアミノ酸配列が、対象ポリペプチド配列が、問い合わせアミノ酸配列の各100アミノ酸あたり5つまでのアミノ酸変更を含み得ることを除いて、問い合わせ配列と同一であることが意図される。言い換えると、問い合わせアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、対象配列における5%までのアミノ酸残基が挿入され、欠失され(インデル)、他のアミノ酸で置換され得る。参照配列のこれらの変更は、参照アミノ酸配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置、または参照配列における残基のうち個々に分散されるこれらの末端位置間のどこかで、または参照配列内の1つまたはそれ以上の隣接する基(group)において、生じ得る。

#### 【0151】

実際問題として、あらゆる特定のポリペプチドが、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%、例えば、配列番号2(FVII部分、Fc部分について、別個にまたはともに)もしくは4、または既知のFVIIもしくはFcポリペプチド配列のアミノ酸配列と同じであるかどうか、既知のコンピュータプログラムを用いて従来法で測定され得る。一実施形態では、問い合わせ配列(参照またはオリジナル配列)と全体的な配列アラインメントとしても参照される対象配列間の最良の全体的な適合を測定するための方法は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを用いて測定され得る。配列アラインメントにおいて、問い合わせ配列および対象配列は、ともにヌクレオチド配列またはともにアミノ酸配列のいずれかである。上記全体的な配列アラインメントの結果は、同一性のパーセンテージで示される。他の実施形態では、FASTDBアミノ酸アラインメントで用いられるパラメータは以下の通りである:マトリクス=PAM0、k-タプル=2、ミスマッチペナルティ=1、ジョイニングペナルティ=20、ランダム化グループ長さ=0、足きりスコア=1、ウィンドウサイズ=配列長、ギャップペナルティ=5、ギャップサイズペナルティ=0.05、ウィンドウサイズ=500または対象アミノ酸配列の長さのうちの短い方。

#### 【0152】

内部欠失が原因ではなく、N-またはC-末端欠失に起因して対象配列が問い合わせ配列よりも短い場合には、結果に対して手動修正がなされなければならない。これは、全体的な同一性のパーセンテージを算出する場合に、FASTDBプログラムが対象配列のN-およびC-末端トランケーションを考慮しないからである。問い合わせ配列に関連して、N-およびC-末端で切断された対象配列に関し、同一性のパーセンテージが、問い合わせ配列の全体の塩基のパーセンテージとして、対応する対象の残基と一致/整列されない、対象配列のN-およびC-末端である問い合わせ配列の残基の数を算出することにより修正される。残基が一致/整列されるかどうかは、FASTDB配列アラインメントの結果により決定される。このパーセンテージは、その後、最終的な同一性のパーセンテージのスコアにたどり着くために、特定のパラメータを用いて上記FASTDBプログラムにより算出された同一性のパーセンテージから減算される。この最終的な同一性のパーセンテージのスコアは、本開示の目的で使用されるものである。問い合わせ配列と一致/整

10

20

30

40

50

列されない、対象配列の N - および C - 末端に対する残基のみが、同一性のパーセンテージスコアをマニュアルで調節する目的のために考慮される。つまり、対象配列の最も遠い N - および C - 末端の残基の外側の問い合わせ残基位置のみである。

#### 【0153】

例えば、90のアミノ酸残基対象配列は、同一性のパーセンテージを測定するために、100の残基の問い合わせ配列と整列される。欠失は、対象配列のN末端で生じ、よって、FASTDBアラインメントはN末端における最初の10の残基の一致/整列を示さない。10の非対の残基は、配列の10%を表し(問い合わせ配列における残基の総数と適合しない、N - および C - 末端の残基の数)、そして、10%は、FASTDBプログラムにより算出された同一性のパーセンテージスコアから除算される。残りの90残基が完全に一致する場合には、最終的な同一性のパーセンテージは90%になるであろう。他の例では、90の残基の対象配列は、100残基の問い合わせ配列と比較される。このとき、欠失は内部欠失であるため、問い合わせと一致/整列されない対象配列のN - またはC - 末端の残基を有しない。この場合、FASTDBにより算出される同一性のパーセンテージは、マニュアルで修正されない。繰り返すと、FASTDBアラインメントにより表示されるように、問い合わせ配列と一致/整列されない対象配列のN - および C - 末端の外側の残基位置のみがマニュアルで修正される。他のマニュアル修正は、本開示の目的のためにはなされない。

10

#### 【0154】

ポリヌクレオチド変異体は、コード領域、非コード領域、または両方において変更を含み得る。一実施形態では、ポリヌクレオチド変異体は、サイレント置換、付加、または欠失を生じさせる変更を含むが、コードされたポリペプチドの特性または活性を修飾しない。他の実施形態では、ヌクレオチド変異体は、遺伝子コードの縮重(degeneracy)に起因して、サイレント置換により産生される。他の実施形態では、変異体において5~10、1~5、または1~2のアミノ酸が、任意の組み合わせで置換され、欠失され、または付加される。ポリヌクレオチド変異体は、例えば、特定の宿主に関するコドンの発現を最適化するため(他への、例えば、大腸菌のような細菌宿主へのヒトmRNAにおける変化コドン(change codon))、のような種々の理由のために産生され得る。

20

#### 【0155】

天然起源の変異体は、「対立遺伝子変異体」と呼ばれ、生物の染色体上の所与の座を占める遺伝子のいくつかの代替的な形態の1つを指す(Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985))。これらの対立遺伝子変異体は、ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドレベルのいずれかを变化させ得、本開示に含まれる。代替的に、非天然起源の変異体は、突然変異誘発技術により、または、直接合成により産生され得る。

30

#### 【0156】

プロテインエンジニアリングおよび組換えDNA技術の既知の方法を用いて、変異体は、ポリペプチドの特性を向上または変化させるために生成され得る。例えば、1つまたはそれ以上のアミノ酸は、生物学的な機能が実質的に欠如することなく、分泌されたタンパク質のN末端またはC末端から欠失され得る。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ronet al., J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993)は、3、8、または27アミノ末端アミノ酸残基の欠失後であっても、ヘパリン結合活性を有する変異体KGFタンパク質を報告した。同様に、インターフェロンガンマは、このタンパク質のカルボキシ末端からの8~10アミノ酸残基の欠失後に、10倍までの高い活性を示した(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Dobeliet al., J. Biotechnology 7:199-216 (1988))。

40

#### 【0157】

さらに、変異体は、天然起源のタンパク質に生物活性に類似する生物活性を保持する場合が多い、ということを示している。例えば、Gayle and coworkers (参照

50

によりその全体が本明細書に組み込まれる、J.Biol. Chem 268:22105-22111 (1993) は、ヒトサイトカイン IL - 1 a の広範囲にわたる突然変異分析を行った。分子の全長にわたって、変異体ごとに平均して 2.5 のアミノ酸が変化している、3,500 を超える個々の IL - 1 a 突然変異体を生成するために、ランダム化した突然変異誘発を用いた。複数の突然変異が、可能性のあるアミノ酸位置ごとに試験された。研究者は、「分子のほとんどが「結合または生物活性」のいずれにも影響を及ぼさずに変更され得た」ということを見出した(要約参照)。実際に、試験された 3,500 を超えるヌクレオチド配列の中からは 23 の固有のアミノ酸配列が、野生型とは活性において著しく異なるタンパク質を産生した。

#### 【0158】

上記のように、ポリペプチド変異体は、例えば、修飾されたポリペプチドを含む。修飾は、例えば、アセチル化、アシル化、ADP - リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol) の共有結合、架橋結合、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合性架橋結合の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマ - カルボキシル化、グリコシル化、GPI アンカーの形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Meiet al., Blood 116:270-79 (2010))、タンパク質プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレン化 (selenoylation)、硫酸化、アルギニン化 (arginylation) のようなタンパク質へのアミノ酸の追加を媒介するトランスファー RNA、およびユビキチン化を含む。いくつかの実施形態では、FVIIII は、あらゆる都合のよい位置で修飾され、例えば、ペグ化されている。いくつかの実施形態では、FVIIII は、FVIIII の露出したアミノ酸の表面、例えば、操作されたシステインであり得る、システインが露出された表面でペグ化される(同上)。いくつかの実施形態では、修飾された FVIIII、例えば、ペグ化 FVIIII は、長時間作用性の FVIIII である。

#### 【0159】

本明細書で使用される「定常状態での分布の量 (Vss)」は、内部で薬物が分散する明白な空間 (量) である、薬理学で用いられる用語と同じ意味を有する。Vss = 定常状態での、体内における薬物の量を血漿濃度で除した値。

#### 【0160】

範囲に関する、本明細書で使用される「約」は、範囲の両端を修飾する。よって、「約 10 ~ 20」は「約 10 ~ 約 20」を意味する。

#### 【0161】

本明細書で用いられるキメラポリペプチドは、加工された FVIIII もしくは単鎖 FVIIII またはその組み合わせを含み得る。本明細書で使用される「加工された FVIIII」は、アルギニン 1648 (全長 FVIIII に関する) またはアルギニン 754 (Bドメイン欠失 FVIIII に関する)、つまり、細胞内プロセッシング部位で切断されている FVIIII を意味する。細胞内プロセッシング部位での切断に起因して、加工された FVIIII は、2つのポリペプチド鎖、すなわち重鎖である第 1 の鎖、および軽鎖である第 2 の鎖を含む。例えば、加工された FVIIII - Fc 融合タンパク質 (つまり、Fc に融合した重鎖および軽鎖) は、非還元 SDS - PAGE 上をそれぞれ約 90 kDa および 130 kDa、および還元 SDS - PAGE 上をそれぞれ 90 kDa および 105 kDa で流れる。よって、一実施形態では、キメラポリペプチドにおける FVIIII 部分の少なくとも約 50%、約 60%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、または約 100% が加工された FVIIII である。

#### 【0162】

他の実施形態では、キメラポリペプチドにおける FVIIII 部分の約 50%、約 60%

10

20

30

40

50

、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約100%が加工されたFV I I Iである。特定の実施形態では、加工されたFV I I Iを含むキメラポリペプチドは、単鎖FV I I Iを含むキメラポリペプチドから精製され（または分離され）、キメラポリペプチドにおけるFV I I I部分の少なくとも約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約100%が加工されたFV I I Iである。

【0163】

本明細書で使用される「単鎖FV I I I」または「SC FV I I I」という用語は、アルギニン部位（全長FV I I Iに関する残基1648（つまり、配列番号6の残基1667）、または、Bドメイン欠失FV I I Iに関する残基754（つまり、配列番号2の残基773）で切断されていないFV I I Iを意味する。よって、本明細書で用いられるキメラポリペプチドにおける単鎖FV I I Iは、単鎖を含む。一実施形態では、単鎖FV I I Iは、未変化の細胞内プロセシング部位を含む。単鎖FV I I I - Fc融合タンパク質は、非還元SDS - PAGE上を約220kDaで、還元SDS - PAGE上を約195kDaで流れ得る。

10

【0164】

一実施形態では、単鎖FV I I Iを含むキメラポリペプチドは、加工されたFV I I Iを含むキメラポリペプチドから精製され（または分離され）、本明細書で用いられるキメラポリペプチドのFV I I I部分の少なくとも約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、または約100%が、単鎖FV I I Iである。他の実施形態では、キメラポリペプチドのFV I I I部分の少なくとも約1%、約5%、約10%、約15%、約20%、または約25%が、単鎖FV I I Iである。他の実施形態では、本明細書で使用されるキメラポリペプチドのFV I I I部分の約1%～約10%、約5%～約15%、約10%～約20%、約15%～約25%、約20%～約30%、約25%～約35%、約30%～約40%が単鎖FV I I Iである。

20

【0165】

特定の実施形態では、本明細書で使用されるキメラポリペプチドのFV I I I部分の約1%、約5%、約10%、約15%、約20%、または約25%が単鎖FV I I Iである。他の実施形態では、本明細書で使用されるキメラポリペプチドのFV I I I部分の約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約100%が単鎖FV I I Iである。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドの加工されたFV I I Iに対する単鎖FV I I Iの比率は、(a) 約25%の単鎖FV I I Iおよび約75%の加工されたFV I I I；(b) 約20%の単鎖FV I I Iおよび約80%の加工されたFV I I I；(c) 約15%の単鎖FV I I Iおよび約85%の加工されたFV I I I；(d) 約10%の単鎖FV I I Iおよび約90%の加工されたFV I I I；(e) 約5%の単鎖FV I I Iおよび約95%の加工されたFV I I I；(f) 約1%の単鎖FV I I Iおよび約99%の加工されたFV I I I；または(g) 約100%の加工されたFV I I Iである。

30

【0166】

他の実施形態では、キメラポリペプチドの加工されたFV I I Iに対する単鎖FV I I Iの比率は、(a) 約30%の単鎖FV I I Iおよび約70%の加工されたFV I I I；(b) 約40%の単鎖FV I I Iおよび約60%の加工されたFV I I I；(c) 約50%の単鎖FV I I Iおよび約50%の加工されたFV I I I；(d) 約60%の単鎖FV I I Iおよび約40%の加工されたFV I I I；(e) 約70%の単鎖FV I I Iおよび加工された約30%のFV I I I；(f) 約80%の単鎖FV I I Iおよび約20%の加工されたFV I I I；(g) 約90%の単鎖FV I I Iおよび約10%の加工されたFV I I I；(h) 約95%の単鎖FV I I Iおよび約5%の加工されたFV I I I；(i) 約99%の単鎖FV I I Iおよび約1%の加工されたFV I I I；または(j) 約100%の単鎖FV I I Iである。

40

50

## 【 0 1 6 7 】

本明細書で用いられるキメラポリペプチドにおけるF V I I I部分は、F V I I I活性を有する。F V I I I活性は、当該技術分野で知られるあらゆる方法により測定され得る。例えば、これらの方法の1つは、発色アッセイであり得る。発色アッセイのメカニズムは、活性化第I X因子、リン脂質、およびカルシウムイオンの存在下で、活性化したF V I I Iが第X a因子への第X因子の変換を加速させる血液凝固カスケードの原理に基づく。第X a因子活性は、第X a因子に特異的なp - ニトロアニリド ( p N A ) 基質の加水分解により評価される。4 0 5 n Mで測定されるp - ニトロアニリンの放出の初速度は、第X a因子活性と直接的に比例し、よってサンプル中のF V I I I活性と比例する。

## 【 0 1 6 8 】

国際血栓止血学会 ( the International Society on Thrombosis and Hemostatsis ( IST H ) ) の学術標準化委員会 ( the Scientific and Standardization Committee ( SSC ) ) の分科委員会により、F V I I Iおよび第I X因子による発色アッセイが推奨されている。1 9 9 4年以來、発色アッセイは、F V I I Iの濃度の力価 ( p o t e n c y ) の決定に関する、ヨーロッパ薬局方の参照法となっている。よって、一実施形態では、F V I I I活性が発色アッセイによりi n v i t r oで測定される場合、単鎖F V I I Iを含むキメラポリペプチドは、加工されたF V I I Iを含むキメラポリペプチド ( 例えば、実質的に2つのF c部分および加工されたF V I I Iからなる、または、これらからなるキメラポリペプチドであって、上記加工されたF V I I Iは2つのF c部分のうち1つのF cに融合されている ) と同等のF V I I I活性を有する。

## 【 0 1 6 9 】

他の実施形態では、本開示の単鎖F V I I Iを含むキメラポリペプチドは、加工されたF V I I Iを含むキメラポリペプチド ( 例えば、実質的に2つのF c部分および加工されたF V I I Iからなる、または、これらからなるキメラポリペプチドであって、上記加工されたF V I I Iは2つのF c部分のうち1つのF cに融合されている ) と同等の第X a因子の生成比率を有する。

## 【 0 1 7 0 】

第X因子を第X a因子へと活性化させるために、活性化した第I X因子 ( 第I X a因子 ) は、C a <sup>2 +</sup>、膜リン脂質、およびF V I I I補助因子の存在下で、第X a因子を形成するために、第X因子における1つのアルギニン - イソロイシン結合を加水分解する。よって、F V I I Iの第I X因子との相互作用は、凝固経路において決定的である。ある特定の実施形態では、単鎖F V I I Iを含むキメラポリペプチドは、加工されたF V I I Iを含むキメラポリペプチド ( 例えば、実質的に2つのF c部分および加工されたF V I I Iからなる、または、これらからなるキメラポリペプチドであって、上記加工されたF V I I Iは2つのF c部分のうち1つのF cに融合されている ) と同等の速度で第I X因子と相互に作用し得る。

## 【 0 1 7 1 】

さらに、F V I I Iは、循環時に不活性であり、フォンウィルブランドフォンウィルブランド因子に結合されている。F V I I Iはv W Fに結合していない場合、急速に分解され、トロンビンの作用によりv W Fから放出される。いくつかの実施形態では、単鎖F V I I Iを含むキメラポリペプチドは、加工されたF V I I Iを含むキメラポリペプチド ( 例えば、実質的に2つのF c部分および加工されたF V I I Iからなる、または、これらからなるキメラポリペプチドであって、上記加工されたF V I I Iは2つのF c部分のうち1つのF cに融合されている ) と同等のレベルでフォンウィルブランド因子に結合する。

## 【 0 1 7 2 】

F V I I Iは、カルシウムおよびリン脂質の存在下で、活性化したプロテインCにより不活化され得る。活性化したプロテインCはA 1ドメインにおけるアルギニン3 3 6の後ろのF V I I I重鎖を切断して第X因子基質の相互作用部位を攪乱させ、A 2ドメインにおけるアルギニン5 6 2の後ろを切断してA 2ドメインの解離を高め、並びに、第I X a

10

20

30

40

50

因子を有する相互作用部位を攪乱させる。また、この切断は、A2ドメイン(43kDa)を二分し、A2-N(18kDa)およびA2-C(25kDa)ドメインを生成する。このように、活性化したプロテインCは、重鎖における複数の切断部位を触媒し得る。一実施形態では、単鎖FVIIを含むキメラポリペプチドは、加工されたFVIIを含むキメラポリペプチド(例えば、実質的に2つのFc部分および加工されたFVIIからなる、または、これらからなるキメラポリペプチドであって、上記加工されたFVIIは2つのFc部分のうち1つのFcに融合されている)と同等のレベルで活性化したプロテインCにより不活化される。

【0173】

他の実施形態では、単鎖FVIIを含むキメラポリペプチドは、加工されたFVIIを含むキメラポリペプチド(例えば、実質的に2つのFc部分および加工されたFVIIからなる、または、これらからなるキメラポリペプチドであって、上記加工されたFVIIは2つのFc部分のうち1つのFcに融合されている)と同等の*in vivo*でのFVII活性を有する。特定の実施形態では、単鎖FVIIを含むキメラポリペプチドは、HemAマウス尾静脈切断モデルにおいて、加工されたFVIIを含むキメラポリペプチド(例えば、実質的に2つのFc部分および加工されたFVIIからなる、または、これらからなるキメラポリペプチドであって、上記加工されたFVIIは2つのFc部分のうち1つのFcに融合されている)と同等のレベルでHemAマウスを保護することができる。

10

【0174】

本明細書で使用される用語「同等」は、キメラポリペプチドの使用から得られる、比較した速度またはレベルが、参照比率またはレベルと、同じ、実質的に同じ、または類似であることを意味する。本明細書で使用される用語「類似」は、比較した速度またはレベルが、参照速度またはレベル(例えば、実質的に2つのFc部分および加工されたFVIIからなる、または、これらからなるキメラポリペプチドによるFXa生成速度であって、上記加工されたFVIIは2つのFc部分のうち1つのFcに融合されている)と、10%を超えないまたは15%を超えない差異を有することを意味する。「実質的に同一」という用語は、比較した速度またはレベルが、参照速度またはレベルと、0.01%、0.5%、または1%を超えない差異を有することを意味する。

20

【0175】

本開示は、さらに、FVII活性を有するキメラポリペプチドを含み、少なくとも約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約85%、約90%、約95%、または約99%のキメラポリペプチドが、(単鎖FVIIである)FVII部分、および第2の部分を含む、組成物を含む。他の実施形態では、組成物におけるキメラポリペプチドの約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%が単鎖FVIIである。他の実施形態では、第2の部分はFcである。さらなる他の実施形態では、キメラポリペプチドは、他の半減期拡張部分、例えばアルブミンを含む。

30

【0176】

さらに他の実施形態では、本開示の組成物は、加工されたFVIIを含むキメラポリペプチドと単鎖FVIIを含むキメラポリペプチドとの組み合わせを含み、(a)キメラポリペプチドの約30%のFVII部分が単鎖FVIIであり、キメラポリペプチドの約70%のFVII部分が加工されたFVIIである；(b)キメラポリペプチドの約40%のFVII部分が単鎖FVIIであり、キメラポリペプチドの約60%のFVII部分が加工されたFVIIである；(c)キメラポリペプチドの約50%のFVII部分が単鎖FVIIであり、キメラポリペプチドの約50%のFVII部分が加工されたFVIIである；(d)キメラポリペプチドの約60%のFVII部分が単鎖FVIIであり、キメラポリペプチドの約40%のFVII部分が加工されたFVIIである；(e)キメラポリペプチドの約70%のFVII部分が単鎖FVIIであり、キメラポリペプチドの約30%のFVII部分が加工されたFVII

40

50

Iである；(f)キメラポリペプチドの約80%のFV I I I部分が単鎖FV I I Iであり、キメラポリペプチドの約20%のFV I I I部分が加工されたFV I I Iである；(g)キメラポリペプチドの約90%のFV I I I部分が単鎖FV I I Iであり、キメラポリペプチドの約10%のFV I I I部分が加工されたFV I I Iである；(h)キメラポリペプチドの約95%のFV I I I部分が単鎖FV I I Iであり、キメラポリペプチドの約5%のFV I I I部分が加工されたFV I I Iである；(i)キメラポリペプチドの約99%のFV I I I部分が単鎖FV I I Iであり、キメラポリペプチドの約1%のFV I I I部分が加工されたFV I I Iである；または(j)キメラポリペプチドの約100%のFV I I I部分が単鎖FV I I Iである。

【0177】

10

ある特定の実施形態では、本開示の組成物は、FV I I I活性が発色アッセイにより *in vitro* で測定される場合、加工されたFV I I Iを含む組成物（例えば、実質的に2つのFc部分および加工されたFV I I Iからなる、または、これらからなるキメラポリペプチドを含む組成物であって、上記加工されたFV I I Iは2つのFc部分のうち1つに融合されている）と同等のFV I I I活性を有する。

【0178】

他の実施形態では、本開示の組成物は、加工されたFV I I Iを含む組成物（例えば、実質的に2つのFc部分および加工されたFV I I Iからなる、または、これらからなるキメラポリペプチドを含む組成物であって、上記加工されたFV I I Iは2つのFc部分のうち1つのFcに融合されている）と同等の第Xa因子生成速度を有する。さらに他の実施形態では、単鎖FV I I Iを含む組成物は、加工されたFV I I Iを含む組成物（例えば、実質的に2つのFc部分および加工されたFV I I Iからなる、または、これらからなるキメラポリペプチドを含む組成物であって、上記加工されたFV I I Iは1つのFcに融合されている）と同等の速度で第IXa因子と相互に作用し得る。

20

【0179】

さらなる実施形態では、本組成物のキメラポリペプチドにおける単鎖FV I I Iは、組成物のキメラポリペプチドにおける加工されたFV I I I（例えば、実質的に2つのFc部分および加工されたFV I I Iからなる、または、これらからなるキメラポリペプチドを含む組成物であって、上記加工されたFV I I Iは2つのFc部分のうち1つのFcに融合されている）と同等のレベルで、活性化されたプロテインCにより不活化される。特定の実施形態では、単鎖FV I I Iを含む組成物は、加工されたFV I I Iを含む組成物（例えば、実質的に2つのFc部分および加工されたFV I I Iからなる、または、これらからなるキメラポリペプチドを含む組成物であって、上記加工されたFV I I Iは2つのFc部分のうち1つのFcに融合されている）と同等の *in vivo* でのFV I I I活性を有する。いくつかの実施形態では、本開示の単鎖FV I I Iを含む組成物は、HemAマウス尾静脈切断モデルにおいて、加工されたFV I I Iを含む組成物と同等のレベルでHemAマウスを保護することができる（例えば、実質的に2つのFc部分および加工されたFV I I Iからなる、または、これらからなるキメラポリペプチドを含む組成物であって、上記加工されたFV I I Iは2つのFc部分のうち1つのFcに融合されている）。

30

40

【0180】

本開示は、本明細書に開示される組成物を用いて、ヒト対象における出血状態を治療するための方法をさらに提供する。例となる方法は、FV I I I活性を有するキメラポリペプチドを含む、治療に有効な量の医薬組成物/製剤を、それを必要とする対象に投与することを含み、少なくとも約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約85%、約90%、約95%、または約99%のキメラポリペプチドが、（単鎖FV I I Iである）FV I I I部分および第2の部分を含む。

【0181】

出血状態は、血液凝固障害により生じ得る。また、血液凝固障害は、凝固障害と称することができる。一例では、本開示の医薬組成物により治療され得る血液凝固障害は、血友

50

病またはフォンウィルブランド病（vWD）である。他の例では、本開示の医薬組成物により治療され得る血液凝固障害は、血友病Aである。

【0182】

いくつかの実施形態では、出血状態に伴う出血のタイプは、関節出血、筋肉出血、経口出血、出血、筋肉内出血、経口出血、外傷、頭部の外傷、消化管出血、頭蓋内出血、腹腔内出血、胸腔内出血、骨折、中枢神経系出血、咽頭後隙での出血、腹膜後隙での出血、および腸腰筋鞘での出血から選択される。

【0183】

他の実施形態では、出血状態に苦しむ対象は、例えば、外科的予防または周術期管理を含む外科的処置に関する治療を必要とする。一例では、手術は、小手術および大手術から選択される。例となる外科手術は、抜歯、扁桃摘出術、鼠径部ヘルニア切開術、滑膜切除術、開頭術、骨接合術、外傷の手術、頭蓋内手術、腹腔内手術、胸腔内手術、関節置換術（例えば、人工膝関節全置換、人工股関節置換術等）、心臓手術、および帝王切開術を含む。

10

【0184】

他の例では、対象は、FIXにより同時に治療される。本開示の化合物はFIXaの活性化を可能とするため、それらは、対象へのFIXaの投与前に、FIXaポリペプチドを予備活性化（pre-activate）するために使用され得る。

【0185】

本明細書に開示される方法は、予防的処置またはオンデマンドでの治療を必要とする対象に実施され得る。

20

【0186】

少なくとも30%の単鎖FVIIを含む医薬組成物は、例えば、局所的（例えば、経皮または目）、経口、頬側、経鼻、膣、直腸、または非経口投与を含む、あらゆる適切な投与の手段のために処方され得る。

【0187】

本明細書で使用される用語、非経口は、皮下、皮内、血管内（例えば、静脈内）、筋肉内、脊髄、頭蓋内、髄腔内、眼内、眼球周囲、眼窩内、腱滑液鞘内、および腹腔内注入、並びにあらゆる類似の注入または注射技術を含む。また、組成物は、例えば、懸濁液、乳濁液、持続性の放出製剤、クリーム、ゲル、またはパウダーであり得る。組成物は、従来の結合剤および担体、例えばトリグリセリドを有する坐剤として処方され得る。

30

【0188】

一例では、薬学的製剤は、液体の製剤、例えば、緩衝、等張、水溶液である。他の例では、医薬組成物は、生理的なまたは生理的に近いpHを有する。他の例では、水性製剤は、生理的なまたは生理的に近いモル浸透圧濃度および塩分を有する。それは、塩化ナトリウムおよび/または酢酸ナトリウムを含み得る。いくつかの例では、本開示の組成物は凍結乾燥されている。いくつかの実施形態では、医薬組成物は免疫細胞を含まない。いくつかの実施形態では、医薬組成物は細胞を含まない。

【0189】

また、本開示は、(a)凝固因子部分およびFc部分を含むキメラポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物、並びに(b)凝固因子に対する免疫寛容を必要とする対象に組成物を投与するための指示、を含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットにおけるキメラポリペプチドは、FVII部分、FVII部分、またはFIX部分を含む。他の実施形態では、キットにおけるキメラポリペプチドは、FVII単量体と二量体のハイブリッド、FVII単量体と二量体のハイブリッド、またはFIX単量体と二量体のハイブリッドである。いくつかの実施形態では、上記指示は、凝固因子に対する免疫寛容を必要とする対象を特定するための少なくとも1つのステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、免疫寛容を必要とする対象を特定するためのステップは：

40

(i)凝固因子遺伝子における突然変異または欠失を有する対象を特定すること；

50

- ( i i ) 凝固因子遺伝子における再構成を有する対象を特定すること；
- ( i i i ) 凝固因子に対する阻害性免疫応答をこれまでに発生したことがある親族を有する対象を特定すること；
- ( i v ) インターフェロン療法を受けている対象を特定すること；
- ( v ) 抗ウイルス療法を受けている対象を特定すること；
- ( v i ) 阻害性免疫応答の発生のリスクの増加に関連する、凝固因子をコードする遺伝子以外の遺伝子における遺伝子突然変異を有する対象を特定すること；および
- ( v i i ) これらのうち2つまたはそれ以上の組み合わせ、  
からなる群のうち1つまたはそれ以上を含む。

## 【 0 1 9 0 】

いくつかの実施形態では、凝固因子をコードする遺伝子以外の遺伝子における遺伝子突然変異は、

- ( i ) T N F - の増加に関連する遺伝子多型；
- ( i i ) I L 1 0 の増加に関連する遺伝子多型；
- ( i i i ) C T L A - 4 の減少に関連する遺伝子多型；
- ( i v ) D R 1 5 または D Q B 0 6 0 2 M H C クラス I I 分子における突然変異；および
- ( v ) これらのうち2つまたはそれ以上の組み合わせを有する、  
からなる群から選択される1つまたはそれ以上の突然変異を含む。

## 【 0 1 9 1 】

任意に、キットの包装に伴い、薬学的または生物学的製品の製造、使用、または販売を規制する政府機関により規定された形態での注記 ( n o t i c e ) であり得、その注記は、ヒトへの投与に関する製造、使用、または販売の機関による認可を示す。

## 【 0 1 9 2 】

実施形態

E 1 . 凝固因子に対する免疫寛容を誘導することを、それを必要とする対象において行う方法であって、キメラポリペプチドを当該対象に投与することを含み、キメラポリペプチドは凝固因子部分および F c 部分を含む、方法。

## 【 0 1 9 3 】

E 2 . 凝固因子に対する阻害物質の発生を防止または阻害する方法であって、凝固因子に対する免疫寛容を必要とする対象にキメラポリペプチドを投与することを含み、キメラポリペプチドは凝固因子部分および F c 部分を含む、方法。

## 【 0 1 9 4 】

E 3 . 実施形態 E 1 または E 2 の方法であって、対象は、同等投与量の、凝固因子からなるポリペプチドを投与された場合に、凝固因子に対する阻害性免疫応答を発生する、方法。

## 【 0 1 9 5 】

E 4 . 実施形態 E 1 から E 3 のいずれかの方法であって、対象は、凝固因子に対する阻害性免疫応答を発生している、方法。

## 【 0 1 9 6 】

E 5 . 実施形態 E 1 から E 4 のいずれかの方法であって、対象は、これまで凝固因子による治療を行ったことがない、方法。

## 【 0 1 9 7 】

E 6 . 実施形態 E 1 から E 5 のいずれかの方法であって、凝固因子部分は、第 V I I 因子、第 I X 因子、第 V I I 因子、フォンウィルブランド因子、またはその断片を含む、方法。

## 【 0 1 9 8 】

E 7 . 実施形態 E 1 から E 5 のいずれかの方法であって、対象は胎児であり、方法は、キメラポリペプチドを胎児の母親に投与することをさらに含み、対象への投与は胎盤を介して母親から行う、方法。

10

20

30

40

50

## 【0199】

E 8 . 実施形態 E 7 の方法であって、凝固因子部分は、第 V I I I 因子、第 I X 因子、第 V I I 因子、フォンウィルブランド因子、またはその断片を含む、方法。

## 【0200】

E 9 . 実施形態 E 1 から E 6 のいずれかの方法であって、対象は子供または大人である、方法。

## 【0201】

E 1 0 . 実施形態 E 9 の方法であって、対象は、1 歳未満、2 歳未満、3 歳未満、4 歳未満、5 歳未満、6 歳未満、7 歳未満、8 歳未満、9 歳未満、1 0 歳未満、1 1 歳未満、または 1 2 歳未満の子供である、方法。

10

## 【0202】

E 1 1 . 実施形態 E 1 0 の方法であって、子供は 1 歳未満である、方法。

## 【0203】

E 1 2 . 実施形態 E 1 1 の方法であって、子供または大人は出血障害を発症し、出血障害の徴候の始まりは 1 歳以降である、方法。

## 【0204】

E 1 3 . 実施形態 E 1 から E 1 2 のいずれかの方法であって、投与は、体液性の免疫応答、細胞媒介性の免疫応答、または凝固因子に対する体液性の免疫応答および細胞媒介性の免疫応答の両方、から選択される免疫応答の発生を防止、阻害、または低減するのに十分である、方法。

20

## 【0205】

E 1 4 . 実施形態 E 1 から E 1 3 のいずれかの方法であって、組成物は繰り返す投与にて投与される、方法。

## 【0206】

E 1 5 . 実施形態 E 1 4 の方法であって、繰り返す投与のそれぞれは、少なくとも約 1 2 時間、少なくとも約 2 4 時間、少なくとも約 2 日、少なくとも約 3 日、少なくとも約 4 日、少なくとも約 5 日、少なくとも約 6 日、少なくとも約 7 日、少なくとも約 8 日、少なくとも約 9 日、少なくとも約 1 0 日、少なくとも約 1 1 日、少なくとも約 1 2 日、少なくとも約 1 3 日、少なくとも約 1 4 日、または少なくとも約 1 5 日により、他から隔てられている、方法。

30

## 【0207】

E 1 6 . 実施形態 E 1 4 または E 1 5 の方法であって、繰り返す投与は、少なくとも約 2 回の投与、少なくとも約 5 回の投与、少なくとも約 1 0 回の投与、少なくとも約 2 0 回の投与、少なくとも約 2 5 回の投与、少なくとも約 3 0 回の投与、少なくとも約 3 5 回の投与、少なくとも約 4 0 回の投与、少なくとも約 4 5 回の投与、少なくとも約 5 0 回の投与、少なくとも約 5 5 回の投与、少なくとも約 6 0 回の投与、少なくとも約 6 5 回の投与、または少なくとも約 7 0 回の投与を含む、方法。

## 【0208】

E 1 7 . 実施形態 E 1 6 の方法であって、繰り返す投与は、約 2 回の投与～約 1 0 0 回の投与、約 5 回の投与～約 8 0 回の投与、約 1 0 回の投与～約 7 0 回の投与、約 1 0 回の投与～約 6 0 回の投与、約 1 0 回の投与～約 5 0 回の投与、約 1 5 回の投与～約 4 0 回の投与、約 1 5 回の投与～約 3 0 回の投与、約 2 0 回の投与～約 3 0 回の投与、または約 2 0 回の投与～約 4 0 回の投与、を含む、方法。

40

## 【0209】

E 1 8 . 実施形態 E 1 6 または E 1 7 の方法であって、繰り返す投与は、約 2 回の投与、約 5 回の投与、約 1 0 回の投与、約 1 5 回の投与、約 2 0 回の投与、約 2 5 回の投与、約 3 0 回の投与、約 3 5 回の投与、約 4 0 回の投与、約 4 5 回の投与、約 5 0 回の投与、約 5 5 回の投与、約 6 0 回の投与、約 6 5 回の投与、約 7 0 回の投与、約 7 5 回の投与、約 8 0 回の投与、約 9 0 回の投与、または約 1 0 0 回の投与を含む、方法。

## 【0210】

50

E 1 9 . 実施形態 E 1 4 から E 1 8 のいずれかの方法であって、繰り返す投与の後に、対象は、凝固因子を含むが F c 部分を含まない、凝固因子タンパク質を含む医薬組成物をさらに投与される、方法。

【 0 2 1 1 】

E 2 0 . 実施形態 E 1 9 の方法であって、凝固因子タンパク質は、全長または成熟した凝固因子である、方法。

【 0 2 1 2 】

E 2 1 . 実施形態 E 1 9 の方法であって、凝固因子タンパク質は、F c 部分以外の、1 つまたはそれ以上の半減期を延長する部分を含む、方法。

【 0 2 1 3 】

E 2 2 . 実施形態 E 1 から E 2 1 のいずれかの方法であって、投与が 1 つまたはそれ以上の出血の発症を治療する、方法。

【 0 2 1 4 】

E 2 3 . 実施形態 E 1 から E 2 2 のいずれかの方法であって、投与が 1 つまたはそれ以上の出血の発症を防止する、方法。

【 0 2 1 5 】

E 2 4 . 実施形態 E 1 から E 2 3 のいずれかの方法であって、投与が 1 つまたはそれ以上の出血の発症の発症時治療である、方法。

【 0 2 1 6 】

E 2 5 . 実施形態 E 1 から E 2 3 のいずれかの方法であって、対象は、外科的予防、周術期管理、または外科的処置に関する治療を必要とする、方法。

【 0 2 1 7 】

E 2 6 . 実施形態 E 2 5 の方法であって、外科的処置は、小手術、大手術、抜歯、扁桃摘出術、鼠径部ヘルニア切開術、滑膜切除術、人工膝関節全置換、開頭術、骨接合術、外傷の手術、頭蓋内手術、腹腔内手術、胸腔内手術、または関節置換術を含む、方法。

【 0 2 1 8 】

E 2 7 . 実施形態 E 1 3 から E 2 6 のいずれかの方法であって、免疫応答は、凝固因子に対する阻害抗体の生成を含む、方法。

【 0 2 1 9 】

E 2 8 . 実施形態 E 2 7 の方法であって、抗体濃度は少なくとも 0 . 6 ベセスダ単位 ( B U ) である、方法。

【 0 2 2 0 】

E 2 9 . 実施形態 E 2 8 の方法であって、抗体濃度は少なくとも 5 B U である、方法。

【 0 2 2 1 】

E 3 0 . 実施形態 E 1 3 から E 2 6 のいずれかの方法であって、免疫応答は、細胞媒介性の免疫応答を含む、方法。

【 0 2 2 2 】

E 3 1 . 実施形態 E 3 0 の方法であって、細胞媒介性の免疫応答は、I L - 1 2、I L - 4、および T N F - からなる群から選択されるサイトカインの放出を含む、方法。

【 0 2 2 3 】

E 3 2 . 実施形態 E 1 3 から E 3 1 のいずれかの方法であって、免疫応答は、増加した出血傾向、高い凝固因子の消費、凝固因子治療に対する反応の欠如、凝固因子治療の減少した効能、および凝固因子の短くなった半減期、からなる群から選択される臨床症状を含む、方法。

【 0 2 2 4 】

E 3 3 . 実施形態 E 1 から E 3 2 のいずれかの方法であって、対象は、凝固因子遺伝子における突然変異または欠失を含む、方法。

【 0 2 2 5 】

E 3 4 . 実施形態 E 1 から E 3 2 のいずれかの方法であって、対象は、凝固因子遺伝

10

20

30

40

50

子における再構成を有する、方法。

【0226】

E35. 実施形態E1からE34のいずれかの方法であって、対象は、重篤な血友病を有する、方法。

【0227】

E36. 実施形態E1からE34のいずれかの方法であって、対象は、これまでに凝固因子に対して阻害性免疫応答を発生したことがある親族を有する、方法。

【0228】

E37. 実施形態E1からE36のいずれかの方法であって、対象は、インターフェロン療法を受けている、方法。

10

【0229】

E38. 実施形態E1からE37のいずれかの方法であって、対象は、抗ウイルス療法を受けている、方法。

【0230】

E39. 実施形態E1からE38のいずれかの方法であって、対象は、TNF-の増加に関連する遺伝子多型を有する、方法。

【0231】

E40. 実施形態E39の方法であって、多型はTNF-308G>Aである、方法。

【0232】

E41. 実施形態E1からE40のいずれかの方法であって、対象は、IL10の増加に関連する遺伝子多型を有する、方法。

20

【0233】

E42. 実施形態E41の方法であって、多型はIL10Gマイクロサテライトの対立遺伝子134である、方法。

【0234】

E43. 実施形態E1からE42のいずれかの方法であって、対象は、CTLA-4発現の減少に関する遺伝子多型を有する、方法。

【0235】

E44. 実施形態E1からE43のいずれかの方法であって、対象は、DR15またはDQB0602 MHCクラスII分子における突然変異を有する、方法。

30

【0236】

E45. 実施形態E1からE44のいずれかの方法であって、対象は、150凝固因子暴露日(ED)未満である、方法。

【0237】

E46. 実施形態E45の方法であって、対象は、50ED未満である、方法。

【0238】

E47. 実施形態E46の方法であって、対象は、20ED未満である、方法。

【0239】

E48. 実施形態E3からE47のいずれかの方法であって、阻害性のFVIIII免疫応答が、全長または成熟したFVIIII凝固因子に応答して発生した、方法。

40

【0240】

E49. 実施形態E3からE48のいずれかの方法であって、阻害性免疫応答は、組換えFVIIII製品に対する応答を発生させる、阻害物質FVIIII応答である、方法。

【0241】

E50. 実施形態E1からE49のいずれかの方法であって、投与は、投与前の数と比較して、対象におけるFVIIIIに対する抗体の数を減少させる、方法。

【0242】

E51. 実施形態E1からE50のいずれかの方法であって、投与は、投与前の力価と比較して、対象におけるFVIIIIに対する抗体の力価を減少させる、方法。

50

## 【0243】

E52. 実施形態E1からE51のいずれかの方法であって、投与は、投与前のレベルと比較して、対象におけるサイトカインのレベルを減少させる、方法。

## 【0244】

E53. 実施形態E1からE52のいずれかの方法であって、投与は、FVIIIポリペプチドからなるポリペプチドによるこれまでの治療後の対象における数と比較して、対象におけるFVIIIに対する抗体の数を減少させる、方法。

## 【0245】

E54. 実施形態E1からE53のいずれかの方法であって、投与は、FVIIIポリペプチドからなるポリペプチドによるこれまでの治療後の対象における力価と比較して、対象におけるFVIIIに対する抗体の力価を減少させる、方法。

10

## 【0246】

E55. 実施形態E1からE54のいずれかの方法であって、投与は、FVIIIポリペプチドからなるポリペプチドによるこれまでの治療後の対象におけるレベルと比較して、対象におけるサイトカインのレベルを減少させる、方法。

## 【0247】

E56. 実施形態E1からE55のいずれかの方法であって、投与は、対象への凝固因子部分からなるポリペプチドの投与からもたらされる数と比較して、対象における抗凝固因子抗体の数を減少させる、方法。

## 【0248】

20

E57. 実施形態E1からE56のいずれかの方法であって、投与は、対象への凝固因子部分からなるポリペプチドの投与からもたらされるであろう力価と比較して、対象における抗凝固因子抗体の力価を減少させる、方法。

## 【0249】

E58. 実施形態E1からE57のいずれかの方法であって、投与は、対象への凝固因子部分からなるポリペプチドの投与からもたらされるであろうレベルと比較して、対象におけるサイトカインのレベルを減少させる、方法。

## 【0250】

E59. 実施形態E52、E55、またはE58の方法であって、サイトカインは、IL-12、IL-4、およびTNF からなる群から選択される、方法。

30

## 【0251】

E60. 実施形態E1からE59のいずれかの方法であって、キメラポリペプチドの投与前に、

- (a) 凝固因子をコードする遺伝子における突然変異または欠失を有する；
- (b) 凝固因子をコードする遺伝子における再構成を有する；
- (c) これまでに凝固因子に対して阻害性免疫応答を発生したことがある親族を有する；

(d) インターフェロン治療を受けている；

(e) 抗ウイルス療法を受けている；

(f) 阻害性免疫応答を発生するリスクの増加に関連する凝固因子をコードする遺伝子以外の遺伝子における遺伝子突然変異を有する；および

40

(g) これらの2つまたはそれ以上の組み合わせを有する、からなる群から選択される1つまたはそれ以上の特性を対象が有するということを特定することをさらに含む、方法。

## 【0252】

E61. 実施形態E60の方法であって、凝固因子をコードする遺伝子以外の遺伝子における遺伝子突然変異が、

(i) TNF- の増加に関連する遺伝子多型；

(ii) IL10の増加に関連する遺伝子多型；

(iii) CTLA-4の減少に関連する遺伝子多型；

50

( i v ) D R 1 5 または D Q B 0 6 0 2 M H C クラス I I 分子における突然変異 ; および

( v ) これらの 2 つまたはそれ以上の組み合わせを有する、  
からなる群から選択される 1 つまたはそれ以上の突然変異を含む、方法。

【 0 2 5 3 】

E 6 2 . 実施形態 E 6 1 の方法であって、 T N F - の増加に関連する多型は、 3 0 8 G > A である、方法。

【 0 2 5 4 】

E 6 3 . 実施形態 E 6 1 の方法であって、 I L 1 0 の増加に関連する多型は、 I L 1 0 G マイクロサテライトの対立遺伝子 1 3 4 である、方法。

【 0 2 5 5 】

E 6 4 . 実施形態 E 6 、 E 8 から E 6 2 のいずれかの方法であって、 F V I I I 部分は F V I I I A 3 ドメインを含む、方法。

【 0 2 5 6 】

E 6 5 . 実施形態 E 6 、 E 8 から E 6 3 のいずれかの方法であって、 F V I I I 部分はヒト F V I I I を含む、方法。

【 0 2 5 7 】

E 6 6 . 実施形態 E 6 、 E 8 から E 6 4 のいずれかの方法であって、 F V I I I 部分は B ドメインの全部または部分的な欠失を有する、方法。

【 0 2 5 8 】

E 6 7 . 実施形態 E 6 、 E 8 から E 6 6 のいずれかの方法であって、 F V I I I 部分は、シグナル配列を有しない表 2 に示される F V I I I アミノ酸配列 ( 配列番号 2 のアミノ酸 2 0 ~ 1 4 5 7 ; 配列番号 6 のアミノ酸 2 0 ~ 2 3 5 1 ) と少なくとも 9 0 % または 9 5 % 同一である、方法。

【 0 2 5 9 】

E 6 8 . 実施形態 E 6 、 E 8 から E 6 6 のいずれかの方法であって、 F V I I I 部分は、シグナル配列を有しない表 2 に示される F V I I I アミノ酸配列 ( 配列番号 2 のアミノ酸 2 0 ~ 1 4 5 7 ; 配列番号 6 のアミノ酸 2 0 ~ 2 3 5 1 ) と同一である、方法。

【 0 2 6 0 】

E 6 9 . 実施形態 E 6 、 E 8 から E 6 6 のいずれかの方法であって、 F V I I I 部分は、シグナル配列を有する表 2 に示される F V I I I アミノ酸配列 ( 配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 1 4 5 7 または配列番号 6 のアミノ酸 1 ~ 2 3 5 1 ) と少なくとも 9 0 % または 9 5 % 同一である、方法。

【 0 2 6 1 】

E 7 0 . 実施形態 E 6 、 E 8 から E 6 6 のいずれかの方法であって、 F V I I I 部分は、シグナル配列を有する表 2 に示される F V I I I アミノ酸配列 ( 配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 1 4 5 7 または配列番号 6 のアミノ酸 1 ~ 2 3 5 1 ) と同一である、方法。

【 0 2 6 2 】

E 7 1 . 実施形態 E 6 、 E 8 から E 7 0 のいずれかの方法であって、 F V I I I 部分は凝固活性を有する、方法。

【 0 2 6 3 】

E 7 2 . 実施形態 E 1 から E 7 1 のいずれかの方法であって、 F c 部分は、表 2 に示される ( 配列番号 2 のアミノ酸 1 4 5 8 ~ 1 6 8 4 または配列番号 6 のアミノ酸 2 3 5 2 ~ 2 5 7 8 ) F c アミノ酸配列と同一である、方法。

【 0 2 6 4 】

E 7 3 . 実施形態 E 1 から E 7 2 のいずれかの方法であって、キメラポリペプチドは、キメラポリペプチドに関する第 2 のポリペプチドを含むハイブリッドの形態であり、第 2 のポリペプチドは、実質的に F c 部分または F c R n 結合パートナーからなり、または、 F c 部分または F c R n 結合パートナーからなる、方法。

【 0 2 6 5 】

10

20

30

40

50

E 7 4 . 実施形態 E 1 から E 7 3 のいずれかの方法であって、キメラポリペプチドは、10 ~ 100 IU / kg の各投与量で投与される、方法。

【0266】

E 7 5 . 実施形態 E 7 4 の方法であって、投与量は、10 ~ 20、20 ~ 30、30 ~ 40、40 ~ 50、50 ~ 60、60 ~ 70、70 ~ 80、80 ~ 90、または90 ~ 100 IU / kg である、方法。

【0267】

E 7 6 . 実施形態 E 7 5 の方法であって、投与量は、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100 IU / kg である、方法。

10

【0268】

E 7 7 . 実施形態 E 1 から E 7 6 のいずれかの方法であって、対象は、出血凝固疾患、関節出血、筋肉出血、経口出血、出血、筋肉内出血、経口出血、外傷、頭部の外傷、消化管出血、頭蓋内出血、腹腔内出血、胸腔内出血、骨折、中枢神経系出血、咽頭後隙での出血、腹膜後隙での出血、および腸腰筋鞘での出血からなる群から選択される出血状態を有する、方法。

【0269】

E 7 8 . 実施形態 E 7 7 の方法であって、出血凝固疾患は血友病 A である、方法。

【0270】

E 7 9 . 実施形態 E 6、E 8 から E 6 3 のいずれかの方法であって、凝固因子部分が第 I X 因子を含む、方法。

20

【0271】

E 8 0 . 実施形態 E 7 9 の方法であって、第 I X 因子タンパク質は、シグナル配列を有しない表 2 に示される F I X アミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸 20 ~ 1457；配列番号 6 のアミノ酸 20 ~ 2351）と少なくとも 90%、95%、または 100% 同一である、方法。

【0272】

E 8 1 . 実施形態 E 6、E 8 から E 6 3 のいずれかの方法であって、キメラポリペプチドは、F I X 部分および F c 部分または F c R n 結合パートナーを含む第 1 の鎖と、実質的に F c 部分からなるまたは F c 部分からなる第 2 の鎖とを含む単量体と二量体のハイブリッドである、方法。

30

【0273】

E 8 2 . 実施形態 E 6、E 8 から E 6 3 のいずれかの方法であって、キメラポリペプチドが第 V I I 因子部分を含む、方法。

【0274】

E 8 3 . 実施形態 E 8 2 の方法であって、キメラポリペプチドは、F V I I 部分および F c 部分を含む第 1 の鎖と、実質的に F c 部分からなるまたは F c 部分からなる第 2 の鎖とを含む単量体と二量体のハイブリッドである、方法。

【0275】

E 8 4 . 実施形態 E 8 2 または E 8 3 の方法であって、F V I I 部分は、不活性の F V I I、活性化した F V I I、または活性化可能な F V I I である、方法。

40

【0276】

E 8 5 . ( a ) 凝固因子部分および F c 部分または F c R n 結合パートナー部分を含むキメラポリペプチド、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物、並びに ( b ) 凝固因子に対する免疫寛容を必要とする対象に組成物を投与するための指示、を含むキット。

【0277】

E 8 6 . 実施形態 E 8 5 のキットであって、キメラポリペプチドは、F V I I I 部分、F V I I 部分、または F I X 部分を含む、キット。

【0278】

50

E 8 7 . 実施形態 E 8 6 のキットであって、キメラポリペプチドは、F V I I I 単量体と二量体のハイブリッド、F V I I 単量体と二量体のハイブリッド、または F I X 単量体と二量体のハイブリッドである、キット。

【 0 2 7 9 】

E 8 8 . 実施形態 E 8 5 から E 8 7 のいずれかのキットであって、指示は、凝固因子に対する免疫寛容を必要とする対象を特定するための少なくとも 1 つのステップをさらに含む、キット。

【 0 2 8 0 】

E 8 9 . 実施形態 E 8 8 のキットであって、免疫寛容を必要とする対象を識別するためのステップは、

- ( a ) 凝固因子遺伝子における突然変異または欠失を有する対象を特定すること；
  - ( b ) 凝固因子遺伝子における再構成を有する対象を特定すること；
  - ( c ) これまでに凝固因子に対して阻害性免疫応答を発生したことがある親族を有する対象を特定すること；
  - ( d ) インターフェロン治療を受けている対象を識別すること；
  - ( e ) 抗ウイルス療法を受けている対象を特定すること；
  - ( f ) 阻害性免疫応答を発生するリスクの増加に関連する凝固因子をコードする遺伝子以外の遺伝子における遺伝子突然変異を有する対象を特定すること；および
  - ( g ) これらの 2 つまたはそれ以上の組み合わせを有する、
- からなる群からの 1 つまたはそれ以上を含む、キット。

【 0 2 8 1 】

E 9 0 . 実施形態 E 8 9 のキットであって、凝固因子をコードする遺伝子以外の遺伝子における遺伝子突然変異が、

- ( i ) T N F - の増加に関連する遺伝子多型；
  - ( i i ) I L 1 0 の増加に関連する遺伝子多型；
  - ( i i i ) C T L A - 4 の減少に関連する遺伝子多型；
  - ( i v ) D R 1 5 または D Q B 0 6 0 2 M H C クラス I I 分子における突然変異；および
  - ( v ) これらの 2 つまたはそれ以上の組み合わせを有する、
- からなる群から選択される 1 つまたはそれ以上の突然変異を含む、キット。

【 0 2 8 2 】

E 9 1 . 実施形態 E 1 から E 8 4 のいずれかの方法であって、投与後に、阻害性免疫応答のレベルを測定することをさらに含む、方法。

【 0 2 8 3 】

E 9 2 . 実施形態 E 9 1 の方法であって、投与後の阻害性免疫応答のレベルを、投与前の阻害性免疫応答のレベルと比較することをさらに含む、方法。

【 0 2 8 4 】

E 9 3 . 実施形態 E 9 1 または E 9 2 の方法であって、阻害性免疫応答は、F V I I I に対する抗体の発生である、方法。

【 0 2 8 5 】

E 9 4 . 実施形態 E 9 1 または E 9 2 の方法であって、阻害性免疫応答はサイトカインの分泌である、方法。

【 0 2 8 6 】

詳細に本発明をここに記載したが、同記載は、例示のみの目的でこれにより含まれ、本発明の限定を意図としない、以下の実施例の参照により、より明確に理解されるであろう。本明細書で言及される全ての特許および出版物は、参照により明示的に組み込まれる。

【実施例】

【 0 2 8 7 】

[ 実施例 1 ]

r F V I I I F c のクローニング、発現および精製

分子生物学手順は全て標準的な技術に従って行った。天然シグナル配列を含む、ヒト F V I I I のコード配列 ( GenBank アクセション番号 NM\_000132 ) を、ヒト肝臓ポリ A RNA から逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 ( RT-PCR ) によって得た。 F V I I I のサイズが大きいことから、コード配列を別々の RT-PCR 反応からのいくつかの部分の状態を得て、一連の PCR 反応、制限酵素消化 ( restriction digest ) およびライゲーションを通して、セリン 743 ( S743 ) をグルタミン 1638 ( Q1638 ) に融合して、完全長 F V I I I の B ドメインから 2682 bp を除去した B ドメイン欠失 ( BDD ) F V I I I コード領域を含有する中間体クローニングベクターに構築した。ヒト IgG1 Fc 配列 (例えば、 GenBank アクセション番号 Y14735 ) を、白血球 cDNA ライブラリーからの PCR によって得て、 BDD F V I I I 配列が介在リンカー無しで Fc 配列の N 末端 ( ヒンジ、 CH2 および CH3 ドメイン、 IgG1 配列の D221 から開始、 EU 番号付け ) に直接融合されるように、最終的な発現カセットを作製した。 Fc 鎖のみを発現させるために、マウス Ig ( カッパ ) 軽鎖シグナル配列を合成オリゴヌクレオチドを用いて作製し、 PCR を用いて Fc コード配列に付加して、このタンパク質産物の分泌を可能にさせた。 F V I I I Fc および Fc 鎖コード配列をデュアル発現ベクターである pBudCE4.1 ( インビトロジェン社、カリフォルニア州カールズバッド ) にクローニングした。

10

#### 【 0288 】

リポフェクタミントランスフェクション試薬 ( インビトロジェン社、カリフォルニア州カールズバッド ) を用いて、 HEK293H 細胞 ( インビトロジェン社、カリフォルニア州カールズバッド ) に pSYN-FV I I I -013 プラスミドをトランスフェクションし、安定な細胞株を zeocin を用いて選択した。細胞を無血清浮遊培養で増殖させ、 F V I I I 特異的親和性精製ステップ ( McCue J. et al., J. Chromatogr. A., 1216(45): 7824-30 (2009) )、その後のイオン交換カラムおよび疎水性相互作用カラムの組み合わせを含む 4 つのカラム精製プロセスを用いて、不純物を取り除いた ( clarified ) 回収培地から r F V I I I Fc タンパク質を精製した。

20

#### [ 実施例 2 ]

#### 【 0289 】

r F V I I I Fc の特徴付け

( a ) 生化学的な特徴付け

プロセッシングされた組換え F V I I I -Fc ( r F V I I I Fc ) を 2 つのポリペプチド鎖として合成し、一方の鎖は IgG1 の Fc ドメイン ( ヒンジ、 CH2 および CH3 ドメイン ) ( 226 アミノ酸、 D221 から G456 まで伸長、 EU 番号付け ) に融合した BDD-F V I I I ( S743-Q1638 融合、 1438 アミノ酸 ) から成り、全体の鎖の長さは 1664 アミノ酸であり、もう一方の鎖は同じ Fc 領域のみから成る ( 226 アミノ酸 )。 F V I I I Fc / Fc デュアル発現プラスミドをトランスフェクトされた細胞は 3 つの産物 ( F V I I I Fc 二量体、 F V I I I Fc 単量体、および Fc 二量体 ) を分泌することが予測されたが、 F V I I I Fc 単量体および Fc 二量体のみが条件培地中で検出された。精製 F V I I I Fc を非還元および還元 SDS-PAGE 解析 ( 図 2 A および図 2 B ) によって解析した。非還元 SDS-PAGE において、 F V I I I Fc の重鎖 ( HC ) および軽鎖-二量体 Fc 融合物 ( LCFc2 ) の予想分子量と一致する、およそ 90 kDa および 130 kDa に移動しているバンドが見出された ( 図 2 A、レーン 3 )。また、3 本目のバンドがおよそ 220 kDa の位置に検出され、これは 754 位 ( 完全長配列に対しては 1648 ) のアルギニン残基が分泌中に切断されていない単鎖 F V I I I Fc ( SC F V I I I Fc ; HC + LCFc2 ) の予想分子量と一致する。還元 SDS-PAGE 解析において、単鎖 Fc、HC、LCFc、および SC F V I I I Fc の予想分子量と一致する、およそ 25 kDa、90 kDa、105 kDa、および 195 kDa に移動している主要なバンドが見られた ( 図 2 B、レーン 3 )。プロタンパク質転換酵素サブチリシン ( subtilisin ) / ケキシン ( PCSK ) 型プロテアーゼのメンバーであるヒト PC5 の同時トランスフェクションは、 r F V I I I Fc 産物の完全なプロセシン

30

40

50

グをもたらした(図2A、2B、レーン2)。

【0290】

SDS-PAGE後のいくつかのrFVIIIFc群の濃度測定解析によって、予測バンドが98%超の純度であることが示された。サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いて存在する凝集の程度も評価したところ、全ての群が0.5%以下の凝集レベルを有することが判った。

【0291】

rFVIIIFc構造をトロンピン切断、還元、およびLC/UVおよびLC/MSによる解析によってさらに解析した。トロンピンにより生成される4つのFVII断片(372位、740位および795位(795は完全長FVII配列においての1689に一致)における3つのアルギニン残基での切断による)は、UV吸光度によって検出することができ(図2C)、タンパク質の以下の部分:Fc(ピーク1)、軽鎖-Fc(ピーク2);重鎖由来A1ドメイン(ピーク3)および重鎖由来A2ドメイン(ピーク4)に対応する。14のアミノ酸Bドメインリンカーおよび約6kDaのa3関連ペプチドは、それらのサイズが小さいため、UV吸光度によって検出されない。

10

【0292】

同時トランスフェクトされたプロセシング酵素無しで産生されたrFVIIIFcポリペプチドは、15~25%の単鎖FVIIIFc(SC FVIIIFc)を示し、これは、R754およびE755(完全長FVIIにおいてR1648/E1649)の間の単一ペプチド結合によってプロセシングされたrFVIIIFcと異なる。このアイソフォームを精製し、上記全ての生化学分析において特徴付けしたところ、以下に示すように、rFVIIIFcと遜色ないことが判った。精製単鎖FVIIIFcの活性は、発色アッセイにおいて、さらに下記の種々の機能分析によって、rFVIIIFcと類似していることが判った。

20

【0293】

(b) 発色アッセイおよび一段階aPTTアッセイ(One-Stage aPTT Assay)によるFVII活性の測定

FVII活性をFVII発色アッセイによって測定した。4つの別々のrFVIIIFc群からの平均比活性は、発色アッセイにより、 $2148 \pm 99 \text{ IU/nmol}$ に相当する、 $9762 \pm 449 \text{ IU/mg}$ であることが判った。単鎖FVII:FcのFVII活性も発色アッセイによって測定し、完全にプロセシングされたrFVIIIFcまたはrFVIIIFc DS(約25%の単鎖rFVIIIFcを含有)と比較した。表3Aに示す通り、単鎖rFVIIIFcは、フォンウィルブランド因子(VWF)の存在下および非存在下の両方で、発色アッセイによって完全にプロセシングされたFVIIIFcまたはrFVIIIFc DSのFVII活性と比較されたFVII活性において、有意差を示さなかった。表3Bは、一段階活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)アッセイで測定されたSCrFVIIIFcの完全な活性がVWF非存在下で観察されたことを示している。

30

## 【表 1】

表 3A：発色アッセイによる FVIII 活性

マトリックス	試料	発色比活性 (IU/mg)	%CV*
FVIII 欠乏血漿	rFVIIIIFcDS (25%NP) (RECD-19189-09-013)	9066	2.49
	単鎖 rFVIIIIFc (RECD 19189-09-013 から精製)	8194	2.72
	完全にプロセシングされた rFVIIIIFc (操作細胞株から精製)	9577	8.34
FVIII および vWF 欠乏血漿	rFVIIIIFcDS (25%NP) (RECD-19189-09-013)	10801	8.92
	単鎖 rFVIIIIFc (RECD19189-09-013 から精製)	9498	4.70
	完全にプロセシングされた rFVIIIIFc (操作細胞株から精製)	9569	4.54

\*CV=変動係数

10

20

30

## 【表 2】

表 3B: aPTT アッセイによる FVIII 活性

マトリックス	試料	凝固 (aPTT) 比活性 (IU/mg)	%CV
FVIII-欠乏血漿	rFVIIIIFcDS (25%NP) (RECD-19189-09-013)	8210	5.88
	単鎖 rFVIIIIFc (RECD 19189-09-013 から精製)	3108	6.57
	完全にプロセシングされた rFVIIIIFc (操作細胞株から精製)	8683	3.57
FVIII および vWF 欠乏血漿	rFVIIIIFcDS (25%NP) (RECD-19189-09-013)	15621	6.47
	単鎖 rFVIIIIFc (RECD 19189-09-013 から精製)	13572	2.41
	完全にプロセシングされた rFVIIIIFc (操作細胞株から精製)	15170	10.42

10

20

30

## 【0294】

(c) テナーゼ複合体 (Xase Complex) の活性

テナーゼ複合体との関連で、FVII活性も、カルシウム存在下でリン脂質表面上の活性化FIXおよびトロンビン活性化REFACTO (登録商標) またはrFVIIIFcタンパク質をインキュベートし、発色基質または蛍光発生基質の切断によって測定されるFXのFxaへの変換をモニターすることによって測定し、それからFXa生成速度が決定される。このアッセイを次に、それぞれの個々の成分同士の相互作用を調べるために、アッセイの1構成要素を、その他は一定に保ちつつ変更することによって改変した。

## 【0295】

rFVIIIFc DS、rBDD FVII、および単鎖rFVIIIFcについて、合成リン脂質小胞 (25%ホスファチジル (phosphatidyl) セリン / 75%ホスファチジル (phosphatidyl) コリン) を用いて、FXa生成速度を、変動するリン脂質濃度の関数として決定した (図3A)。両方のタンパク質が、およそ156 μMリン脂質においてピーク活性がある同様の活性プロファイルを有することが判った。

40

## 【0296】

次に、FXa生成速度を、変動するFX濃度の関数として決定し、 $K_m$  および  $V_{max}$  の値を算出した (図3B)。rFVIIIFc DS、rBDD FVII、および単鎖rFVIIIFcの活性プロファイルが同様であり、同様の $K_m$  および  $V_{max}$  を有することが判った (表4)。最後に、FXa生成速度を、変動するFIX濃度の関数として決定した (図3C)。活性プロファイルは同様であり、同様の $K_d$  および  $V_{max}$  を有す

50

るように思われた（表5）。同様の結果がリン脂質源として血小板を用いて得られた（未公開データ、2009年6月）。

【表3】

表4. リン脂質上のFVIIIタンパク質のFXa生成パラメーター

脂質源	分子	Km (nM)	Vmax (nM/分)
25%PS-75%PC	rFVIII Fc DS	55.0 ± 5.9	65.6 ± 8.6
	rBDD FVIII	51.0 ± 8.7	73.5 ± 10.1
	NP rFVIII Fc	53.2 ± 7.5	56.0 ± 13.8

10

【表4】

表5. FVIIIタンパク質とのFIXaの相互作用

脂質源	分子	Km (nM)	Vmax (nM/分)
25%PS-75%PC	rFVIII Fc DS	2.8 ± 0.4	4.5 ± 0.3
	rBDD FVIII	2.5 ± 0.3	4.0 ± 1.0
	NP rFVIII Fc	2.3 ± 0.2	3.8 ± 0.4

20

【0297】

(d) APCによる不活性化

活性化すると、FVIIIは活性化プロテインC (APC) による切断によって、およびA2ドメインの解離によって、不活性化される。rFVIII FcおよびrBDD FVIIIを共にトロンビンによって活性化させ、その後、APCと一緒に様々な時間インキュベートし、FXa生成アッセイによって活性を決定した（図4）。トロンビン活性化が無い場合、FXa生成はほとんど検出されず、FXa生成は、トロンビン消化によって有意に増加した。90分間のAPC処理によって、非活性化試料と同様の、FXa生成速度における有意な減少がもたらされ、これらの結果はrFVIII Fc DS、rBDD FVIII、および単鎖rFVIII Fcと同様であった。

30

【0298】

(e) vWF親和性

フォンウィルブランド因子 (vWF) とのFVIIIの相互作用を、表面プラズモン共鳴 (SPR) 技術に基づくリアルタイム生体分子相互作用解析 (BIAcore) によって測定し、vWFに対するrFVIII FcおよびrBDD FVIIIの結合反応速度を決定した（表6）。 $K_a$  (結合速度) および $K_d$  (解離速度) の反応速度パラメータ、並びに親和性 $K_D$  ( $K_d / K_a$ ) を、同一の条件下でそれぞれのFVIII相互作用について決定した。rFVIII FcおよびrBDD FVIIIは共に、それぞれ $1.64 \pm 0.37$  nMおよび $0.846 \pm 0.181$  nMの、vWFに対する低nMの結合親和性 ( $K_D$ ) を有することが判った。前記タンパク質は同様の解離速度を有し、結合速度には2倍の差異があり、それにより、親和性において2倍の差異があった。

40

## 【表5】

表6. vWFに対するFVIIIタンパク質のBiocore結合解析

分析物	リガ ンド	N	反応速度パラメーター		解離速度/結合速度
			結合速度 ( $M^{-1}s^{-1}$ )	解離速度 ( $s^{-1}$ )	KD (M)
rFVIIIIFc DS	hvWf	5	7.92 ± 1.51x10 <sup>5</sup>	1.25 ± 1.12x10 <sup>-3</sup>	1.64 ± 0.37x10 <sup>-9</sup>
NP rFVIIIIFc	hvWf	5	8.66 ± 1.10x10 <sup>5</sup>	1.09 ± 0.09x10 <sup>-3</sup>	1.28 ± 0.22x10 <sup>-9</sup>
rBDD FVIII	hvWf	5	13.7 ± 1.50x10 <sup>5</sup>	1.14 ± 0.12x10 <sup>-3</sup>	0.846 ± 0.181x10 <sup>-9</sup>

10

## 【0299】

表6に示される通り、rFVIIIFc DSまたは単鎖rFVIIIFcのvWFとの親和性は、低nM範囲であり、BDD FVII単独の親和性のおよそ2倍大きいことが判った。生理的濃度において、これは、遊離FVIIと比較して、vWFと複合体形成したrFVIIIFc（プロセッシングを受けた、または単鎖）の割合におけるわずかな減少をもたらすであろうとされたが、インビボ研究によって、rFVIIIFcの半減期がこのわずかに低い親和性にもかかわらず完全長またはBDD FVIIを超えて有意に延長されるため、これが前記分子の半減期を損なっていないように思われることが、示された。遊離rFVIIIFcはFcRn経路を介してより効率的に再利用され得ることから、半減期のより長い延長に寄与する。

20

## 【実施例3】

## 【0300】

## rFVIIIFc第I相/I Ia相臨床試験

第I相/I Ia相、非盲検、クロスオーバー、用量漸増、多施設、且つファースト・イン・ヒューマンの試験を設計し、重度の(1IU/dL[1%]未満の内在性FVII[FVII])と定義)血友病Aを有する対象における単回投与量のrFVIIIFcの安全性、忍容性、および薬物動態を評価した。全部でおよそ12人の治療歴のある患者が登録され、25または65IU/kgのrFVIIIFcを投与された。スクリーニング(ADVATE(登録商標)[rFVII])、参照比較剤の初回投与に先立ち28日間以内に予定)、および最初の注射に先立ってFVII処置無しで4日間(96時間)以上経過した後、およそ6人の対象が、ADVATE(登録商標)の単回25IU/kg投与とその後の3日間(72時間)の薬物動態学的(PK)プロファイルを受け、その後、クロスオーバーされ、7日間(168時間)のPKプロファイリングのために、rFVIIIFcの25IU/kgの単回、非盲検投与を受けた。最初の3人の対象に順次投与を行った。25IU/kgのrFVIIIFcを投与したその最初の3人の対象について、それぞれの対象はrFVIIIFcの注射から14日(336時間)後に阻害物質評価(inhibitorassessment)を受けた。阻害物質試験が完了した後に、次の対象の投与(最初の3人の対象に対してのみ)を行った。3番目の対象が14日間の阻害物質評価を完了した後、残りの、3人の25IU/kg対象および6人の65IU/kg対象は、各投与群内で少なくとも1日離れて順次、登録を開始した。

30

40

## 【0301】

最後の対象が25IU/kg用量のrFVIIIFcを受けた1週間後に、およそ6人の個別の対象を65IU/kgコホートのために募集した。65IU/kgコホートの各

50

対象は単回65 IU/kg用量のADVATE（登録商標）、次に4日間（96時間）のPKプロファイリングを受け、その後クロスオーバーし、65 IU/kg単回、非盲検用量のrFVIIIFcを受け、10日間（240時間）のプロファイリングを受けた。いかなるコホートにおいてもrFVIIIFcの最初の注射の前に出血の発症が生じた場合は、対象の試験前FVIIIFc産物を治療のために使用し、PKプロファイルのために最初のrFVIIIFc注射を受けさせる前に少なくとも4日間の期間を経過させる必要があった。

#### 【0302】

全ての対象は、安全性評価用に25 IU/kgまたは65 IU/kgのrFVIIIFcを投与された後に、14日間（336時間）および28日間の安全性評価期間を受けた。全ての対象は、所望の時点におけるFVIIIFc活性を解析するために、血液試料と共に、投与前および投与後に薬物動態学的サンプリングを受けた。

10

#### 【0303】

第I相/I Ia相臨床試験の薬物動態データは、FVIIIFcについて以下の結果を示した。FVIIIFcは、ADVATE（登録商標）（完全長rFVIIIFc）と比較して、全身暴露（AUC<sub>INF</sub>）において約50%の増加、クリアランス（CL）において約50%の減少、並びに排出半減期およびMRTにおいて約50~70%の増加を有した。さらに、FVIIIFcは、ADVATE（登録商標）と比較して、C168、TBLP1、TBLP3、およびTBLP5の値の増加を示した。

20

#### 【0304】

測定されたPKパラメーターは、以下の通りであった：

AUC<sub>INF</sub>：ゼロから無限大までの濃度-時間曲線の下領域

HL：排出相半減期； $t_{1/2}$ とも称される

C168：投与のおよそ168時間後のベースラインを超える推定FVIIIFc活性

CL：クリアランス

MRT：平均滞留時間

TBLP1：FVIIIFc活性がベースラインを越えておよそ1 IU/dLに低減した時の投与後時間のモデル予想

TBLP3：FVIIIFc活性がベースラインを越えておよそ3 IU/dLに低減した時の投与後時間のモデル予想

30

TBLP5：FVIIIFc活性がベースラインを越えておよそ5 IU/dLに低減した時の投与後時間のモデル予想。

[実施例4]

#### 【0305】

rFVIIIFcの薬物動態（PK）

組換えBドメイン欠失FVIIIFc（rFVIIIFc）融合タンパク質を、FVIIIFcの半減期を延長させるためのアプローチとして作製した。rFVIIIFcの薬物動態（PK）を、血友病Aマウスにおいて、rFVIIIFcと比較した。rFVIIIFcと比較して、rFVIIIFcの終末相半減期は2倍長かった。半減期延長の基となる機構がFcRnによるrFVIIIFcの保護によるものであることを確認するために、FcRnノックアウトマウスおよびヒトFcRn遺伝子導入マウスにおいてPKを評価した。

40

#### 【0306】

単回静脈内用量（125 IU/kg）を投与し、色素生産活性アッセイを用いて血漿中濃度を測定した。C<sub>max</sub>は、両方のマウス系統において、rFVIIIFcおよびrFVIIIFc（XYNTHA（登録商標））間で同様であった。しかし、rFVIIIFcの半減期はFcRnノックアウトマウスにおいてはrFVIIIFcの半減期と同程度であったが、rFVIIIFcの半減期はhFcRn遺伝子導入マウスにおいてrFVIIIFcの半減期よりもおよそ2倍に長く延長した。これらの結果により、FcRnが、rFVIIIFcと比較したrFVIIIFcの半減期の延長を仲介する、またはそれに関与することが確認された。回転式トロンボエラストメリー（rotation thromboelastometry：ROTEM

50

(登録商標))により測定される全血における血流遮断が、血友病マウスの出血モデルにおける、および臨床応用における凝固因子の有効性と相関することが示されているため、ROTEM(登録商標)を用いて、血友病AマウスにおけるrFVIIIFcの生体外有効性の評価に努めた。

#### 【0307】

血友病Aマウスに、単回静脈内用量50IU/kgのrFVIIIFc、XYNTHA(登録商標)(FVII)またはADVATE(登録商標)(FVII)を投与した。投与の5分後、血餅形成は、凝固時間(CT)、血餅形成時間(CFT)および角度に関して同様であった。しかし、rFVIIIFcは、rFVIIIFcのPK延長と一致して、XYNTHA(登録商標)(FVII)およびADVATE(登録商標)(FVII)の両方と比較して、投与の72時間後および96時間後にCTの有意な向上を示し、CFTおよび角度もまた96時間の時点において向上した。これらの結果は、rFVIIIFcが、半減期の延長、および出血からの長期保護を与える可能性をもたらす、明確な作用機序を有することを示した。

10

#### [実施例5]

#### 【0308】

##### rFVIIIFc第I相/I Ia相臨床試験の結果

本実施例は、25IU/kgおよび65IU/kgのFVII産物で処置された16人の患者から得られた、FVII活性の最終的な解析結果を提供する。実施例3を参照されたい。rFVIIIFcは組換え融合タンパク質は、組換えBドメイン欠失ヒトFVII(BDD-rFVII)が介在リンカー配列無しでヒトIgG1の二量体Fcドメインに融合した単一分子から成る。このタンパク質構築体は、rFVIIIFcヘテロ二量体ハイブリッドタンパク質、FVIIIFc単量体Fc融合タンパク質、FVIIIFc単量体ハイブリッド、単量体FVIIIFcハイブリッド、およびFVIIIFc単量体-二量体とも称される。実施例1、図1、および表2Aを参照されたい。

20

#### 【0309】

rFVIIIFcを用いた前臨床試験によって、市販のrFVIIIFc製品と比較して、rFVIIIFc活性の半減期のおよそ2倍の延長が示された。この試験の根拠は、凍結液中の単回投与量のrFVIIIFcの安全性および忍容性を評価し、重度の血友病A対象におけるPKについてのデータを提供することであった。この試験において、16人の評価可能な対象をPK評価に利用することができた。rFVIIIFcおよびADVATE(登録商標)両方の2用量の単回投与を、25IU/体重kg(n=6)および65IU/体重kg(n=10)の名目用量で、およそ10分間にわたって静脈内注入した。血漿PK評価用の血液試料を、注入前、および投与後10日目まで得た。ADVATE(登録商標)およびrFVIIIFcの両方のFVIIIFc活性のPKを、モデル依存的な方法を用いるこの試験において特徴付けした。

30

#### 【0310】

##### 目的

この試験の主目的は、重度の血友病Aを有する12歳以上の前治療のある患者(PTP)における、rFVIIIFc(25および65IU/kg)の2用量の単回投与の安全性および忍容性を評価することであった。二次目的は、一段階凝固アッセイおよび発色アッセイにおいて、ADVATE(登録商標)と比較して、25IU/kgまたは65IU/kgのrFVIIIFcの単回投与後に、経時的なFVIIIFcの薬力学的(PD)活性によって決定される、薬物動態(PK)パラメーターを決定することであった。

40

#### 【0311】

##### 試験デザイン(実施例3参照)

血液試料を、スクリーニングのための来院時(28日ADVATE(登録商標)投与前の28日間以内)に；注射前、並びに注射の10分後および30分後並びに1、3、6、および9時間後の0日目(ADVATE(登録商標)の注射)に；ADVATE(登録商標)注射の24時間後の1日目に；ADVATE(登録商標)注射の48時間後の2日目

50

に；ADVATE（登録商標）の72時間後の3日目に；並びに高用量ADVATE（登録商標）注射（コホートBのみ）の96時間後の4日目に、FVII活性PK評価用に採集した。

#### 【0312】

血液試料を、rFVIIIFcの投与直前、rFVIIIFc注射の10分後および30分後並びに1、3、6、および9時間後のrFVIIIFc注入日に；rFVIIIFc注射の24時間後の1日目に；rFVIIIFc注射の48、72、96、および120時間後の2～5日目に；rFVIIIFcの168時間後の7日目に；高用量rFVIIIFc注射（コホートBのみ）の192、216、および240時間後の8、9、および10日目に、FVII活性PK評価用に採集した。rFVIIIFc注射の672時間後の最後の試験のための来院時（rFVIIIFc注射の28日後）に、FVII活性も測定した。

#### 薬物動態学的モデリング

##### 略語

TBLP1：FVII活性がベースラインを越えておよそ1IU/dLに低減する投与後時間のモデル予想

TBLP3：FVII活性がベースラインを越えておよそ3IU/dLに低減する投与後時間のモデル予想

##### 算出

$KV\_M = C_{max} \_M / \text{実際用量 (IU/kg)}$

$KV\_OB = C_{max} \_OB / \text{実際用量 (IU/kg)}$

$IVR\_M = 100 \times C_{max} \_M \times \text{血漿量 (dL)} / \text{全量 (IU)}$ ；ここで、血漿量 (mL) =  $(23.7 \times Ht (cm)) + (9.0 \times Wt (kg)) - 1709$ 。

$IVR\_OB = 100 \times C_{max} \_OB \times \text{血漿量 (dL)} / \text{全量 (IU)}$ ；ここで、血漿量 (mL) =  $(23.7 \times Ht (cm)) + (9.0 \times Wt (kg)) - 1709$ 。

#### 【0313】

##### 結果

##### (a) 単回用量薬物動態（一段階アッセイ）

観察されたFVII活性は、ADVATE（登録商標）またはrFVIIIFcいずれかの短時間IV注入後に急激に増加し、平均（±標準偏差）モデル予測 $C_{max}$ 値は、それぞれ25IU/kg用量群および65IU/kg用量群について、ADVATE（登録商標）で $56.6 \pm 4.74$  IU/dLおよび $121 \pm 28.2$  IU/dL、rFVIIIFcで $55.6 \pm 8.18$  IU/dLおよび $108 \pm 16.9$  IU/dLであった。全てのADVATE（登録商標）処置患者およびrFVIIIFc処置患者は、FVII活性において用量依存的に増加した。 $C_{max}$ および $AUC_{INF}$ の両方において観察された増加は、評価された用量範囲にわたって、用量比例にわずかに満たなかった。

#### 【0314】

注入終了後、観察されたFVII活性の低下は、ベースラインレベルに達するまで単一指数関数的な減衰特徴を示した。FVII活性の低下速度はADVATE（登録商標）よりもrFVIIIFcにおいてより遅く、排出半減期の平均（±標準偏差）モデル予想値は、それぞれ25IU/kg用量群および65IU/kg用量群について、ADVATE（登録商標）で $11.9 \pm 2.98$ 時間および $10.4 \pm 3.03$ 時間、rFVIIIFcで $18.0 \pm 3.88$ 時間および $18.4 \pm 6.99$ 時間であった。排出半減期の値は、両方のFVII産物について評価された用量範囲にわたって、用量依存的であるように思われた。

#### 【0315】

全身FVII暴露（ $AUC_{INF}$ で評価）は、ADVATE（登録商標）投与後よりもrFVIIIFc投与後に、25IU/kg服用レベルおよび65IU/kg服用レベルのそれぞれにおいて、約48%および61%大きかった。平均（±標準偏差）モデル予想 $AUC_{INF}$ 値は、それぞれ25IU/kg用量群および65IU/kg用量群につい

10

20

30

40

50

て、ADVATE（登録商標）において  $974 \pm 259$  および  $1810 \pm 606$  時間 \* IU/dL、並びに rFV I I I F c において  $1440 \pm 316$  および  $2910 \pm 1320$  時間 \* IU/dL であった。

【0316】

排出半減期と同様、MRTはADVATE（登録商標）と比較して rFV I I I F c において延長した。MRTの平均（±標準偏差）モデル予想値は、それぞれ 25 IU/kg 用量群および 65 IU/kg 用量群について、ADVATE（登録商標）では  $17.1 \pm 4.29$  および  $14.9 \pm 4.38$  時間、並びに rFV I I I F c では  $25.9 \pm 5.60$  および  $26.5 \pm 10.1$  時間であった。MRT値は、両方のFV I I I 産物について評価された用量範囲にわたって用量非依存的であるように思われた。

10

【0317】

さらに、CLおよびVの一次PKパラメータ値を決定した。rFV I I I F c のCL値は、同等投与量でADVATE（登録商標）において観察されたCL値の約66%しか占めなかった。平均（±標準偏差）モデル予想CL値は、それぞれ 25 IU/kg 用量群および 65 IU/kg 用量群について、ADVATE（登録商標）で  $2.70 \pm 0.729$  および  $4.08 \pm 1.69$  mL/時間/kg、並びに rFV I I I F c で  $1.80 \pm 0.409$  および  $2.69 \pm 1.25$  mL/時間/kg であった。V値はADVATE（登録商標）および rFV I I I F c の間で同等であり、平均（±標準偏差）モデル予想V値は、それぞれ 25 IU/kg 用量群および 65 IU/kg 用量群について、ADVATE（登録商標）で  $43.9 \pm 4.27$  および  $56.1 \pm 13.4$  mL/kg、rFV I I I F c で  $45.3 \pm 7.23$  および  $61.6 \pm 10.6$  mL/kg であった。平均CL値および平均V値におけるわずかな増加が、ADVATE（登録商標）および rFV I I I F c の用量の増加と共に確認されたが；制限された服用レベルと相まった、65 IU/kg 用量における標準偏差の増加によって、これらのパラメータの用量依存性の評価は交絡した。例えば、rFV I I I F c 処置群のCV%幾何平均CL値は、23.0%（25 IU/kg）から48.6%（65 IU/kg）まで増加した。

20

【0318】

一次PKパラメータに加えて、二次PKパラメータ（例えばK値、IVR等）を決定してFV I I I 効果持続期間を評価した。また、PKの相違を示す証拠が rFV I I I F c において観察され、同等投与量のADVATE（登録商標）と比較した場合にTBLP1値およびTBLP3値の増加を示した。ADVATE（登録商標）および rFV I I I F c のIVRおよびK値は同等であるように思われた。TBLP1値およびTBLP3値におけるわずかな増加が、ADVATE（登録商標）および rFV I I I F c が用量が増加するにつれて観察された。対照的に、平均IVRおよびK値におけるわずかな減少が、ADVATE（登録商標）および rFV I I I F c の用量が増加するにつれて確認された。以前に示されたように、これらパラメータの用量依存性の評価は、制限された投与レベルによって交絡した。

30

【0319】

観察されたTBLP1の平均（±標準偏差）は、それぞれ 25 IU/kg 用量群および 65 IU/kg 用量群について、ADVATE（登録商標）で  $2.88 \pm 0.733$  および  $2.93 \pm 0.848$  IU/dL / IU/kg、並びに rFV I I I F c で  $4.28 \pm 0.873$  および  $5.16 \pm 2.02$  IU/dL / IU/kg であった。観察されたTBLP3の平均（±標準偏差）は、それぞれ 25 IU/kg 用量群および 65 IU/kg 用量群について、ADVATE（登録商標）で  $2.06 \pm 0.527$  および  $2.26 \pm 0.666$  IU/dL / IU/kg、並びに rFV I I I F c で  $3.09 \pm 0.623$  および  $3.93 \pm 1.59$  IU/dL / IU/kg であった。

40

【0320】

観察されたC<sub>max</sub>値を用いて算出された平均IVRおよびK値（ベースラインおよびモデル内残留薬剤で減法）は、概して、モデル予想C<sub>max</sub>値を用いて決定された値よりも大きく；一区画モデルを用いた、観察されたピーク活性のわずかな過小推定と一致した

50

。観察されたK値の平均(±標準偏差)は、それぞれ25 IU/kg用量群および65 IU/kg用量群について、ADVATE(登録商標)で $2.57 \pm 0.198$ および $2.13 \pm 0.598$  IU/dL/IU/kg、並びにrFVIIIFcで $2.46 \pm 0.330$ および $1.85 \pm 0.332$  IU/dL/IU/kgであった。観察されたIVR値の平均(±標準偏差)は、それぞれ25 IU/kg用量群および65 IU/kg用量群について、ADVATE(登録商標)で $94.1 \pm 15.6$ および $85.8 \pm 16.5\%$ 、並びにrFVIIIFcで $89.5 \pm 11.9$ および $74.8 \pm 6.72\%$ であった。

#### 【0321】

##### (b) 単回用量薬物動態(発色アッセイ)

観察されたFVII活性は、ADVATE(登録商標)またはrFVIIIFcのいずれの短時間IV注入後にも急激に増加し、それぞれ25 IU/kg用量群および65 IU/kg用量群について、平均(±標準偏差)モデル予想 $C_{max}$ 値は、ADVATE(登録商標)で $70.2 \pm 9.60$ および $157 \pm 38.6$  IU/dL、並びにrFVIIIFcで $70.3 \pm 10.0$ および $158 \pm 34.7$  IU/dLであった。

#### 【0322】

全てのADVATE(登録商標)処置患者およびrFVIIIFc処置患者は、FVII活性における用量依存的な増加を有した。 $C_{max}$ および $AUC_{INF}$ の両方において観察された増加は、評価された用量範囲にわたって、用量比例にわずかに満たなかった。

#### 【0323】

注入終了後、観察されたFVII活性の低下は、ベースラインレベルに達するまで単一指数関数的な減衰特徴を示した。FVII活性の低下速度はADVATE(登録商標)よりもrFVIIIFcにおいてより遅く、排出半減期の平均(±標準偏差)モデル予想値は、それぞれ25 IU/kg用量群および65 IU/kg用量群について、ADVATE(登録商標)で $10.7 \pm 1.98$ 時間および $10.3 \pm 3.27$ 時間、rFVIIIFcで $16.2 \pm 2.92$ 時間および $19.0 \pm 7.94$ 時間であった。排出半減期の値は、両方のFVII産物について評価された用量範囲にわたって、用量依存的であるように思われた。

#### 【0324】

全身FVII暴露( $AUC_{INF}$ で評価)は、ADVATE(登録商標)投与後よりもrFVIIIFc投与後に、25 IU/kg服用レベルおよび65 IU/kg服用レベルのそれぞれにおいて、約53%および84%大きかった。平均(±標準偏差)モデル予想 $AUC_{INF}$ 値は、それぞれ25 IU/kg用量群および65 IU/kg用量群について、ADVATE(登録商標)において $1080 \pm 236$ および $2320 \pm 784$ 時間\*IU/dL、並びにrFVIIIFcにおいて $1650 \pm 408$ および $4280 \pm 1860$ 時間\*IU/dLであった。

#### 【0325】

排出半減期と同様、MRTはADVATE(登録商標)と比較してrFVIIIFcにおいて延長した。MRTの平均(±標準偏差)モデル予想値は、それぞれ25 IU/kg用量群および65 IU/kg用量群について、ADVATE(登録商標)では $15.3 \pm 2.86$ および $14.8 \pm 4.72$ 時間、並びにrFVIIIFcでは $23.4 \pm 4.22$ および $27.3 \pm 11.4$ 時間であった。MRT値は、両方のFVII産物について評価された用量範囲にわたって用量非依存的であるように思われた。

#### 【0326】

さらに、CLおよびVの一次PKパラメータ値を決定した。rFVIIIFcのCL値は、同等投与量でADVATE(登録商標)において観察されたCL値の約58~66%しか占めなかった。平均(±標準偏差)モデル予想CL値は、それぞれ25 IU/kg用量群および65 IU/kg用量群について、ADVATE(登録商標)で $2.39 \pm 0.527$ および $3.21 \pm 1.40$  mL/時間/kg、並びにrFVIIIFcで $1.57 \pm 0.349$ および $1.86 \pm 0.970$  mL/時間/kgであった。V値はADVA

10

20

30

40

50

T E (登録商標) および r F V I I I F c の間で同等であり、平均 (±標準偏差) モデル予想 V 値は、それぞれ 25 IU / kg 用量群および 65 IU / kg 用量群について、A D V A T E (登録商標) で  $35.8 \pm 5.52$  および  $43.6 \pm 11.2$  mL / kg、並びに r F V I I I F c で  $35.9 \pm 6.65$  および  $42.7 \pm 8.91$  mL / kg であった。平均 C L 値および平均 V 値における増加が、A D V A T E (登録商標) および r F V I I I F c の用量の増加と共に確認されたが；制限された服用レベルと相まった、65 IU / kg における標準偏差の増加によって、これらのパラメーターの用量依存性の評価は交絡した。

#### 【0327】

一次 P K パラメーターに加えて、二次 P K パラメーター (例えば K 値、I V R 等) を決定して F V I I I 効果持続期間を評価した。また、P K の相違を示す証拠が r F V I I I F c において観察され、同等投与量の A D V A T E (登録商標) と比較した場合に T B L P 1 値および T B L P 3 値の増加を示した。A D V A T E (登録商標) および r F V I I I F c の I V R および K 値は同等であるように思われた。

10

#### 【0328】

T B L P 1 値および T B L P 3 値におけるわずかな増加が、A D V A T E (登録商標) および r F V I I I F c が用量が増加するにつれて観察された。対照的に、平均 I V R および K 値におけるわずかな減少が、A D V A T E (登録商標) および r F V I I I F c の用量が増加するにつれて確認された。以前に示されたように、これらパラメーターの用量依存性の評価は、制限された投与レベルによって交絡した。

20

#### 【0329】

観察された T B L P 1 の平均 (±標準偏差) は、それぞれ 25 IU / kg 用量群および 65 IU / kg 用量群について、A D V A T E (登録商標) で  $2.70 \pm 0.511$  および  $3.09 \pm 0.978$  IU / d L / IU / kg、並びに r F V I I I F c で  $4.06 \pm 0.798$  および  $5.66 \pm 2.38$  IU / d L / IU / kg であった。観察された T B L P 3 の平均 (±標準偏差) は、それぞれ 25 IU / kg 用量群および 65 IU / kg 用量群について、A D V A T E (登録商標) で  $1.98 \pm 0.377$  および  $2.39 \pm 0.718$  IU / d L / IU / kg、並びに r F V I I I F c で  $3.04 \pm 0.598$  および  $4.44 \pm 1.84$  IU / d L / IU / kg であった。

#### 【0330】

観察された  $C_{m a x}$  値を用いて算出された平均 I V R および K 値 (ベースラインおよびモデル内残留薬剤で減法) は、概して、モデル予想  $C_{m a x}$  値を用いて決定された値よりも大きく；一区画モデルを用いた、観察されたピーク活性のわずかな過小推定と一致した。観察された K 値の平均 (±標準偏差) は、それぞれ 25 IU / kg 用量群および 65 IU / kg 用量群について、A D V A T E (登録商標) で  $3.08 \pm 0.429$  および  $2.85 \pm 0.721$  IU / d L / IU / kg、並びに r F V I I I F c で  $3.12 \pm 0.451$  および  $2.92 \pm 0.985$  IU / d L / IU / kg であった。観察された I V R 値の平均 (±標準偏差) は、それぞれ 25 IU / kg 用量群および 65 IU / kg 用量群について、A D V A T E (登録商標) で  $112 \pm 14.5$  および  $116 \pm 26.9\%$ 、並びに r F V I I I F c で  $113 \pm 16.3$  および  $117 \pm 33.6\%$  であった。

30

40

#### 【0331】

##### 結論

全ての A D V A T E (登録商標) 処置患者および r F V I I I F c 処置患者は、評価された用量範囲にわたって、 $C_{m a x}$  および A U C <sub>I N F</sub> において同等の用量依存的な増加を有した。A D V A T E (登録商標) および r F V I I I F c 活性のピーク血漿レベルは、概して、注入後 1 時間以内に観察され、投与後数日間検出可能なままであった。注入終了後、ベースライン補正 F V I I I 活性における低下は、両産物においてベースラインに到達されるまで、単一指数関数的減衰を示した。排出半減期および M R T のパラメーター値は、両方の F V I I I 産物について評価された用量範囲にわたって、用量非依存的であるように思われた。平均 C L 値および平均 V 値におけるわずかな増加が、A D V A T E (

50

登録商標)および r F V I I I F c の用量の増加と共に確認されたが;制限された服用レベルと相まった、65 IU / kg における被験者間変動の増加によって、これらのパラメーターの用量依存性の評価は交絡した。

【0332】

r F V I I I F c および A D V A T E (登録商標)の活性PKの比較は、比較可能な用量において、A D V A T E (登録商標)と比較して、r F V I I I F c について、全身暴露におけるおよそ48~61%(一段階アッセイ)または53~84%(発色アッセイ)の増加、クリアランスにおけるおよそ30~40%の低下、および排出半減期およびMRTの両方におけるおよそ50~80%の増加を示した。また、PKの相違を示す証拠が r F V I I I F c において観察され、同等投与量のA D V A T E (登録商標)と比較した場合にTBLP1値およびTBLP3値の増加を示した。A D V A T E (登録商標)および r F V I I I F c の I V R およびK値は同等であるように思われた。

10

【0333】

発色アッセイの結果から得られたPKパラメーターは、発色アッセイによって、暴露パラメーター(例えば、C<sub>max</sub>、AUC<sub>INF</sub>等)のより高い推定が得られた以外は、一段階アッセイから得られたものと概して一致した。

【0334】

観察されたPKにおける向上は、r F V I I I F c が出血からの長期保護を提供することができ、血友病Aを有する個体へのより少ない頻度の注射を可能にすることを示している。

20

[実施例6]

【0335】

r F V I I I F c の第3相A-LONG臨床試験

r F V I I I F c の first in-human study 試験による暫定のPK解析(実施例3参照)に基づき、A-LONG試験を設計した。A-LONGは、重度の血友病A(1IU/dL未満[1%未満]の内在性FV IIIと定義)を有する前治療のある対象における出血の予防および治療においての、組換えFV III Fc融合物(FV III:Fc)の安全性、薬物動態、および有効性の、世界的規模の非盲検多施設第3相評価であった。

【0336】

A-LONG試験の主目的は、(i)予防的な、週一回の、オンデマンドの、外科的な治療レジメンとして投与されたr F V I I I F c の安全性および忍容性を評価すること、並びに(ii)個々に適合させた予防的な、オンデマンドの、外科的な治療レジメンとして投与されたr F V I I I F c の有効性を評価すること、であった。A-LONG試験の二次目的は、(i)r F V I I I F c のPKプロファイルを特徴付けし、r F V I I I F c のPKを現在市販されている製品A D V A T E (登録商標)と比較すること、(ii)r F V I I I F c との個々の応答を評価すること、(iii)予防的投与計画において出血を適切に予防するため、外科的セッティングにおける恒常性を維持するため、またはオンデマンドの、週一回の処置、もしくは予防的なセッティングにおいて出血の発症を治療するために必要な用量範囲およびスケジュールを特徴付けすること、並びに(iv)r F V I I I F c 消費(例えば、対象あたりの年間のr F V I I I F c 全消費)を評価することであった。

30

40

【0337】

165人の対象を、3つの投与計画:個々に適合させた予防的投与計画(アーム1)、週一回の投与計画(アーム2)、およびオンデマンドの投与計画(アーム3)のうちの1つに登録した。さらに、r F V I I I F c を周術期管理亜群において評価した。

【0338】

重要な試験対象患者基準:(i)男性、(ii)12歳以上且つ少なくとも40kg、(iii)1%未満(1IU/dL未満)の内在性FV III活性と定義される重度の血友病Aの診断、および(iv)現在市販されているFV III製品いずれかへの実証され

50

た150日以上、事前暴露日数の経緯。

【0339】

アーム1：個々に適合させた予防的投与計画

アーム1には、群全体およびPK亜群が含まれた。初期の投与計画は、初日に25IU/kg、次にその週の第4日(4日目)に50IU/kgで、週2回であった。対象には、rFVIIIFcのPK結果が利用可能になるまで、この週1回の予防的投与計画で、rFVIIIFcを投与した。これらの結果に基づき、個々に適合させた予防的投与計画を個々人に対して確立し、その中で、用量および間隔を決定して、1~3%のFVIIIFc活性のトラフレベルを維持した。次に、各対象に、試験全体を通じて、個々に適合させた予防的投与計画を施行した。

10

【0340】

対象を試験全体を通じてモニターし、継続的に用量および間隔の調整を行った。調整は、対象が、進行中の2ヵ月間全体にわたって、2回以上の特発性出血の発症として定義される許容できない出血の発症を経験した場合にのみ行った。この場合、調整は3~5%のトラフレベルを目標とした。

【0341】

アーム2：週1回投与計画

対象は以下の通りの短縮されたrFVIIIFc PKプロファイリングを受けた：少なくとも96時間の休薬；65IU/kgのrFVIIIFcの単回投与；rFVIIIFcの0日目に開始して、注射前、並びに注射開始から10(±2)分、3時間(±15分)、72(±2)時間[3日目]、および96(±2)時間[4日目]も含めて、短縮された試料採取。短縮されたPKプロファイリングに続いて、対象には次に、固定用量65IU/kgのrFVIIIFcを、7日毎に、少なくとも28週間且つ最長で52週まで、投与した。

20

【0342】

アーム3：発症時(Episodic)(オンデマンドの)治療

対象は出血に対し必要に応じてrFVIIIFc発症時治療を受けた。対象は登録および無作為割り当てされ、以下の通りの短縮されたrFVIIIFc PKプロファイリングを受けた。

30

(i) 休薬：少なくとも96時間。

(ii) rFVIIIFc 0日目における投与：医療管理下での単回投与量50IU/kgのrFVIIIFcの投与。

(iii) rFVIIIFc 0日目から開始される短縮された試料採取：注射前、および注射開始から30(±3)分、3時間(±15分)、72(±2)時間[3日目]、および96(±2)時間[4日目]。

【0343】

選択場所において、全てのPLプロファイリング時点と同期して、TGA用の試料採取を行った。ROTEM/TEG用の試料採取を受けている対象の一部において、以下の時点で採取が行われた：注射前、並びに注射開始から3時間(±15分)、72(±2)時間[3日目]、および96(±2)時間[4日目]。

40

【0344】

予定来院の間、対象らは、出血の重症度に応じて、10~50IU/kgのrFVIIIFc投与で出血の発症を処置された。

【0345】

周術期管理亜群

試験中に大手術を必要とする患者の一部において、以下の外科手術の前にrFVIIIFcを投与した。大手術は、主要な体腔が穿通および暴露される、または身体機能または生理機能のかなりの機能障害が生じる(例えば、開腹術、開胸術、開頭術、関節置換、および肢の切断)全身麻酔および/または呼吸補助を含むあらゆる外科的処置(待期的または応急)と定義される。

50

## 【0346】

外科手術中の予防のために、対象は20～50 IU/kgのrFVIIIFcで12～24時間毎に処置された。外科手術に先立ち、医師は対象のrFVIIIFc PKプロファイルを精査し、そのタイプの計画的な外科手術および対象の臨床状態に一般的に必要なとされるFVIIIFc補充の用法を決定した。あらゆるリハビリテーション時間を含む外科的治療期間における適切なrFVIIIFc投与に関する推奨には、これらの要素が考慮に入れられた。

## 【0347】

薬物動態学的(PK)評価：全アーム中の全ての対象はrFVIIIFcの初回投与の後に最初のPK評価を受けた。アーム1の対象の一部は、rFVIIIFcのPKを組換え第VII因子(rFVII、ADVATE(登録商標)[抗血友病因子(組換え)血漿/アルブミン不含有法])と以下の通りに比較するために、プロトコール指定連続PK亜群に割り当てられた。

(i) アーム1における治療に先立って、50 IU/kgのADVATE(登録商標)の単回投与の後にPKを評価した。次に、50 IU/kgのrFVIIIFcの単回投与の後に、PKをこれら同一対象において評価した。

(ii) rFVIIIFcのPKを12～24週間繰り返した。

## 【0348】

主要有効性評価項目(最初の読み取りに含まれる)：(i)アーム3に対するアーム1の年換算出血率(ABR)(発症時治療アームと比較される個別に合わせた予防アーム)、(ii)出血の発症を回復するために必要な注射剤の数、(iii)rFVIIIFcを用いた外科手術に対する対象の応答に関する、4点尺度を用いる治療医評価。

## 【0349】

PK評価項目：rFVIIIFcおよびADVATE(登録商標)のPK。

## 【0350】

主要安全性評価項目：(i)阻害物質発生の発生率；および、(ii)周術期管理期間外に発生する有害事象(AE)の発生率。

## 【0351】

結果

対象：全165人の対象が試験に登録された。アーム1(個別に合わせた予防)、n=118；アーム2(週一回予防)、n=24；アーム3(発症時治療)、n=23；周術期管理亜群、n=9、9手術(アーム1から8対象、およびアーム2から1)。対象の92.7%が試験を完了した。

## 【0352】

有効性：ABR中央値(個別に合わせた予防アーム：1.6；週一回予防アーム：3.6；発症時治療アーム：33.6)。個別に合わせた予防アームにおいて、投与間隔中央値は、試験中の最後の3ヵ月の間、3.5日間であった。個別に合わせた予防アーム中の患者の30%が、少なくとも5日間の平均投与間隔を達成した。出血の発症の98%は1回または2回のrFVIIIFc注射によって制御された。周術期管理において、治療医は、手術の100%において、rFVIIIFcの止血有効性を優または良と評価した。

## 【0353】

PK：rFVIIIFcの幾何平均終末相半減期はおよそ19.0時間であったが、これはADVATE(登録商標)(およそ12.4時間)のそれよりも1.53倍長い。

## 【0354】

安全性：rFVIIIFcに対する阻害物質は検出されず、アナフィラキシーの症例も報告されなかった。rFVIIIFcは概して良好な忍容性であった。周術期管理期間外に発生している最も一般的なAEは、因果関係にかかわらず(5%以上の発生率)、上咽頭炎、関節痛、頭痛、および上気道感染であった。12人の対象(7.3%)は、周術期管理期間外に少なくとも1回の重度AE(SAE)を経験した。SAEは薬剤と無関連であることが調査員により判断された。

10

20

30

40

50

## 【0355】

## 概要

個別に合わせた投与計画および週1回予防的投与計画は、低い一桁の年換算出血率中央値の結果となった。個別に合わせた予防アームでは、投与間隔中央値は3.5日間であった。試験中の最後の3ヵ月の間、個別に合わせた予防アーム中の患者の30%が、少なくとも5日間の平均投与間隔を達成した。出血の発症の98%は1回または2回のrFVIIIFc注射によって制御された。手術中のrFVIIIFcの止血有効性は、手術の100%において、治療医によって優または良と評価された。rFVIIIFcの半減期は、ADVATE（登録商標）の12.4時間と比較して、およそ19.0時間であった。いずれの対象も阻害物質を発生させず、またrFVIIIFcに対するアナフィラキシー反応も経験しなかった。組換えFVIIIFcは概して良好な忍容性であった。

10

## [実施例7]

## 【0356】

## 臨床的ROTEM（登録商標）評価

一段階活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）アッセイによる血漿FVIIIFc活性の測定に加え、全血回転式トロンボエラストメリー（ROTEM（登録商標））も調査して、2人の対象、具体的には、低用量コホートの1人および高用量コホートの1人における、rFVIIIFcおよびADVATE（登録商標）による全（global）うっ血の改善を評価した。

20

## 【0357】

rFVIIIFcおよびADVATE（登録商標）は、rFVIIIFc処置の前に対象の血液中に注入された場合、血餅形成において比較的活性であるように思われる。凝固時間（CT）は、標準である100%のおよそ1%の範囲のrFVIIIFcおよびADVATE（登録商標）の用量に対して直線性を有し、用量反応は同一対象においてrFVIIIFcおよびADVATE（登録商標）間で同程度であった。

## 【0358】

ADVATE（登録商標）およびその後のrFVIIIFcの投与に続いて、種々の時点でクエン酸添加全血を採血し、カルシウム再添加後の血餅形成をROTEM（登録商標）でモニターした。ADVATE（登録商標）またはrFVIIIFcの投与前の残余FVIIIFcレベルによる一様でないベースラインCTにもかかわらず、両生成物は注射の30分後と同程度のレベルにまでCTを効率的に補正した。さらに、CTにおける改善は、ADVATE（登録商標）と比較して、この低用量で投与された対象において、25IU/kgのrFVIIIFcの注射後3時間の時点およびそれ以降に良好に維持された。しかし、ADVATE（登録商標）に対するrFVIIIFcの改善の差は、65IU/kg用量においてはそれほど大きなものではなかった。

30

## [実施例8]

## 【0359】

HemAマウスにおけるrFVIIIFcおよび単鎖（SC）rFVIIIFcのインビボ有効性

組換え第VIIIFc（rFVIIIFc）は、ヒト免疫グロブリンG1（IgG1）のFcドメインに遺伝子工学的に融合されたBドメイン欠失（BDD）rFVIIIFcタンパク質から成る。HEK293細胞からの分泌の前に、rFVIIIFcの大部分は、FVIIIFc重鎖（HC）および軽鎖（LC+Fc）にプロセシングされる。血流中で、rFVIIIFcは、天然FVIIIFcと区別されない様式でフォンウィルブランド因子（VWF）と複合体化して活性化時には放出される。HCおよびLCの自発的解離は、FVIIIFc製剤の血漿中および保存中でのFVIIIFc活性の喪失に寄与していると考えられている。ここに、天然FVIIIFcと比較して優れた製造性および増強された安定性を得ることができる、rFVIIIFcの単鎖非プロセシングアイソフォーム（SC rFVIIIFc）について記載する。

40

## 【0360】

50

SC rFVIIIFcを、ある割合の非プロセシング型アイソフォームを含有する rFVIIIFc から精製した。rFVIIIFc と比較して、SC rFVIIIFc は、一段階 (aPTT) アッセイにより、同等の色素生産活性を示したが、およそ60%の低減した活性を示した (表3Aおよび表3B)。校正自動化トロンボグラム (Thrombinoscope (登録商標)) を用いて、トロンビン産生アッセイ (TGA) を行った。トロンビン産生アッセイ (TGA) では、SC rFVIIIFc は、rFVIIIFc と比較して低減したトロンビン活性 (図13A) およびピークトロンビン (図13B) も示した。しかし、表3Bに示す通り、aPTTによるSC rFVIIIFcの完全な活性がvWF非存在下で観察され、このことは、完全プロセシング型FVIIIFcからのa3の遊離および解離とは対照的に、SC rFVIIIFcにおけるArg1680切断後のa3酸性領域のHCへの共有結合に起因して、vWFからの遊離が遅延し得ることを示している。vWFからの遅延した解離はaPTTアッセイおよびTGAで観察された活性の低減を説明し得るが、一方、完全な活性が二段階発色アッセイにおいて観察された。vWF存在下での活性化速度の減少は、FVIIIFc活性化因子としてのトロンビンを制限した修飾発色基質アッセイにおいて確認された。

#### 【0361】

SC rFVIIIFcのインビボ機能を、HemAマウス尾静脈切断 (TVT) モデルにおいて評価した。マウスを最初に麻酔し、次にTVTの48時間前に、4.6 μg/kg、1.38 μg/kg、または0.46 μg/kgのプロセシング型rFVIIIFc (約75%~85%のプロセシング型rFVIIIFcを含有する医薬原体) および精製単鎖 (SC) rFVIIIFcのいずれかを注射した。尾を先端部から切断し、即座に管の中に入れて血液を集めた。生存に対する保護の割合 (%) を、rFVIIIFcプロセシング型 (医薬原体) および単鎖 (SC) FVIIIFcについて、表7および図7A、図7Bおよび図7Cに示されるように測定した。

#### 【表6】

表7. rFVIIIFc DS および単鎖 (SC) rFVIIIFc のインビボ有効性

用量 (μg/kg)		4.6	1.38	0.46
生存に対する保護の%	FVIIIFc DS	93	52	19
	単鎖 rFVIIIFc	93	64	14

#### 【0362】

TVT後、インビボにおける尾の再出血および生存を毎時間12時間目までモニターし、最後の観察をTVTの24時間後に行った。TVTを注入の48時間後に行った場合、SC rFVIIIFc および rFVIIIFc はこのモデルにおいて同等なインビボ有効性を示し、ED50はそれぞれ1.17 μg/kg および1.23 μg/kg のであった (図7A)。SC rFVIIIFc および rFVIIIFc の各試験服用レベルにおいて、HemAマウスにおける同程度のTVT後24時間生存曲線 (p=0.65) (図7B) および再出血率 (図7C) が観察され、このことは、SC rFVIIIFc がその低い見かけのaPTT活性にもかかわらず rFVIIIFc と同等に効果的であったことを示している。vWF存在下でのSC rFVIIIFcのインビトロ活性化の遅延は、従って、そのインビボ有効性に対して重大な影響は有していないように思われた。これらの知見により、SC rFVIIIFc が、臨床応用の可能性を有する新規の効果的な rFVIIIFc アイソフォームであることが示された。

#### [実施例9]

#### 【0363】

##### 第1/2a相臨床試験

rFVIIIFc は、循環 rFVIIIFc の半減期を延長させるためにヒト IgG<sub>1</sub> のFcドメインに共有結合したFVIIIFcの単一分子から成る組換え融合タンパク質である。

この、重度の血友病 A を有する前治療のある男性対象においてのファースト・イン・ヒューマン試験により、r F V I I I F c の安全性および薬物動態が調べられた。16 人の対象が 25 IU/kg または 65 IU/kg の A D V A T E (登録商標)、次に同等投与量の r F V I I I F c の単回投与を受けた。ほとんどの有害事象は試験薬と無関係であった。試験対象はいずれも抗 F V I I I F c 抗体も阻害物質も発生させなかった。服用レベルの全体に渡って、A D V A T E (登録商標) と比較して、r F V I I I F c は、1.54 ~ 1.71 倍長い排出半減期 (elimination  $t_{1/2}$ ) および平均滞留時間、1.49 ~ 1.56 倍低いクリアランス、並びに 1.48 ~ 1.56 倍高い全身暴露を示した。A D V A T E (登録商標) および r F V I I I F c は、同程度の用量依存性ピーク血漿濃度および回復を有した。ベースラインを越えた 1% F V I I I 活性までの時間は、服用レベルの全体において、A D V A T E (登録商標) よりもおよそ 1.53 ~ 1.68 倍長かった。従って、r F V I I I F c は、血友病 A を有する患者において延長された止血保護およびより低頻度の投与を達成するための、実行可能な治療方法を提供することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0364】

r F V I I I F c は、ヒト I g G<sub>1</sub> の F c ドメインに共有結合的に連結した B ドメイン欠失 r F V I I I の単一分子から成る組換え融合タンパク質である。F c -融合タンパク質の潜在的利点にはより良好な忍容性および延長された止血保護が含まれ、F c ドメインは既知の固有の毒性を有さない天然分子である。Dumont J.A. et al., *BioDrugs* 20(3):151-60 (2006), Dumont J.A. et al., "Monomeric Fc fusion technology: an approach to create long-lasting clotting factors," in: Kontermann R., ed., *Therapeutic Proteins*

Strategies to Modulate Half-Life, Chapter 11, Wiley VCH publisher; prepublished online, DOI:10.1002/9783527644827.ch10。I g G<sub>1</sub> の F c ドメインへの結合は、内皮細胞を含む多くの細胞型で発現される新生児 F c 受容体 (F c R n) への結合を可能にする。F c R n 発現は一生を通じて安定なままであり、I g G<sub>1</sub> および F c -融合タンパク質のリソソーム分解からの保護に参与し、したがってタンパク質の  $t_{1/2}$  を延長する。Dumont J.A. et al., *BioDrugs* 20(3): 151-60 (2006), Roopenian D.C. et al., *Nat Rev Immunol.* 7(9):715-25 (Epub 2007 Aug 17)。血行中の多数のタンパク質が、非特異的ピノサイトーシスを介して脈管構造を裏打ちしている細胞内に取り入れられ、エンドソーム分解経路およびリソソーム分解経路に輸送される。

#### 【0365】

F c タンパク質はエンドソーム内に常在する F c R n と相互作用する。F c R n を含有するエンドソームは F c 融合タンパク質を再び原形質膜へと向かわせ、pH 依存的に血行中にそれらを放出し (Lencer W.I. and Blumberg R.S., *Trends Cell Biol.* 15(1):5-9 (2005))、それによってリソソーム分解を回避させる。この再循環アプローチは、治療的生物学的製剤の  $t_{1/2}$  を延長させるために上手く利用されており; いくつかの F c 融合物に基づく薬剤が臨床用に承認されており (例えば、エタネルセプト、ロミプロスチム)、他にも開発中のものがある。Huang C., *Curr Opin Biotechnol.* 20(6):692-9. (Epub 2009 Nov 4), Schmidt S.R., *Curr Opin Drug Discov Devel.* 12(2):284-295 (2009)。

#### 【0366】

r F V I I I F c に関する前臨床データは、F c R n に媒介される天然の保護経路により F V I I I を分解から救済し、それにより  $t_{1/2}$  を延長できることを示している。血友病 A のマウスおよびイヌにおいて、r F V I I I F c の最終的な血漿内  $t_{1/2}$  は r F V I I I よりもおよそ 2 倍長かった。Dumont J. et al., *Blood.* 116(21) Abstract 545 (2009), Liu T. et al., *J Thromb Haemost.* 9(S2):561 (2011)。これらのデータに基づき、ファースト・イン・ヒューマン臨床試験を行って、血友病 A を有する対象における持続性 r F V I I I F c 融合タンパク質の安全性および PK を調べた。

#### 【0367】

##### 試験デザイン

重度の血友病 A を有する前治療のある患者における、この非盲検、用量漸増、多施設の第 1 / 2 a 相試験によって、r F V I I I F c の安全性およびその薬物動態 (PK) を、

A D V A T E (登録商標) (抗血友病因子 [組換え]、血漿/アルブミン不含有法、オクトコグアルファ、バクスター・ヘルスケア社 (BaxterHealthcare)) と比較して調べた。臨床試験実施基準に関する U S C F R および I C H のガイドラインに従ってこの試験を行った。いかなる試験の前にも、共同治験審査委員会からの承認および全対象からの書面によるインフォームドコンセントを得た。試験デザインは逐次的であり; 単回投与の 25 IU/kg または 65 IU/kg の A D V A T E (登録商標)、続いて同用量の r F V I I I F c が投与された (図 8)。両薬剤をおよそ 10 分間かけて静脈内注射した。それら 2 つの服用レベルは、典型的な治療的用量範囲の幅を網羅するものと予期された。対象は安全性解析のために、r F V I I I F c を与えられた後に 28 日間、注射の 14 日後および 28 日後の抗 F V I I I 抗体および阻害物質に関する試験を含む調査を受けた。対象における血漿内 F V I I I 活性を、注射前、r F V I I I F c 注射の 10 分後および 30 分後、1、3、6、9、24、48、72、96、120、および 168 時間 (7 日間) 後に測定し、65 IU/kg の r F V I I I F c を投与された対象については、192、216、および 240 時間 (10 日間) における試料も追加した。血漿内 F V I I I 活性を、A D V A T E (登録商標) 処置後の同時点に、25 IU/kg 群については 72 時間にわたって、および 65 IU/kg 群については 96 時間にわたって、測定した。

#### 【0368】

##### (a) 対象

男性対象は少なくとも 12 歳で重度の血友病 A (1%未満の F V I I I 活性レベルと定義) を有し、F V I I I 濃縮物 (p d F V I I I または r F V I I I) に対する少なくとも 100 日間の実証された事前暴露日数を有した。マウスタンパク質またはハムスタータンパク質に対する既知の過敏症を有する対象、スクリーニングにおいて阻害物質または検出可能な阻害物質力価の履歴を有する対象、またはうっ血に影響を与え得るあらゆる薬物治療もしくは全身性免疫抑制剤を受けた対象、またはスクリーニングの 30 日以内に活性細菌もしくはウイルスの感染 (肝炎または H I V 以外) を経験した対象は除外した。対象の遺伝子型は、既知である場合、試験移行時に記録された。

#### 【0369】

##### (b) 治療製品 (treatment Product)

ヒト r F V I I I F c および F c 導入遺伝子を H E K 2 9 3 細胞に安定にトランスフェクトし、その細胞株を安定性、無菌性、およびウイルス混入について広範に試験し、安全性を確実にした。精製製剤は、そのカルボキシ末端を介して F c 単量体の N 末端に共有結合的に連結した単量体 B ドメイン欠失 F V I I I から成り、該単量体 B ドメイン欠失 F V I I I は、合成および細胞からの分泌中に第二の F c 単量体とのジスルフィド結合を形成する。r F V I I I F c をクロマトグラフィーおよびナノ濾過で精製したところ、市販の r F V I I I 調製物と比較して、一段階アッセイおよび発色凝固アッセイにおいて完全に活性であった。2 mL の溶液あたり 1000 IU を含有し、L - ヒスチジン (p H 7)、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、スクロース、マンニトール、およびポリソルベート 20 と共に製剤化された凍結液として提供された。注射用に、その生成物を食塩水 (0.9% N a C l) で希釈した。

#### 【0370】

##### (c) 結果の測定事項

試験の主目的は、理学的検査を通して評価される安全性、治療により発現した有害事象 (A E) の報告、抗体の発生、および長期の臨床検査モニタリングであった。二次目的には、P K 解析から得られるパラメータが含まれた。臨床検査評価には、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間 (a P T T)、国際標準比、D - 二量体レベル、フォンウィルブランド因子 (v W F) 抗原レベル、標準的な血液学的検査および血液化学検査、並びに検尿が含まれた。

#### 【0371】

F V I I I 活性は、市販試薬 (Dade Actin FSL) を用い、S i e m e n s B C S - X P 分析機器上で、一段階凝固 (a P T T) アッセイにより測定し、ヒト血漿に関する世界

10

20

30

40

50

保健機関 (WHO) 第5国際基準 (IS) に帰属する、正常参照血漿 (プレジション・バイオロジクス社 (PrecisionBiologics) 製 CRYOCHECK (商標)) に対して較正した。aPTTアッセイに加えて、FVII活性を、ヨーロッパ薬局方の推奨に従う市販のキット (Aniara BIOPHEN FVII: C) を用いて、発色基質アッセイ (RosenS., Scand J Haematol Suppl. 33(Suppl 40):139-45 (1984)) によって測定した。発色アッセイは、正常ヒト参照血漿 (インスツルメーション・ラボラトリーズ社 (InstrumentationLaboratories) ORKE45) に対して較正し、これはWHO 5th ISヒト血漿基準に帰属する作用強度も有した。

#### 【0372】

一段階アッセイおよび発色アッセイの定量下限値 (lower limit of quantification: LLOQ) は、それぞれ、 $0.5 \text{ IU/dL}$  および  $0.4 \text{ IU/dL}$  であった。FVII阻害物質をナイミーヘン修飾ベテスタアッセイ (Nijmegen modifiedBethesda assay) によって測定し、 $0.6 \text{ BU/mL}$  未満は陰性に見なした。抗rFVIIIFc抗体を、ビオチンおよびスルホ標識化rFVIIIFcを使用する特異ブリッジング電気化学発光免疫測定法を用いて評価した。アッセイ感度は、代理対照として抗ヒトFVIIモノクローナル抗体を用いて、 $89 \text{ ng/mL}$  であることが決定された。探索的全血回転式トロンボエラストメトリー (ROTEM (登録商標)) を、種々の時点において、2人の対象 (各服用レベルから1人) において行って、ADVATE (登録商標) およびrFVIIIFcの注射後の全身性うっ血の改善を評価した。

#### 【0373】

##### (d) 薬物動態学的解析

内在性FVIIレベルおよび後の残余減衰を自動的に評価するユーザー定義一区画配置モデル (user-defined one-compartment disposition model) を、ADVATE (登録商標) またはrFVIIIFcの単回投与の後の個々の対象における血漿内FVII活性-対-時間のデータの解析のために、WINNONLIN (登録商標) において利用した。実際の試料採取時間、用量、および注射の期間を、最高活性 ( $C_{max}$ )、 $t_{1/2}$ 、クリアランス (CL)、定常状態時の分布容積 ( $V_{ss}$ )、曲線下面積 (0時間から無限大に補外 [AUC<sub>INF</sub>])、平均滞留時間 (MRT)、および増分回収率 (incremental recovery) を含むパラメーターの計算に使用した。

#### 【0374】

rFVIIIFcの活性-対-時間プロファイルのモンテカルロシミュレーション

$25 \text{ IU/kg}$  または  $65 \text{ IU/kg}$  の投与計画に続くFVII活性-時間プロファイルを構築するため、ADVATE (登録商標) およびrFVIIIFcの母集団PKモデルを用いてモンテカルロシミュレーションを行った。試験された母集団におけるモデルパラメーター (CL、分布容積) の平均推定値、個人間変動、および残差変動 (residual variability) を、この第1/2a相試験における16人対象から得られたADVATE (登録商標) およびrFVIIIFcの一段階 (aPTT) 凝固アッセイの活性データに基づいて、推定した。500人の対象を、各投与計画に対して、各対象につき15の試料採取点で、シミュレートした。ADVATE (登録商標) またはrFVIIIFcの異なる投与計画の後の異なる時点で、1%および3%を超える、またはそれらと等しいFVII活性を有する母集団の割合を、推定した。

#### 【0375】

##### 統計解析

rFVIIIFcおよびADVATE (登録商標) について選択されたPKパラメーターを、分散モデル解析を用いて比較した。PKパラメーターをこれらの解析用に対数変換し、推定平均値、平均値の差、および対数スケール上の信頼区間を変換して、それぞれ、オリジナルスケール上の幾何平均、幾何平均率 (GMR)、および信頼区間の推定値を得た。GMRは、ADVATE (登録商標) PKパラメーター値に対するrFVIIIFc PKパラメーター値の患者内比の幾何平均である。

#### 【0376】

## 結果

## 薬物消長 (Subject Disposition)

19人の対象を試験に登録し；16人がADVATE（登録商標）およびrFVIIIFcの両方についてPK評価を受けた。1人の対象は、ADVATE（登録商標）の投与後のウォッシュアウト期間が完了する前に自身の以前の製品を自己投与したため、該対象をPK解析から除外したが、安全性解析には含めた。3人の対象はいずれかの治験薬を与えられる前に試験を中断した：1人は自発的に中止し；2人目は不履行から調査員により中止され；1人は試験登録の完了のためにスポンサーの要求で中止された。投与を受けた対象のうち、ADVATE（登録商標）およびrFVIIIFcの両方について、6人の対象は25IU/kgを与えられ、10人の対象は65IU/kgを与えられた。平均年齢は40.3歳（23～61歳）であった。遺伝子型特定を7人の対象について集めたところ；イントロン22の逆位が6人の対象において報告され；フレームシフト異常が1人の対象において報告された。9人の対象については遺伝子型が不明であった。13人の対象はC型肝炎抗体を有し、そのうち4人はHIV陽性でもあった。

10

## 【0377】

## 安全性

治療中および追跡調査期間中に、44例の処置により発現したAEが、11人（69%）の対象から報告された。これには、28日間の投与後観察期間を通じてADVATE（登録商標）またはrFVIIIFcの投与日も含まれた。事象の大部分は軽度と見なされ、いずれも試験中止には繋がらなかった。1つの事象（味覚異常）が、65IU/kg用量のrFVIIIFcを与えられている間に1人の対象において一過的に生じ、rFVIIIFcに関連していると見なされた。1人の対象が、65IU/kgのrFVIIIFcを与えられた後に不安発作を経験し、それが結果として21例のAEを生じ、そのうち、19例は軽症と等級付けられ、2例（頭痛および羞明）は中等症と見なされた。調査員によって、どちらもrFVIIIFcに関連しているとは見なされなかった。重大な出血の発症は報告されなかった。注射に対するアレルギー反応の証拠は検出されなかった。試験された全ての血漿試料はFVII阻害物質および抗rFVIIIFc抗体に対して陰性であった。注射部位反応の徴候は観察されなかった。異常な検査値における臨床的に意味のある変化は報告されなかった。

20

## 【0378】

## 薬物動態

## 【0379】

## 血漿中rFVIIIFcに関する、aPTTおよび発色活性間の相関

ADVATE（登録商標）およびrFVIIIFcの活性を、市販試薬および正常ヒト血漿基準に対する補正を用いる同一アッセイにおいて決定した。LLOQを超える活性を有した試料において、一段階凝固アッセイによって得られた結果と発色アッセイによって得られた結果の間には強い相関関係があった。ADVATE（登録商標）投与後の151試料およびrFVIIIFc投与後の185試料のそれぞれについて、2つのアッセイ結果の間に、0.94および0.95の相関係数（ピアソン $R^2$ ）が認められた。aPTTの結果と比較して、FVII発色活性は、平均して、ADVATE（登録商標）において21%より高く、rFVIIIFcにおいて32%より高く、統計的に有意ではなかった（図9）。この知見は、両薬剤の発色評価による暴露パラメータのわずかに高い推定をもたらした。発色アッセイによる見かけのより高いFVII回復は、臨床分析において試験される組換えFVII製品においては典型的であり、他のほとんどの市販FVII製品と一致する。LeeC.A. et al., *Thromb Haemost.* 82(6):1644-7 (Dec. 1999), Mikaellsson M. andOswaldsson U., *Semin ThrombHemost.* 28(3):257-64 (June 2002), StroobantsA.K. et al., *J ThrombHaemost.* 9 (Suppl 2) (2011)。

40

## 【0380】

## rFVIIIFcの向上した薬物動態

主要なPK推定値は一段階（aPTT）凝固アッセイの活性データから得た。25また

50

は 65 IU/kg の ADVATE (登録商標)、続いて同等投与量の rFVIIIFc を与えられた対象において、血漿中 FVII 活性は急激に上昇し、投与後 1 時間以内に  $C_{max}$  に達した。観察された FVII 活性の後の低下は、ベースライン FVII 活性に達するまで、単一指数関数的減衰の特徴を示した (図 10A および 10B)。  $C_{max}$  は用量に比例して増加したが、同等投与量の ADVATE (登録商標) および rFVIIIFc の間では同程度であった (表 8)。総暴露量 ( $AUC_{INF}$ ) も用量に比例して増加した。しかし、rFVIIIFc の  $AUC_{INF}$  は、ADVATE (登録商標) の  $AUC_{INF}$  よりも、25 IU/kg ( $p = 0.002$ ) および 65 IU/kg ( $p < 0.001$ ) において、それぞれ 1.48 倍および 1.56 倍大きかった (表 8)。

【表 7 - 1】

表 8. 用量群ごとの rFVIIIFc および ADVATE (登録商標) の一段階 (aPTT) アッセイによる PK パラメーター

パラメーター	用量 : 25IU/kg (N=6)			用量 : 65IU/kg (N=9)		
	ADVATE (登録 商標) 幾何平 均 (Geom. Mean) [95% CI]	rFVIIIFc 幾何平 均 (Geom. Mean) [95% CI]	幾何平均比 (Geom. Mean Ratio) [95% CI] (p 値)	ADVATE (登録 商標) 幾何平 均 (Geom. Mean) [95% CI]	rFVIIIFc 幾何平 均 (Geom. Mean) [95% CI]	幾何平均比 (Geom. Mean Ratio) [95% CI] (p 値)
$C_{max\_OBS}$ (IU/dL)	63.6 [59.1、 68.3]	60.5 [53.1、 69.0]	0.952 [0.819、 1.11]	133 [105、 168]	119 [103、 136]	0.895 [0.795、 1.01]

10

20

30

【表 7 - 2】

			(p = 0.440)			(p = 0.061)
AUC <sub>INF</sub> (時間 *IU/dL)	994 [723、 1370]	1480 [1160、 1880]	1.48 [1.26, 1.76] (p = 0.002)	1800 [1350、 2400]	2800 [1980、 3970]	1.56 [1.33、 1.83] (p < 0.001)
t <sub>1/2</sub> (時 間)	12.2 [9.14 、 16.3]	18.8 [14.8、 23.8]	1.54 [1.40, 1.69] (p < 0.001)	11.0 [8.76 、 13.9]	18.8 [14.3、 24.5]	1.70 [1.54、 1.89] (p < 0.001)
MRT (時 間)	17.5 [13.1 、 23.4]	27.0 [21.3、 34.2]	1.54 [1.40, 1.69] (p < 0.001)	15.8 [12.6 、 19.9]	27.0 [20.6、 35.3]	1.71 [1.54、 1.89] (p < 0.001)
CL (mL/時 間/kg)	2.49 [1.80 、 3.45]	1.68 [1.31、 2.15]	0.673 [0.569、 0.796] (p = 0.002)	3.61 [2.71 、 4.83]	2.32 [1.64、 3.29]	0.642 [0.547、 0.753] (p < 0.001)
V <sub>ss</sub> (mL/kg)	43.9 [39.3 、 49.0]	45.4 [39.3、 52.5]	1.04 [0.947, 1.13 ] (p = 0.357)	57.4 [48.3 、 68.3]	62.8 [55.2、 71.5]	1.09 [0.976, 1.22 ] (p = 0.107)
増分回収 率	2.56 [2.36	2.44 [2.12、	0.952 [0.819, 1.11	2.04 [1.61	1.83 [1.59、	0.894 [0.795, 1.01

10

20

30

40

【表 7 - 3】

(IU/dL / IU/kg)	、 2.78]	2.81]	]	、 2.59]	2.10]	]
			(p = 0.444)			(p = 0.060)

CI = 信頼区間；Geom. Mean = 幾何平均；OBS = 観察値。推定平均、平均の95%CI、および平均値の差を変換して、それぞれ、推定幾何平均、幾何平均の95%CI、および幾何平均比を得た。

10

## 【0381】

$t_{1/2}$ 、MRT、CL、および $V_{ss}$ は用量非依存性的であるように思われた(表8)。rFVIIIFcの幾何平均 $t_{1/2}$ は、25IU/kg用量群および65IU/kg用量群の両方において18.8時間であった。これは、同等投与量のADVATE(登録商標)の幾何平均(12.2時間および11.0時間)に対して、それぞれ1.54倍および1.70倍の向上を表す( $p < 0.001$ )(表8)。同様の患者内向上が、ADVATE(登録商標)(25IU/kgにおいて17.5時間および65IU/kgにおいて15.8時間)と比較して、rFVIIIFcのMRT(両用量群において27.0時間)において観察された( $p < 0.001$ )。 $t_{1/2}$ およびMRTにおける向上と一致して、25IU/kg( $p = 0.002$ )および65IU/kg( $p < 0.001$ )のそれぞれの用量において、対応する患者内CLにおける1.49倍および1.56倍の低減があった。ADVATE(登録商標)およびrFVIIIFcの間で、 $V_{ss}$ および増分回収率に有意差はなかった。従って、各対象内で、rFVIIIFcは、ADVATE(登録商標)と比較して向上したPKプロファイルを示した。

20

## 【0382】

rFVIIIFcの改善されたPKプロファイルは、25IU/kg( $p < 0.001$ )および65IU/kg( $p < 0.001$ )においてADVATE(登録商標)よりも1.53倍および1.68倍より長かった1%FVII活性までの投与後時間の増加をもたらした(データ未記載)が、このことは、rFVIIIFcのより長い治療期間となり得ることを示唆している。ADVATE(登録商標)と比較したrFVIIIFcの好ましいPKプロファイルは、発色アッセイ(表9)において測定されたFVII活性によっても示されたが、このFVII活性はaPTTアッセイより得られたデータと同程度であった。しかし、発色アッセイに基づく暴露の推定値、すなわち、 $C_{max}$ およびAUC<sub>INF</sub>は、ADVATE(登録商標)およびrFVIIIFcの両方において、一段階(aPTT)凝固アッセイでのものよりもわずかに高かった。

30

## 【表 8 - 1】

表 9. 用量群ごとの rFVIIIIFc および ADVATE (登録商標) の二段階 (発色) アッセイによる PK パラメーター

パラメーター	用量：25IU/kg (N=6)			用量：65IU/kg (N=9)		
	ADVATE (登録 商標) 幾何平均 (Geom. Mean) [95% CI]	rFVIIIIFc 幾何平均 (Geom. Mean) [95% CI]	幾何平均 比 (Geom. Mean Ratio) [95% CI] (p 値)	ADVATE (登録 商標) 幾何平均 (Geom. Mean) [95% CI]	rFVIIIIFc 幾何平均 (Geom. Mean) [95% CI]	幾何平均比 (Geom. Mean Ratio) [95% CI] (p 値)
$C_{\max-OBS}$ (IU/dL)	75.5 [65.5、 87.1]	76.5 [64.9、 90.1]	1.01 [0.940、 1.09] (p = 0.686)	175 [143、 215]	182 [146、 227]	1.04 [0.900、 1.20] (p = 0.571)
$AUC_{INF}$ (時間 *IU/dL)	1060 [822、 1360]	1660 [1300、 2120]	1.57 [1.38、 1.80] (p <	2270 [1670、 3070]	4280 [2960、 6190]	1.89 [1.61、2.21] (p < 0.001)

10

20

30

【表 8 - 2】

			0.001)			
$t_{1/2}$ (時間)	10.5 [8.49、 12.9]	16.7 [13.8、 20.1]	1.59 [1.35、 1.87] ( $p < 0.001$ )	10.8 [8.16、 14.2]	19.8 [14.3、 27.5]	1.84 [1.60、 2.12] ( $p < 0.001$ )
MRT (時間)	15.0 [12.2、 18.6]	23.9 [19.8、 28.9]	1.59 [1.35、 1.87] ( $p < 0.001$ )	15.4 [11.7、 20.4]	28.5 [20.5、 39.6]	1.85 [1.61、 2.12] ( $p < 0.001$ )
CL (mL/時間/kg)	2.35 [1.80、 3.06]	1.49 [1.16、 1.92]	0.636 [0.557、 0.727] ( $p < 0.001$ )	2.87 [2.12、 3.89]	1.52 [1.05、 2.20]	0.530 [0.453、 0.620] ( $p < 0.001$ )
$V_{ss}$ (mL/kg)	35.5 [30.5、 41.3]	35.9 [30.4、 42.3]	1.01 [0.898、 1.14] ( $p = 0.822$ )	44.5 [36.7、 54.1]	43.4 [38.2、 49.4]	0.975 [0.863、1.10] ( $p = 0.653$ )
増分回収率 (IU/dL / IU/kg)	3.05 [2.62、 3.54]	3.09 [2.61、 3.66]	1.01 [0.940、 1.09] ( $p = 0.679$ )	2.70 [2.20、 3.31]	2.80 [2.24、 3.50]	1.04 [0.900、1.20] ( $p = 0.571$ )

CI = 信頼区間 ; Geom. Mean = 幾何平均 ; OBS = 観察値。推定平均、平均の 95%CI、および平均値の差を変換して、それぞれ、推定幾何平均、幾何平均の 95%CI、および幾何平均比を得た。

## 【0383】

フォンビルブランド因子および rFVIIIFc の性質の間の相関関係

血行中の FVII の大部分は VWF と複合体化していることから (Lenting P.J. et al., J Thromb Haemost. 5: 1353-60(2007))、さらにゲノムワイド関連研究によって、FVII レベルの遺伝的決定因子が主に VWF レベルに依存することが確認されてい

10

20

30

40

50

ることから (Smith N.L. et al., Circulation121:1382-1392 (2010))、VWF および rFVIIIFc の間の関連を調べた。rFVIIIFc および ADVATE (登録商標) の両方において、VWF レベルと、CL および  $t_{1/2}$  との間に強い相関関係が観察された。図 11A および図 11B に示される通り、VWF のレベルが上昇するにつれて、rFVIIIFc の CL ( $p = 0.0016$ ) および ADVATE (登録商標) ( $p = 0.0012$ ) の CL は減少した。

#### 【0384】

逆の関係が VWF のレベルおよび  $t_{1/2}$  の間に観察された。VWF のレベルが増加するにつれて、rFVIIIFc の  $t_{1/2}$  ( $p = 0.0003$ ) および ADVATE (登録商標) の  $t_{1/2}$  ( $p < 0.0001$ ) は増加した。この相関関係は、rFVIIIFc の Fc 部分が、FVIIII をクリアランスから保護する際の VWF の役割を変化させないことを示している。

10

#### 【0385】

全血 ROTEM (登録商標) に対する rFVIIIFc の延長された PK の影響

治験薬の投与の前に、各用量群中の 1 対象から得た血液を同等投与量の rFVIIIFc または ADVATE (登録商標) でスパイクし、全血 ROTEM (登録商標) で解析した。凝固時間 (CT) は、規定のおよそ 1% ~ 100% の範囲の用量に対して直線性を有し、用量反応は同一対象において rFVIIIFc および ADVATE (登録商標) の間で同程度であったが (データ未記載)、このことは、rFVIIIFc および ADVATE (登録商標) が血餅形成において同程度の作用強度であることを示している。

20

#### 【0386】

ADVATE (登録商標) または rFVIIIFc の投与前の残余 FVIIII レベルによる一様でないベースライン CT にもかかわらず、両生成物は投与の 30 分後と同程度のレベルにまで CT を効率的に補正した (図 12A および図 12B)。CT における改善は、25 IU/kg 投与の 3 時間後に (図 12A)、および 65 IU/kg 投与の 24 時間後に (図 12B)、ADVATE (登録商標) よりも rFVIIIFc によって良好に維持された。

#### 【0387】

rFVIIIFc は両方の用量において対象によって良好に忍容された。血液学、血液化学、または検尿パラメータにおいて観察される臨床的に有意な変化はなかった。AE の大半は軽度であり、rFVIIIFc に無関係であり、続発症無しに回復した。重度の AE または死亡は試験中に生じず、いずれの用量における対象も rFVIIIFc に対する中和抗体または結合抗体を発生させなかった。

30

#### 【0388】

rFVIIIFc は ADVATE (登録商標) と比較して有意に向上した FVIIII 活性の PK プロファイルを示し、一段階 (aPTT) 凝固アッセイによって測定される  $t_{1/2}$  および MRT は服用レベル全体にわたって 1.54 倍 ~ 1.71 倍より長く、二段階発色アッセイによるものでは 1.59 倍 ~ 1.84 倍より長かった。rFVIIIFc の活性延長は、有効性延長の可能性を予想させるものであり、血友病 A を有する患者の予防的処置においてより低頻度な投与計画を可能にする。

40

#### 【0389】

この試験から得られた PK パラメータを採用し、モンテカルロシミュレーションによって、同等投与量の ADVATE (登録商標) を与えられている患者と比較して、rFVIIIFc を与えられている患者がより高い割合で、FVIIII レベルを 1% 超または 3% 超に維持することが予測された (表 10)。例えば、25 IU/kg の用量において、71.2% の rFVIIIFc 患者に対して 12.2% の ADVATE (登録商標) 患者が、4 日目に 1% を超える FVIIII トラフレベルを有することが予測され; 65 IU/kg の用量においては、66.4% の rFVIIIFc 患者に対して 11.0% の ADVATE (登録商標) 患者が、4 日目に 3% を超える FVIIII レベルを有することが予測された。この第 1/2 a 相試験およびモンテカルロシミュレーション予測から得られた結

50

果を確かめるために、より多数の患者での臨床試験が計画されている。

【表 9】

表 10. ADVATE（登録商標）または rFVIIIFc の特定の用法において、正常な 1%超および 3%超の FVIII トラフレベルを達成している対象の予測割合

投与後時点（日）	ADVATE（登録商標）		rFVIIIFc	
	25 IU/kg	65 IU/kg	25 IU/kg	65 IU/kg
	1%超の FVIII トラフレベルを有する対象の割合			
3	40.0	67.8	92.6	99.0
4	12.2	31.0	71.2	90.0
5	4.20	13.6	39.4	71.6
7	0.200	1.40	7.80	26.4
	3%超の FVIII トラフレベルを有する対象の割合			
3	10.6	34.6	62.2	91.0
4	1.60	11.0	25.4	66.4
5	0.200	3.20	7.00	36.2
7	0	0.200	0.400	6.60

10

20

30

40

50

【0390】

インビトロ凝固アッセイは、市販試薬および一般的に使用される F V I I I 標準品を用いる、凝固アッセイまたは発色アッセイによる、Bドメイン欠失 F V I I I または天然 F V I I I と対照して、r F V I I I F c の比活性の減少を示さない (Dumontet al., Blood (2012), prepublished online DOI:10.1182/blood-2011-08-367813)。さらに、これらの結果は、r F V I I I F c が、一段階アッセイまたは発色法によって臨床環境で信頼してアッセイされ得ることを示している。

【0391】

要約すると、この第 1 / 2 a 相臨床試験によって、重度の血友病 A を有する患者において r F V I I I F c の安全性および延長された  $t_{1/2}$  が示された。血友病 A を有する個々に効果的な予防的投与計画を確立するための重要な第 3 相試験が、r F V I I I F c について進行中である。

[ 実施例 10 ]

【0392】

血友病 A のマウスモデルおよびイヌモデルにおける r F V I I I F c の薬物動態および有効性

r F V I I I と比較した r F V I I I F c の薬物動態および有効性を、ヒト試験の裏付けとして、血友病 A のマウスモデルおよびイヌモデルにおいて評価した。r F V I I I F c は、ヒト免疫グロブリン G 1 ( I g G 1 ) の F c ドメインに組み換え技術によって連結された単一 B ドメイン欠失 ( B D D ) F V I I I を含むヘテロ二量体タンパク質である。単量体エフェクタータンパク質の F c 単量体への融合、およびその後の、二量体を生成するためのジスルフィド結合を介した結合を通じて生成される、従来の二量体 F c 融合物は、F V I I I 等の巨大凝固タンパク質に対しては効果的でなかった。従って、単一 ( 単量体 ) エフェクター分子が F c に結合している新規の F c 融合タンパク質構築物を作製するための方法を開発した ( Dumont J.A., et al., BioDrugs 20(3):151-60 (2006) )、( Dumont J.A., et al., Journal of aerosol medicine. 18(3):294-303(2005) )、( Bitonti,

et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A.101(26):9763-9768 (2004) )。この手法を、ヒト r F I X ( Peters, R.T., et al., Blood. 115(10):2057-2064 (2010) )、r F V I I a ( Salas, J., et al., J ThrombHaemost. 9(s2):O-TU-026. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04380\_2.x (2011) )、および B D D r F V I I I を含むいくつかのタンパク質に適用した。

### 【0393】

#### 方法および材料

#### 組換え F V I I I - F c 融合タンパク質 ( r F V I I I F c )

r F V I I I F c 発現プラスミド p B U D C E 4 . 1 ( インビトロジェン社 ) は 2 つの発現カセットを含有した。1つは、C M V プロモーターの制御下で、ヒト I g G 1 の F c 領域 ( アミノ酸 D 2 2 1 ~ K 4 5 7、E U 番号付け ) に介在配列無しで直接連結している天然ヒト F V I I I シグナル配列、続く B D D F V I I I ( S 7 4 3 ~ Q 1 6 3 8 融合 ) を発現した。もう一方は、E F 1 プロモーターを用いて、異種マウス I g B シグナル配列を有する F c 領域のみを発現した。ヒト胚腎臓 2 9 3 細胞 ( H E K 2 9 3 H、インビトロジェン社 ) にこのプラスミドをトランスフェクトして、r F V I I I F c を発現する安定なクローン懸濁細胞株 ( clonal suspension cell line ) を作製した。タンパク質を、F V I I I 特異的親和性精製ステップ ( McCue J. et al., J. Chromatogr. A., 1216 (45): 7824-30(2009) )、続いてイオン交換クロマトグラフィーステップおよび疎水性相互作用クロマトグラフィーステップの組み合わせを含む、3つのカラム精製プロセスを用いて、所定の細胞培養物回収培地から精製した。

### 【0394】

#### 組換え F V I I I ( r F V I I I )

組換え B D D F V I I I ( R E F A C T O ( 登録商標 ) および X Y N T H A ( 登録商標 ) )、および完全長 F V I I I ( A D V A T E ( 登録商標 ) ) を、ノビス・ファーマシューティカルズ社 ( フロリダ州マイアミ ) から購入し、製造業者の取扱説明書に従って再構成した。

### 【0395】

#### 動物

1 2 9 x B 6 バックグラウンド上で F V I I I エクソン 1 6 ノックアウトを有する血友病 A ( H e m A ) マウスを、ペンシルバニア大学の H . K a z a z i a n 博士から入手し ( Bi, L., et al., Nat Genet. 10(1):119-121 (1995) )、バイオジェン・アイデック・ヘモフィリア ( Biogen Idec Hemophilia ) で飼育した。マウス F c R n ノックアウト ( F c R n K O ) およびヒト F c R n 遺伝子導入 ( T g 3 2 B ) マウスは C 5 7 B L / 6 J マウスであり、メイン州バーハーバーのジャクソン研究所 ( Jackson Laboratory ) の Derry Roopenian 博士から入手した。F c R n K O マウスの遺伝子型は、m F c R n ( - / - ) および m 2 m ( - / - ) であり、T g 3 2 B の遺伝子型は m F c R n ( - / - )、m 2 m ( - / - )、h F c R n ( + / + )、および h 2 m ( + / + ) である。C 5 7 B L / 6 マウスをジャクソン研究所 ( メーン州バーハーバー ) から購入した。全ての動物行動は施設内動物飼育委員会 ( Institutional Animal Care Committee ) により承認され、「Guide to the Care and Use of Laboratory Animals」に従って行われた。

### 【0396】

血友病 A のイヌは、ノースカロライナ大学 ( チャペルヒル ) のフランシス・オーウェン血液学研究所 ( Francis Owen Blood Research Laboratory ) で維持される近交系コロニーから得た。これらのイヌは、重度のヒト疾患と同程度の重度の血友病表現型を有する ( Graham, J.B. and Buckwalter, J.A., et al., The Journal of Exp. Med. 90(2):97-111 (1949) )、( Lozier, J.N., et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 99(20):12991-12996 (2002) )。

### 【0397】

#### マウスにおける薬物動態 ( P K ) 試験

r F V I I I F c および r F V I I I ( X Y N T H A ( 登録商標 ) ) の P K を、1 2 5

I U / k g の静脈内投与の後に、H e m A マウス、C 5 7 B L / 6 マウス、F c R n K O マウス、および T g 3 2 B マウスにおいて評価した。4 % クエン酸ナトリウムの 1 / 1 0 の体積の血液を、r F V I I I F c については投与の 5 分後、並びに 4、8、16、24、32、48、54、および 72 時間後に、並びに r F V I I I については投与の 5 分後、並びに 1、4、8、16、20、24、32、および 48 時間後に、大静脈から採血した (4 匹のマウス / 時点 / 処置)。血漿を、エタノール / ドライアイス浴中で瞬間凍結し、ヒト F V I I I 特異的発色アッセイ (ディアファーマ (DiaPharma) [ウェストチェスター、OH] から入手した F V I I I C o a t e s t S P キット) を用いる F V I I I 活性の解析まで - 8 0 で保存した。薬物動態パラメータを、W I N N O N L I N (登録商標) バージョン 5 . 2 (ファースイト社 (Pharsight)、カリフォルニア州マウンテンビュー) を用いる非コンパートメント・モデリング (non-compartmental modeling) によって評価した。

10

## 【0398】

## H e m A マウスにおける有効性研究

全ての有効性研究は盲検法で行った。急性の効能 (acute efficacy) は尾切断出血モデルにおいて研究した。雄 H e m A マウス (8 ~ 12 週齢) を 5 0 m g / k g のケタミンおよび 0 . 5 m g / k g のデクスメドミジンの混合物で麻酔した。次に、尾を 37 の食塩水に 10 分間浸して外側静脈を拡張させ、その後 r F V I I I F c、r F V I I I (A D V A T E (登録商標))、またはビヒクルの尾静脈注射を行った。5 分後、尾の遠位 1 c m を切り落とし、流れた血液を 1 3 m L の温めた食塩水に 30 分間採取した。失血を重量測定法で定量した。

20

## 【0399】

予防効果を、H e m A マウスが外側尾静脈の切断の 24 時間または 48 時間前に 12 I U / k g の r F V I I I F c、r F V I I I (A D V A T E (登録商標))、またはビヒクルの単回静脈内投与を受けている以外は以前に報告された通りに (Pan, J. and Kim, J. Y., Blood. 114(13):2802-2811 (2009))、尾静脈切断 (T V T) 出血モデルで研究した。12 I U / k g の用量は、12 I U / k g が投与の 24 時間後に受ける T V T 傷害からの H e m A マウスの 50 % 保護を達成した (データ未記載)、r F V I I I を用いた先の用量反応実験から特定した。

30

## 【0400】

## 血友病 A イヌ研究

r F V I I I F c の単回投与 P K / P D 研究では、2 匹の未処理血友病 A イヌ (M 1 0 および M 1 1) に、125 I U / k g の静脈内投与を与えた。全血凝固時間 (W B C T) のために、血液試料を、投与前および投与後に 5 分および 30 分、並びに 1、2、4、8、24、32、48、72、96、144、および 168 時間の時点で採血した。F V I I I 活性 (a P T T アッセイおよび発色アッセイ)、r F V I I I F c 抗原 (E L I S A)、血液学、および血液化学用の血液採取には、W B C T のための上記の時点、並びに投与の 15 分後並びに 3、6、および 12 時間後が含まれた。

## 【0401】

以下の逐次デザイン研究において、r F V I I I (R E F A C T O (登録商標)) を、イヌ M 1 2 においては 114 I U / k g で、イヌ M 3 8 においては 120 I U / k g で、静脈内投与した。凝固時間が 20 分以上 (F V I I I : C 1 % と一致する時間) になるまで W B C T を測定し、試料も、F V I I I 活性 (a P T T アッセイおよび発色アッセイ)、抗原 (E L I S A) および血液学検査のために特定の時点で採取した。次に、125 I U / k g の r F V I I I F c を同一のイヌに静脈内投与し、血液試料を W B C T、a P T T、E L I S A、血液学検査、および血液生化学検査のために採取した。W B C T のための時点には、投与前、並びに r F V I I I および r F V I I I F c の投与の 5 分および 30 分後、並びに 1、2、4、8、24、32、48、および 72 時間後が含まれた。血液は F V I I I F c 投与の 96、120、144、および 168 時間後にも採取した。F V I I I 活性および抗原のための血液採取には、W B C T のための上記の時点、並びに投

40

50

与の15分後および3、6、12時間が含まれた。WBC TおよびaPTTは、以前に報告された通りに(Herzog, et al., Nat Med. 5(1):56-63 (1999))、行った。

#### 【0402】

##### FVIIII発色アッセイ

血友病Aイヌ血漿中のFVIIII活性を、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社(SiemensHealthcare Diagnostics)(テキサス州ダラス)から入手した試薬を用いて、Sysmex CA1500装置(Sysmexシスメックス社)上で、自動発色アッセイによって試験した。7th International Standard FVIIII Concentrate(NIBSCコード99/678)を、1.5~0.016IU/mLの範囲の濃度でヒトFVIIII枯渇血漿(スタゴ(Stago)、米国)中にスパイクして、検量線を作成した。

10

#### 【0403】

HemAマウス血漿中のFVIIII活性を、製造業者の取扱説明書に従って、クロモジェニクス社(Chromogenix)(ディアファーマ社、マサチューセッツ州レキシントン)から入手したCoatest SP FVIIIIアッセイを用いて測定した。検量線を、未処理HemAマウス血漿を含有する緩衝液中で100mU/mLから0.78mU/mLまで連続希釈したrFVIIIFcまたはrFVIIIIを用いて作成した。C57BL/6マウス血漿、FcRn KOマウス血漿、およびTg32Bマウス血漿中のヒトFVIIII活性を測定するため、マウス血漿中の注入したrFVIIIFcまたはrFVIIIIを、最初にヒトFVIIII特異的mAbのGMA8016(グリーン・マウンテン・アンチボディーズ社(GreenMountain Antibodies)、バーモント州)で捕捉して、次に標準的なCoatestアッセイを行った。

20

#### 【0404】

##### rFVIIII特異的ELISAおよびrFVIIIFc特異的ELISA

血友病Aイヌ血漿中のrFVIIIIおよびrFVIIIFc抗原レベルを、標準的なプロトコールに従ってELISAで測定した。FVIIII A1ドメイン特異的mAbであるGMA-8002(グリーン・マウンテン・アンチボディーズ社、バーモント州バーリントン)を捕捉抗体として使用した。HRP結合型抗FVIIIIポリクローナルAbであるF8C-EIA-D(アフィニティ・バイオロジカルズ社(AffinityBiologicals))を用いてrFVIIIIを検出した。HRP結合型ロバ抗ヒト(F(ab)<sub>2</sub>)709-036-098(ジャクソン・イムノロジカルズ社(JacksonImmunochemicals))を用いてrFVIIIFcを検出した。

30

#### 【0405】

##### rFVIIIFc-FcRn相互作用のSPR解析

表面プラズモン共鳴(SPR)実験を、Biacore T100装置を用いて行った。研究用グレードのCM5センサーチップ、緩衝液、および固定化試薬は、ピアコア社(GEヘルスケア社(GEHealthcare)、ニュージャージー州ピスカタウェイ)から購入した。単鎖ヒト、イヌ、およびマウスFcRn調製物を、標準的なアミン結合を用いて、シングルチップの隣接フローセル(adjacentflow cell)上に、およそ370共鳴単位(RU)の密度で固定化し、続いてエタノールアミンでのブロッキングを行った。異なる種の固定化FcRnとのFc含有分析物(FVIIIFcおよびIgG)の定常状態結合を、pH6.0泳動緩衝液(50mM MES[4-モルホリンエタンスルホン酸]、250mM 塩化ナトリウム、2mM 塩化カルシウム、0.01% Tween 20[ポリエチレングリコールソルビタンモノラウレート])中、16の濃度(0.0625~2000nM)での、分析物の連続注入によって評価した。各サイクルは、2連で行われ、共に5μL/分の流速の45分間の結合フェーズおよび15分間の解離フェーズを含み、次に25μL/分での1Mトリス塩酸の2回の60秒注入による再生が行われた。二重参照減算(double-reference-subtraction)(ブランクフローセルおよび泳動緩衝液のみ)の後、結合フェーズの終わり間際に記録された結合反応を分析物濃度の関数としてプロットし、EC<sub>50</sub>値(R<sub>max</sub>の50%)を非線形回帰解析から得た。

40

50

## 【0406】

## 統計解析

対応のない t 検定、一元配置 ANOVA、マン・ホイットニー検定、Dunn 事後テストを伴うクラスカル・ワリス検定、生存曲線、および関連ロジック検定を、Graph Pad Prism 5 (グラフパッドソフトウェア社 (Graph-PadSoftware Inc.)、カリフォルニア州ラ・ホーヤ)で行った。0.05未満の両側 P 値は統計的に有意と見なした。

## 【0407】

## 結果

## 組換え FV I I I F c 融合タンパク質 (r F V I I I F c)

r F V I I I F c は、ヒト B ドメイン欠失 F V I I I の、ヒト Ig G 1 由来の F c との、介在リンカー配列を持たない組換え融合物であり (図 14)、これは特徴がはっきりした HEK 293H 細胞において産生された。r F V I I I F c はタンパク質分解により細胞内で切断されて、F V I I I の A 1 ドメインおよび A 3 ドメインによって仲介される金属結合相互作用を介して非共有結合的に結合している約 90 kDa の重鎖および約 130 kDa の軽鎖 - F c を生じる。

10

## 【0408】

14 の個別のバッチからの r F V I I I F c の平均比活性は、一段階凝固 (a P T T) アッセイでは  $8460 \pm 699$  IU / mg、および発色アッセイでは  $9348 \pm 1353$  IU / mg であり、それぞれ  $1861 \pm 154$  IU / nmol および  $2057 \pm 298$  IU / nmol に相当する。r F V I I I F c の比活性は、血漿中の野生型ヒト F V I I I の比活性 ( $1429$  IU / nmol) と等程度である (Butenas, S. and Mann, K.G., Biochemistry (Mosc). 67(1):3-12 (2002))。従って、r F V I I I F c の F V I I I 活性は、ヒト F V I I I の C 末端のヒト F c の N 末端への融合によって影響を受けず、a P T T アッセイおよび発色アッセイを用いて得られた結果は互いのおよそ 10% 以内である。

20

## 【0409】

## F c R n に対する r F V I I I F c の結合

単鎖マウス、イヌ、およびヒト F c R n に対する r F V I I I F c の親和性を、表面プラズモン共鳴を用いて評価した。r F V I I I F c およびマウス F c R n 間の複合体の結合速度および解離速度は、イヌおよびヒトの F c R n の結合速度および解離速度よりもかなり遅かった。ヒト F c R n に対する r F V I I I F c の最大半量結合 ( $E C_{50}$ ) は、イヌ F c R n に対するそれよりおよそ 4 倍弱く、さらには、マウス F c R n に対するそれより 20 倍弱かった (表 11)。同様に、ヒト Ig G 1 はマウス F c R n に対して最も高い親和性も示し、一方、イヌ F c R n に対する結合親和性はマウス F c R n と比較して小さかったが、ヒト F c R n と比較して大きかった (表 11)。

30

## 【表 10】

表 11. rFVIIIIFc およびヒト IgG1 とのマウス、イヌ、およびヒト FcRn の表面プラズモン共鳴解析

Fc 試料*	FcRn	FcRn 密度 (RU)	EC <sub>50</sub> (nM) †	Rmax (RU)
rFVIIIIFc	マウス	370	< 1.5 ‡	581.4
rFVIIIIFc	イヌ	367	8.6	499.3
rFVIIIIFc	ヒト	369	33.4	365.4
ヒト IgG1	マウス	378	< 22.4 ‡	320.0
ヒト IgG1	イヌ	367	196.3	282.2
ヒト IgG1	ヒト	378	558.4	211.0

\* r F V I I I F c または I g G 1 をフローセル上に注入し、そこに種々の F c R n 分子をおよそ等しい密度 (約 370 RU) で化学的に結合させた。

† EC<sub>50</sub> 値 (R<sub>max</sub> の 50%) は、2 連で反復された、16 の分析物濃度 (0.0625 ~ 2000 nM) に当てはめられた結合反応曲線の非線形回帰解析から得られた平均であった。‡ 高親和性のため、低い分析物濃度での低結合曲線は、装置の通常の作動条件下では平衡に達しなかった。

## 【0410】

マウス内の r F V I I I F c の薬物動態における F c R n 依存的な向上

F c の F c R n との相互作用は、I g G および F c - 融合タンパク質の半減期を延長するための基礎をなす機構とみなされている。この作用機序が r F V I I I F c の半減期の延長にも関与していることを確認するために、125 IU / kg の単回静脈内投与の後、r F V I I I F c の薬物動態 (PK) プロファイルを、F V I I I 欠損 (HemA) マウス (図 15 A)、正常 (C57BL / 6) マウス (図 15 B)、F c R n 欠損 (F c R n KO) マウス (図 15 C)、およびヒト F c R n 遺伝子導入 (Tg32B) マウス (図 15 D) における r F V I I I と比較した。

## 【0411】

PK パラメーター (表 12) は、マウス血漿中のヒト F V I I I 活性の発色測定によって決定した。r F V I I I F c の t<sub>1/2</sub> は、HemA マウス (13.7 対 7.6 時間) および正常マウス (9.6 対 4.3 時間) における r F V I I I よりも、1.8 ~ 2.2 倍長かった。r F V I I I と比較した r F V I I I F c の t<sub>1/2</sub> 延長は、F c R n KO マウス (6.4 対 6.9 時間) においては消失しており、ヒト F c R n 遺伝子導入 Tg32B マウス (9.6 対 4.1 時間) においては回復された。従って、これらの結果は、r F V I I I F c の F c R n 受容体との相互作用がその延長された t<sub>1/2</sub> に関与することを確かにするものである。さらに、向上した t<sub>1/2</sub> と一致して、r F V I I I F c は、F c R n 発現 (HemA、C57BL / 6 および Tg32B) マウスにおける r F V I I I と比較して、1.6 ~ 2.4 倍より長い MRT および 1.2 ~ 1.8 倍に増加した全身暴露 (AUC) も示したが、F c R n KO マウスでは示されなかった。

10

20

30

40

## 【表 1 1】

表 12. 異なるマウス系統における rFVIIIIFc および rFVIII の PK パラメーターの概要

マウス系統	HemA <sup>†</sup>		C57BL/6 <sup>†</sup>		FcRn KO <sup>†</sup>		hFcRn 遺伝子導入 (Tg32B) <sup>†</sup>	
	rFVIIIIFc c*	rFVIII *	rFVIIIIFc *	rFVIII *	rFVIIIIFc *	rFVIII *	rFVIIIIFc *	rFVIII *
C <sub>max</sub> (mIU/mL)	2613.6	2710.4	2356.2	2000.1	2734.9	2458.4	3135.3	3137.0
半減期 (時間)	13.7	7.6	9.6	4.3	6.4	6.9	9.6	4.1
MRT (時間)	17.6	11.0	9.8	5.4	6.3	8.5	12.8	5.4
V <sub>ss</sub> (mL/kg)	68.2	49.2	67.5	50.8	49.3	51.6	64.1	49.6
CL (mL/時間 /kg)	3.9	4.5	6.9	9.3	7.8	6.1	4.1	7.3
AUC (時間 *mIU/mL)	32332.4	28026. 8	18089.1	13404. 0	16087.2	20609. 3	30534.5	17165. 7

C<sub>max</sub> : 注入後の最大血漿中 F V I I I 活性 ; MRT : 平均滞留時間 ; V<sub>ss</sub> : 定常状態での分布量 ; CL : クリアランス ; AUC : 曲線下面積。†異なるマウス系統において同一分子が異なる t<sub>1/2</sub>を示す可能性があるため、rFVIIIIFc およ rFVIII の PK パラメーターは、系統を跨がずに同一マウス系統内でのみ比較した。\*各分子の PK 評価は 36 匹のマウスから成るコホートを用い、9つの時点のそれぞれにおいての 4 匹のマウスからの末端大静脈出血によってサンプリングした。各時点における群平均を WINNONLIN (登録商標) におけるノンコンパートメントモデリングに用いて、PK パラメーター推定値を求めた。

## 【0 4 1 2】

rFVIIIIFc は HemA マウスにおける急性出血の治療に十分に活性がある。

rFVIIIIFc との比較で rFVIIIIFc の急性の効能を評価するために、HemA マウス (16 ~ 20 匹のマウス / 群) を段階的に増加させる用量 (24、72、および 216 IU/kg) の rFVIIIIFc または rFVIII で処置し、投与から 5 分後の尾切断によって傷を与えた。1 mL の失血中央値を有したピヒクル処置マウス (n = 18) と比較して、rFVIIIIFc 処置および rFVIII 処置は共に、有意に向上した保護 (P < 0.05、Dunn 事後テストを伴うクラスカル・ワリス検定) をもたらした (図 16)。失血中央値は用量が増加するにつれて次第に減少していき、72 IU/kg の rFVIIIIFc において 0.23 mL まで、および 216 IU/kg の rFVIII において 0.20 mL までの最大減少に達した。全体的に見て、失血は同じ投与量の rFVIII

I F c または r F V I I I で処置された動物において同程度であったが、このことは、両治療薬が急性動脈出血の回復に同程度に活性があることを示している。

【0413】

HemA マウスにおける r F V I I I F c の延長された予防効果

長期 P K が損傷からの長期的保護をもたらすかどうかを決定するために、HemA マウスにおける r F V I I I F c および r F V I I I の予防効果を比較した。12 IU / kg の静脈内投与の24時間後、HemA マウスの1本の外側尾静脈を切断した。傷害後、r F V I I I F c 処置マウスの100%生存 (n = 19) と比較して、49%の r F V I I I 処置マウス (n = 39) が生存した (P < 0.001、ログランク検定) (図17A)。r F V I I I F c がより長い効力期間を維持することをさらに示すために、HemA マウスを、12 IU / kg の r F V I I I F c を投与した48時間後に傷を与えた。やはり、58%の r F V I I I F c 処置マウス (n = 40) が生存し、これは、投与の24時間後に傷害された r F V I I I 処置マウスにおいて達成された生存率 (49%) と同様である (図17A)。r F V I I I F c 処置および r F V I I I 処置は共に、3%のマウスしか傷害から生存しなかった (P < 0.0001) HemA ビヒクル対照群 (n = 30) よりも、有意に良好である (図17A)。r F V I I I F c の予防効果の向上および延長は、傷害後再出血の測定によっても明らかである (図17B)。100%のビヒクル処置 HemA マウスが尾静脈切断後10時間以内に再出血した一方で、87%の r F V I I I 処置マウスおよび47%の r F V I I I F c 処置マウスが、それぞれ、投与の24時間後に与えられた傷害の後に、再出血した (P = 0.002、r F V I I I F c 対 r F V I I I) (図17B)。48時間において傷害された r F V I I I F c 処置マウスの再出血プロフィールは、投与の24時間後に傷害された r F V I I I 処置マウスのそれと概ね同程度である。対照的に、48時間において傷害された r F V I I I 処置マウスの生存および再出血プロフィールの両方は、ビヒクル対照群のプロファイルと酷似している (データ未記載)。従って、これらの結果は、r F V I I I F c が HemA マウスを尾静脈傷害から、同用量の r F V I I I によって達成されるものよりも2倍長く保護することを示している。

10

20

【0414】

血友病 A イヌにおける r F V I I I F c の改善された P K / P D

r F V I I I F c の P K および薬力学 (P D) についても、血友病 A イヌにおいて試験を行った。125 IU / kg の r F V I I I F c の静脈内投与の後、W B C T が正常なイヌにおいて8~12分の範囲にある標準へと直ちに補正された (図18A および B)。W B C T は、4匹中3匹の r F V I I I F c 処置イヌにおいておよそ4日間、および残りのイヌにおいて3日間を通して、1%超の F V I I I 活性を示す、20分未満のままであった (図18A)。114 IU / kg の r F V I I I で処置されたイヌ M 12 および 120 IU / kg の r F V I I I で処置されたイヌ M 38 においても、投与後に W B C T が標準へと直ちに補正された。しかし、W B C T は、M 12 においては2日間、M 38 においては3日間20分未満のままであり、r F V I I I F c によって達成されるものよりもおよそ1.5~2倍短かった (図18B)。さらに、r F V I I I F c 処置および r F V I I I 処置は共に、投与後5分の時点で a P T T 凝固時間も同様に向上させた。

30

40

【0415】

r F V I I I F c 抗原の P K (図19A) を、F V I I I および該分子の F c 部分の両方を検出する r F V I I I F c 特異的 E L I S A を用いて、血漿中の r F V I I I F c の濃度を測定することにより決定した。r F V I I I F c 抗原の  $t_{1/2}$  は  $15.7 \pm 1.7$  時間 (図19A) であり、発色アッセイによって測定された ( $15.4 \pm 0.3$  時間)、r F V I I I F c 活性の  $t_{1/2}$  (図19B) と同様である (表13)。F V I I I 活性および r F V I I I F c 抗原のデータの間には良好な相関関係があり、これにより、r F V I I I F c タンパク質がインビボにおいて十分に活性であったことが示される。

## 【表 1 2】

表 1 3. 血友病Aイヌにおける r F V I I I F c および r F V I I I の PK パラメーターの概要

FVIII 活性測定による PK					
処置	$C_{max}$ (IU/mL)	AUC (時間・ IU/mL)	$T_{1/2}$ (時間)	CL (mL/時間 /kg)	$V_{ss}$ (mL/kg)
rFVIIIIFc*	2.0 ±	25.9 ±	15.4 ±	5.1 ± 1.4	86.4 ±
	0.54	6.47	0.3		14.0
rFVIII†	2.0	18.2	7.4	6.5	64.0
rFVIII および rFVIIIIFc 抗原測定による PK					
処置	$C_{max}$ (ng/mL)	AUC (時間・ ng/mL)	$T_{1/2}$ (時間)	CL (mL/時間 /kg)	$V_{ss}$ (mL/kg)
rFVIIIIFc*	210 ± 33	2481 ±	15.7 ±	6.2 ± 3.0	86.1 ±
		970	1.7		19.2
rFVIII†	211	1545	6.9	8.7	80.7

\*示される結果は4匹のイヌからの平均±標準偏差である。†示される結果は平均である。2匹のイヌが利用されたため標準偏差は記載されない。

## 【0 4 1 6】

r F V I I I F c 投与の72時間前に r F V I I I の単回投与も受けた2匹のイヌ ( M 1 2 および M 3 8 ) において、 r F V I I I 抗原の  $t_{1/2}$  は 6 . 9 時間と決定され、 r F V I I I 活性は 7 . 4 時間と決定された。従って、 r F V I I I F c の血漿内半減期は、抗原および活性測定の両方による r F V I I I のそれと比較して、およそ2倍長かった。

## 【0 4 1 7】

さらに、血小板数およびフィブリノーゲンを評価して、血栓形成性の予備試験とした。 r F V I I I F c または r F V I I I を投与した後、血小板数および血漿フィブリノーゲン濃度は投与前の値から変化しなかった ( データ未記載 ) 。

## 【0 4 1 8】

## 考察

これらの試験により、 r F V I I I F c が、正常な比活性を保持するのに加えて、 H e m A マウスにおける急性出血の治療において十分に活性があることが示された。本明細書に記載されていない他の試験によって、 r F V I I I F c が、テナーゼ複合体を形成する際の F I X a、 F X、およびリン脂質との相互作用においても十分に機能的であることが示されている ( Peterset al., J. Thromb Haemost. DOI: 10.1111/jth.12076 (2012) ) 。さらに、フォンウィルブランド因子 ( V W F ) に対する結合親和性は、 r F V I I I F c および r F V I I I の間で同等であり、  $K_d$  は r F V I I I F c および r F V I I I それぞれについておよそ 1 . 4 n M および 0 . 8 n M であった ( Peterset al., J. Thromb Haemost. DOI: 10.1111/jth.12076 (2012) ) 。

10

20

30

40

50

## 【0419】

F V I I I の C 1 ドメインおよび C 2 ドメインは活性化した血小板表面上でのプロトロンビナーゼ複合体の形成に必須であるリン脂質結合に関与しなかったため、r F V I I I F c の活性は F V I I I の C 末端の、F c の N 末端との融合によって影響を受けなかった (Foster, P.A., et al., Blood. 75(10):1999-2004 (1990))。しかし、この発見は、リン脂質と結合すると考えられている残基 (例えば、C 1 内の K 2 0 9 2 / F 2 0 9 3、C 2 内の M 2 1 9 9 / F 2 2 0 0 および L 2 2 5 1 / L 2 2 5 2) が全て、F V I I I の C 末端残基の遠位にある表面を形成しているように見えるという知見と矛盾しない (Shen, B.W., et al., Blood. (2007); Ngo, J.C., et al., Structure.16(4):597-606 (2008))。

10

## 【0420】

r F V I I I F c の半減期は、内因性マウス F c R n または遺伝子導入ヒト F c R n を発現しているマウスでのみ 2 倍になり、F c R n KO マウスではそうならなかったが (図 1 5 および表 1 2 参照)、このことは、r F V I I I F c の半減期延長の機構が F c R n によって媒介されることを示している。内皮細胞および造血細胞の両方が、I g G の寿命延長および分解からの保護を促進するために、内部移行した I g G を細胞表面に再循環させることにおいて、等しく貢献していることが知られているが (Borvak, J., et al., Int Immunol. 10(9):1289-1298 (1998))、(Akilesh, S., et al., J Immunol. 179(7):4580-4588 (2007))、具体的に、どの F c R n 発現細胞型が r F V I I I F c の取り込みおよび再循環に関与しているかは知られていない。F c R n は、血管内皮、腎臓上皮、肝臓上皮、脾臓上皮、およびマクロファージを含む骨髄由来 A P C において広く発現される (Borvak, J., et al., Int Immunol. 10(9):1289-1298 (1998))、(Akilesh, S., et al., J Immunol. 179(7):4580-4588 (2007))、(Yoshida, M., et al., Immunity. 20(6):769-783(2004))。F V I I I は大部分は (約 9 8 %) V W F との複合体の状態で循環しており (Lenting, P.J., et al., J Thromb Haemost. 5(7):1353-1360 (2007))、組換え F V I I I および V W F が V W F 欠損マウスに同時注射された場合、両タンパク質は肝臓および脾臓内のマクロファージに共同在するため (van Schooten, C.J., et al., Blood. 112(5):1704-1712 (2008))、マクロファージは r F V I I I F c の分解からのレスキューおよび半減期の延長に関与している可能性がある。しかし、これらの結果は、F V I I I 異化反応のための未だ認識されていない経路、および F c 融合物によって可能となるタンパク質の救済を示すものでもあり得る。

20

30

## 【0421】

凝固因子の半減期を延長するための開発中の手法としては、ペグ化 (Rostin, J., et al., Bioconjug Chem.11(3):387-396 (2000))、(Mei, B., et al., Blood. 116(2):270-279 (2010))、糖ペグ化 (glycopegylation) (Moss, J., et al., J Thromb Haemost. 9(7):1368-1374 (2011))、(Negrier, C., et al., Blood. (2011))、およびアルブミンとの結合 (Metzner, H.J., et al., Thromb Haemost. 102(4):634-644 (2009))、(Weimer, T., et al., Thromb Haemost. 99(4):659-667 (2008)) が挙げられる。利用されるタンパク質操作にかかわらず、修飾された r F V I I I 変異体の半減期は、種々の前臨床動物モデルにおける野生型 F V I I I の最大で 2 倍になるようである (Liu, T., et al., Blood. 112:511 (2008))、(Karpf, D.M., et al., 16(Suppl. S4):40 (2010))。一貫した結果がヒトにおいて示され、例えば、r F V I I I F c が、血友病 A 患者において、A D V A T E (登録商標) と比較して、半減期をおよそ 1.7 倍に向上させることが報告された (Powell, J.S., et al., Blood. (2012) prepublished online. DOI:10.1182/blood-2011-09-382846)。この F V I I I 半減期延長の制限は、V W F に関連していると思われる。F V I I I および V W F ノックアウトマウスにおいて、予備実験によって、r F V I I I F c の半減期において r F V I I I と比較して 5 倍の増加が観察された (Liu, T et al., 未公開の結果)。同様の発見がペグ化 F V I I I を利用している V W F ノックアウトマウスにおいて以前に報告された (Mei, B., et al., Blood.116(2):270-279 (2010))。まとめると、これらの結果は、V W F が F V I I I 半減期のさらなる延長に対する制限因子

40

50

となり得ることを示している。

【0422】

半減期延長の他に、rFVIIIFcはさらなる恩恵を与える。FVIIII補充療法を用いたある大きな課題は、抗FVIIII中和抗体（阻害物質）の発生である。これは、前処置の無い患者の15～30%において発生する。rFVIIIFcは免疫寛容を誘導する可能性を有しているため、中和抗体の発生を妨げる。FVIIIIドメインをIg融合タンパク質として提示するレトロウイルスベクター形質導入B細胞が、HemAマウスにおける既存のFVIIII抗体を特異的に阻止または減少させることが報告されている（Lei, T.C. and Scott, D.W., Blood. 105(12):4865-4870 (2005)）。Fcが、インビトロにおけるTreg増殖および抗原特異的免疫応答の抑制を誘導することができる調節性T細胞エピトープを含有することも判っている（DeGroot, et al., Blood. 112(8):3303-3311 (2008)）。さらに、母系IgGおよびFc融合タンパク質の胎児循環への胎盤を横切るFcRnを介した移動（Simister, N.E., Vaccine. 21(24):3365-3369 (2003)）、Grubb, J.H., et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 105(24):8375-8380 (2008)）は、rFVIIIFcに対する新生児免疫寛容を誘導し得るが、同時に、新生児に必要な、出産中の出血からの保護も与える。

10

【0423】

結論として、rFVIIIFcが、HemAマウスの尾静脈切断損傷からの保護およびHemAマウスにおけるWBCの向上において、rFVIIIIと比較しておよそ2倍長い効力期間を与えることを示した。効力の延長は、特定且つ確立した細胞内経路を介した、Fc融合タンパク質の再循環の結果である、rFVIIIFcの $t_{1/2}$ の2倍の延長と深く関連している。

20

[実施例11]

【0424】

マウスにおけるrFVIIIFcの免疫原性

試験開始時に7～9週齢であった130匹の雄血友病Aマウスを、年齢および体重に基づいて、13の処置群に無作為に割り当てた（ $n = 10 / \text{群}$ ）。マウスを、50、100および250IU/kgのrFVIIIFc、rFVIIII-mFc、XYNTHA（登録商標）またはADVATE（登録商標）の反復的な静脈内投与で処置し、FVIIIFc、XYNTHA（登録商標）およびADVATE（登録商標）用の3つの製剤緩衝液の混合物を、ピヒクル対照群に用いた。IV投与時間は最初のIV注射後の0日目、7日目、14日目、21日目、35日目であり、血液試料は、最初の処置後の（-1）日目、14日目、21日目、28日目および42日目に、眼窩後血（Retro-orbital blood）採取によって採取した（図20）。

30

【0425】

血液採取の直後、血漿試料を遠心分離で単離し、56℃、30分間の加熱処理によって非働化して、抗FVIIII抗体の正確な測定を確実にした。総抗FVIIII抗体（図21A、21Bおよび21C）、抗FVIIII中和抗体（図23）および総Fc抗体（図24）の発生を、血漿試料を用いて調べた。

【0426】

XYNTHA（登録商標）処置マウスおよびADVATE（登録商標）処置マウスにおいて10匹中5匹のマウスおよび10匹中7匹のマウスであったのに対して、50IU/kgのFVIIIIで処置された場合、最初の注射の28日後、10匹中1匹のみのrFVIIIFc処置群内マウス、10匹中2匹のrFVIIII-mFc処置群内マウスが検出可能な抗FVIIII抗体を発生させた（図22C）。100IU/kgでは、28日目に検出可能な抗FVIIII抗体を有したマウスの数は、rFVIIIFc処置群、rFVIIII-mFc処置群、XYNTHA（登録商標）処置群およびADVATE（登録商標）処置群それぞれにおいて2、5、8および9匹であった（図22C）。超生理学的用量である250IU/kgでは、28日目に検出可能な抗FVIIII抗体を有したマウスの数は、rFVIIIFc処置群、rFVIIII-mFc処置群、XYNTHA（登録商標）

40

50

処置群およびADVATE（登録商標）処置群それぞれにおいて10、10、7および7匹であった（図22C）。14日目、21日目、および42日目に対応するデータは、図22A、22B、および22Dにそれぞれ示される。

#### 【0427】

概して、抗体全体および抗FVIIII中和抗体の間に良好な相関関係が観察され（ $R^2 = 0.7452$ ）、両方の力価は時間とともに増加した（図23）。治療的用量範囲（50および100IU/kg）内で、FVIIII特異的抗体を発生させたマウスの数およびrFVIIIFc処置群における抗体価は、ADVATE（登録商標）と比較して有意に低く（ $p < 0.05$ ）、XYNTHA（登録商標）に対してはわずかに低かった（ $p = 0.05$ ）。これらの結果は、rFVIIIFcの免疫原性が低い可能性を示している。

10

#### [実施例12]

#### 【0428】

市販のrFVIIIIと比較した、rFVIIIFcに対する脾臓リンパ細胞応答

ヒトFc（hFc、IgG1）またはマウスFc（mFc、IgG2a）と連結された場合の組換え第VIIII因子（rFVIIII）に対する脾臓リンパ細胞応答を決定し、市販のrFVIIII [完全長FVIIII（ADVATE（登録商標））およびBドメイン欠失FVIIII（XYNTHA（登録商標）/REFACTOAF（登録商標））]に対する脾臓リンパ細胞応答と比較した。

#### 【0429】

HemAマウスに、週1回、6週間、50IU/kgまたは250IU/kgの試験分子を注射した。56日目に、各群からの4匹のマウスを安楽死させ、脾細胞を単離した（図25）。半分の脾細胞を、フローサイトメトリー（FACS）を用い、細胞内サイトカイン、調節性T細胞のマーカー、および樹状細胞の染色によって脾臓免疫原性プロファイルを決定するために使用した（図26）。細胞のもう半分は、RNAを単離し、リアルタイムPCRに基づくアレイを用いる経路プロファイリングを実行するために使用した。図27Aは、アイソタイプ対照のFACSドットプロットプロファイルを示している。図27Bは、CD4およびTNF- $\alpha$ の両方について陽性である脾細胞を含有する試料のFACSドットプロットプロファイルを示している。二重陽性細胞の割合（%）を、全ての処置およびピヒクルから得られたドットプロットから決定した。FVIIII処置マウスにおける二重陽性細胞の割合（%）を、ピヒクル処置群と比較することにより求めた。

20

30

#### 【0430】

細胞内サイトカイン染色を、Tヘルパー細胞マーカーのCD4、並びにIL-2（図28）、IL-4（図30）、およびTNF- $\alpha$ （図29）等のサイトカインに対する共染色によって行った。IL-2は、HemAマウスにおいてFVIIIIに应答して活性化T細胞によって分泌される、T細胞増殖に関するT細胞マイトジェンである。IL-4は、HemAマウスにおいてFVIIIIに应答して活性化T細胞によって分泌されるサイトカインとして同定されている。TNF- $\alpha$ は、血友病患者におけるより高い抗体産生に関連する炎症誘発性サイトカインである。各染色の蛍光強度を、フローサイトメトリーを用いて測定した。

#### 【0431】

同様に、免疫寛容誘発性樹状細胞および免疫原性樹状細胞の比率を、PD-L1（CD274）（図32）およびCD80（図33）等のマーカーの表面染色およびフローサイトメトリー解析によって決定した。PD-L1は、活性化T細胞上のPD-1受容体と結合することにより、T細胞受容体（TCR）が介在するIL-2産生および増殖を遮断する抑制性リガンドである。PD-L1のより高いDC発現は、免疫原性を阻害し寛容を促進し得る重要な要素である。CD80は、抗原をT細胞に提示するための、抗原の貪食時および成熟中に樹状細胞上に通常見られる表面マーカーである。CD80は、増殖のためにT細胞を活性化させる際の補助受容体の一団に属する。CD80の表面染色が多いほど、樹状細胞によるより良好な成熟および抗原提示を間接的に示す。

40

#### 【0432】

50

さらに、脾臓中の調節細胞 (Treg) の割合 (%) を、これらの細胞のマーカーである CD4 および foxp3 の共染色によって評価した (図 34)。Foxp3 は調節性 T 細胞の細胞内マーカーである。Foxp3 + T 細胞は、T 細胞媒介性末梢性寛容の確立、維持、および養子移入に関与する。

#### 【0433】

CD4 マーカーおよび Tim3 (図 35) マーカーまたは CD279 (PD-1) (図 36) マーカーの両方を発現する細胞の存在についても評価した。Tヘルパー1 (Th1) 細胞応答の負の制御因子としての Tim3 (T細胞免疫グロブリン領域およびムチンドメイン3 (T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3))。Tim3 は自然免疫細胞によっても発現され、炎症誘発反応を促進し得る。Tim3 は Th1 媒介性の自己免疫反応および同種免疫反応を阻害し、そのリガンドであるガレクチン-9 を介して作用することで Th1 において細胞死を誘導するが、Th2 細胞においては誘導しない。CD279 (PD-1) は、T細胞制御因子である広範囲にわたる CD28 / CTLA-4 ファミリーのメンバーである。PD-1 は活性化された T細胞、B細胞、およびマクロファージの表面上に発現されるが、このことは、CTLA-4 と比較して、PD-1 はより広範に、免疫応答を負に調節することを示している。

10

#### 【0434】

免疫原性および阻害物質形成に関与する試験されたサイトカインの中で、50 IU/kg の rFVIIIFc または rFVIIIFc を注射されたマウスにおいて、IL-4 および TNF- $\alpha$  のレベルの著しい阻害があり、IL-2 のレベルはビヒクル注射群と比較して変化しなかった。逆に、これらのサイトカインのレベルは、250 IU/kg のこれらの分子を与えられた群においてより高かった。50 IU/kg の XYNTHA (登録商標) または ADVATE (登録商標) を注射されたマウスはいかなる阻害も示さなかったが、250 IU/kg 群は IL-2、IL-4、および TNF- $\alpha$  の細胞内含量において増加を示した。さらに、50 IU/kg の rFVIIIFc を注射されたマウスにおいて、他の処置と比較してより高い割合の foxp3 陽性 T細胞が存在した。50 IU/kg の rFVIIIFc および rFVIIIFc を与えられているマウスは、T細胞活性化および増殖の抑制シグナルである PD-L1 (CD274) について陽性の、より高い割合の脾臓樹状細胞を有した。これらの群は、CD80 染色における減少によって示される、より高い割合 (%) の未成熟樹状細胞も有した。

20

30

#### 【0435】

これらの結果は、hemA マウスにおける 50 IU/kg の rFVIIIFc が、市販の rFVIIIFc [完全長 FVIIIFc (ADVATE (登録商標)) および Bドメイン欠失 FVIIIFc (XYNTHA (登録商標)) / REFLECTO AF (登録商標)] よりも低い免疫原性を示したことを示している。従って、rFVIIIFc はより少ない抗体産生を促進し、免疫寛容を誘導し得る。

#### [実施例 13]

#### 【0436】

マウスにおける rFVIIIFc の体内分布およびクリアランス

IgG1 Fc (rFVIIIFc) の定常領域への単一 FVIIIFc 分子の組換え融合は、rFVIIIFc と比較して、抗体を血流中に再循環させる天然経路を用いる FcRn 依存的な様式で、クリアランスを減少させることが示されている (Powell et al., 2012 Blood)。さらに、上で開示されるように、血友病 A 対象における第 1 / 2 a 総臨床試験によって、rFVIIIFc が組換え完全長 FVIIIFc (ADVATE (登録商標)) よりも 1.5 ~ 1.7 倍より長い半減期を有することが示された。従って、(i) rFVIIIFc の保護に寄与する細胞型および器官を特定するため、並びに (ii) マウスにおける rFVIIIFc の体内分布およびクリアランスに対する FVIIIFc および Fcドメインの相対的寄与を評価するために、試験を行った。

40

#### 【0437】

rFVIIIFc のクリアランスを、FVIIIFc (HemA) またはフォンウィルブラ

50

ンド因子 (VWF) を欠失している遺伝子修飾 KO マウスモデルにおいて、rFVIIIFc に対して比較した。静脈内投与されるクロドロネート含有脂質小胞を、これらのマウスモデルにおけるクッパー細胞および単球/マクロファージを枯渇させるために用いた。枯渇の有効性を免疫組織化学および FACS 解析によって定量した。薬物動態解析を、rFVIIIFc または rFVIIIFc の静脈内注射の後の FVIIIFc 特異的 Coatest アッセイによって行った。

#### 【0438】

HemA マウスにおけるクッパー細胞枯渇は rFVIIIFc クリアランスを増加させた。さらに、VWF 非存在下 (HemA/VWF ダブルノックアウトマウス) では、クッパー細胞およびマクロファージの枯渇は、rFVIIIFc のクリアランスを rFVIIIFc のクリアランスと同様のレベルにまで増加させたが、このことは、これらの細胞が、このモデルにおいての rFVIIIFc および rFVIIIFc 間のクリアランス差異の大部分に参与していることを示している。

10

#### 【0439】

これらの試験は、クッパー細胞が FcRn に仲介される rFVIIIFc の再循環に参与している可能性があることを示している。骨髄移植を用いた FcRn KO マウスでの試験が、この機構を検証するために進行中である。インビトロ細胞取り込み実験と組み合わせられたこれらの試験は、クッパー細胞の参与を、内皮細胞を含む他の FcRn 発現細胞型から区別する試みである。

20

#### [実施例 14]

#### 【0440】

血友病 A マウスにおける、rFVIIIFc に対する細胞媒介性の免疫応答

本試験の目的は、より良好な血友病 A の治療管理を設計する上で重要な、組換え FVIIIFc に対する細胞媒介性の免疫応答を確認することであった。従って、ヒト Fc に連結している場合の組換え FVIIIFc (rFVIIIFc) (rFVIIIFc; IgG1) に対する脾臓リンパ細胞応答を、市販の完全長 rFVIIIFc (ADVATE (登録商標)) および Bドメイン欠失 rFVIIIFc (XYNTHA (登録商標)/REFACTO AF (登録商標)) と比較して調べた。HemA マウスに、50、100 または 250 IU/kg の用量を、週 1 回を 4 回、続いて 2 週に 1 回を 2 回注射した。8 週目の終わりに、各群からのマウスを安楽死させ、フローサイトメトリーおよび RNA プロファイリングを用いて調節性 T 細胞および樹状細胞のマーカーである細胞内サイトカインについて検査することにより、それらの脾臓白血球免疫原性プロファイルを決した。50 IU/kg の rFVIIIFc を注射したマウスにおいて、IL-2、IL-4 および bTNF- (免疫原性を促進するサイトカイン) のレベルにおいて著しい阻害があった。これらのサイトカインのレベルは、250 IU/kg の rFVIIIFc 分子を与えられているマウスにおいてより高かった。50 IU/kg の XYNTHA (登録商標) または ADVATE (登録商標) を注射されたマウスはいかなる阻害も示さず、一方、250 IU/kg 群は IL-2、IL-4、および TNF- の細胞内含有量において増加を示した。さらに、50 および 100 IU/kg の rFVIIIFc を注射されたマウスにおいて、他の処置と比較してより高い割合の foxp3 陽性 T 細胞が存在した。50 および 100 IU/kg の rFVIIIFc を与えられているマウスは、T 細胞活性化および増殖の抑制シグナルである PD-L1 (CD279) について陽性の、より高い割合の脾臓樹状細胞を有した。これらの群は、CD80 染色における減少によって示される、より高い割合の未成熟樹状細胞も有した。従って、rFVIIIFc の 50 および 100 IU/kg 用量の両方が、このモデルにおいてより低い免疫原性および抗体産生を示した。

30

40

#### 【0441】

序論

FVIIIFc に対する阻害物質の発生は、血友病 A の管理において重篤な合併症として認識されている。阻害物質形成の発生率は、全血友病 A における 20% ~ 30% から、重症における 30 ~ 40% までにわたると推定されている。(Green, Haemophilia 17:831-838

50

(2011); Eckhardt et al. J. Thromb. Haemost. 9:1948-58(2011) )。阻害物質陽性疾患は、現在は、F V I I I の頻回高用量投与を含む免疫寛容誘導によって管理される。患者における阻害物質形成の機構はほとんど知られておらず、複数の危険因子並びに免疫系の細胞および分子に依存している。

#### 【 0 4 4 2 】

血友病における阻害物質発生には、免疫系の複数の細胞型、表面分子および分泌タンパク質、例えば、Tリンパ球、Bリンパ球、抗原提示細胞 ( A P C ; 樹状細胞およびマクロファージ)、サイトカイン、およびこれらの細胞型の調節性成分の複雑な相互作用が関与している。B細胞による抗体産生は、A P C からの抗原提示によって活性化されるT細胞からの最適な支援に依存している。

10

#### 【 0 4 4 3 】

注射された治療用のペプチドおよびタンパク質 (例えば、組換えF V I I I ) への寛容は、調節性T細胞 ( T r e g ) と称されるT細胞の一種により仲介される ( Cao et al., J. Thromb. Haemost. 7(S1):88-91 (2009) )。血友病患者における阻害物質形成と関連があるいくつかの重要な分子が特定されている。これらには、2 ~ 3例を挙げると、炎症誘発性サイトカインT N F -  $\alpha$ 、抗炎症サイトカインインターロイキン ( I L ) - 1 0、およびT r e g マーカーC T L A 4 が含まれる ( Astermark et al., J. Thromb. Haemost. 5:263-5 (2007); Pavlova et al. J. Thromb. Haemost. 7:2006-15 (2009) )。

#### 【 0 4 4 4 】

この試験において、組換え第V I I I 因子F c 融合タンパク質 ( r F V I I I F c ) に対する脾臓リンパ細胞応答を、市販の完全長r F V I I I ( f l - r F V I I I ; A D V A T E (登録商標) ) およびBドメイン欠失r F V I I I ( B D D - r F V I I I ; X Y N T H A (登録商標) / R E F A C T O A F (登録商標) ) と比較して調べた。

20

#### 【 0 4 4 5 】

材料および方法

材料

第V I I I 因子欠損マウス ( Bi et al. Nat Genet. 10:119-21(1995) ) は、K a z a z i a n 博士 ( ペンシルバニア大学、ペンシルバニア州フィラデルフィア ) から最初に入手し、バイオジェン・アイデック・ヘモフィリアまたはチャールスリバー研究所で繁殖コロニーとして維持した。

30

#### 【 0 4 4 6 】

染色およびF A C S 解析に用いた抗体は、B D バイオサイエンス社 ( 米国、ニュージャージー州フランクリン・レイクス ) またはイーバイオサイエンス社 ( eBioscience ) ( 米国カリフォルニア州サンディエゴ ) から入手した。使用した抗体は、マウスC D 4 ( T - ヘルパー細胞)、C D 1 1 c およびC D 8 0 ( 樹状細胞)、P D - 1、P D - L 1、C D 2 5 ( T r e g 細胞) 等の表面マーカー、細胞内サイトカイン ( I L - 2、I L - 4、T N F -  $\alpha$  )、並びに転写因子 ( F o x p 3 ) に対するものである。

#### 【 0 4 4 7 】

免疫原性試験デザイン

3つの処置群に、50、100、または250 I U / k g の静脈内投与を与え、それらは、幾日かに投与された ( 図 3 7 )。それぞれの処置および服用レベルを10匹のマウスに投与した。動物を56日目にC O 2 吸入により安楽死させ、脾臓を無菌P B S 中に切除した。

40

#### 【 0 4 4 8 】

脾細胞をマウス脾臓分離キットおよびg e n t l e M A C S 分離器 ( ミルテニーバイオテク社、ドイツ、コロニー ) を用いて分離した。脾細胞の単一細胞懸濁液を、F A C S 染色用に3%ホルマリン中で固定するか、またはR N A 単離用の解離緩衝液 ( ロシュ社 ) 中に保存した。

#### 【 0 4 4 9 】

評価

50

抗FV I I I抗体を、社内で開発したE L I S Aを用いて決定した。簡潔に述べると、F V I I Iを96ウェルプレート上にコートし、それを用いて特定の時点に採取されたマウス血漿からの抗体を補足した。F V I I I特異的抗体を、抗マウスI g G二次抗体を用いて検出した。単離したマウス脾細胞に対してT細胞応答プロファイリングを行った(図38)。脾臓内のリンパ球および樹状細胞を、表面標的および細胞内標的に対して染色した。

#### 【0450】

表面染色のために $n$ 、 $1 \times 10^6$ 個の全脾細胞を、適切な濃度の抗体と一緒にインキュベートした。細胞内染色のために、細胞をBD Fix-Perm溶液(BDバイオサイエンス社)で透過処理し、次に、同一緩衝液中のサイトカインに対する抗体と一緒にインキュベートした。Foxp3染色は、Foxp3染色緩衝液(BDバイオサイエンス社)中の抗体を用いて行った。BD FACS Canto IIを用いて蛍光強度を記録し、FLOWJO(登録商標)ソフトウェアを用いて解析を行った。

10

#### 【0451】

リンパ球を、CD4および細胞内マーカーのIL-2、TNF- $\alpha$ 、およびIL-4で、共染色した。Treg細胞を表面マーカーのCD4およびCD25に対して染色し、次に細胞内Foxp3に対して染色した。脾細胞をCD11cおよびPD-L1(樹状細胞)またはCD4およびPD-1(CD4+T細胞)に対して染色して、PD-L1-PD-1経路に關与する細胞を特定した。全RNAを単離し(ロシュ社)、cDNA(キアゲン社、ドイツ、ヒルデン)に逆転写した。TGF- $\beta$ 、IL-10、IL-12a、およびEBI-3に対するプライマーを、IDTテクノロジーズ社(IDTtechnologies)から購入した。SYBR greenに基づくリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を、ABI 7900 Fast BlockリアルタイムPCR装置を用い、Quantitect系(キアゲン社)を用いて行った。7500ソフトウェア(バージョン2.0.5)を用いてデータを解析した。

20

#### 【0452】

結果

#### 42日目の全抗FV I I I抗体レベル

42日目の全抗FV I I I I g Gレベルを、50、100または250IU/kgのrFV I I I Fc、BDD-FV I I I(XYNTHA(登録商標))または完全長FV I I I(fl-rFV I I I)(ADVATE(登録商標))を注射された血友病Aマウスの血漿から、E L I S Aを用いて定量した。50および100IU/kgの両方において、rFV I I I Fc群は、BDD-rFV I I Iおよび完全長fl-FV I I Iと比較して有意により低い抗体レベルを有し、これは、rFV I I I Fc注射によって付与されるFV I I Iに対するより低い抗原性を示すものであった。250IU/kgにおいては、これらの群には互いに有意な差はなく、高い抗体レベルを有した(図39)。

30

#### 【0453】

CD4+細胞における細胞内サイトカイン(IL-2およびTNF- $\alpha$ )

各処置群において50IU/kgを与えられたマウスは、FV I I Iに対する抗体レベルに基づいて非応答性であったが、一方、各処置群において250IU/kgを与えられたマウスは、最も高い抗体レベルを有して応答性であった(データ未記載)。50および100IU/kg用量でのrFV I I I Fc(図40Aおよび図40B)は、IL-2およびTNF- $\alpha$ 陽性CD4+細胞の割合を減少させ、これによりより低い免疫原性が示されたが、一方、BDD-rFV I I Iおよび完全長rFV I I Iはより高いサイトカイン陽性細胞を示した。250IU/kg用量での3種全ての処置(図40C)が、サイトカイン陽性細胞の割合を高め、これは、この用量でのより高い免疫原性を示すものであった。同様の結果がIL-4についても得られた。

40

#### 【0454】

CD4/CD25/Foxp3三重陽性細胞(Treg細胞のマーカー)

100IU/kg用量において、ピヒクルを超える、Treg細胞の割合増加は、BD

50

D - r F V I I I 群および f l - r F V I I I 群と比較して、r F V I I I F c 群において有意により高かった ( $P < 0.05$ ) (図 4 1)。50 IU/kg の r F V I I I F c においても同様の結果が得られ、このことは、50 および 100 IU/kg の r F V I I I F c 処置の両方が、T r e g 細胞の優勢を促進し、F V I I I に対する免疫応答を抑制し得ることを示している。

#### 【0455】

寛容関連性サイトカインに対するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応

免疫寛容関連性のサイトカイン、すなわち T G F - (図 4 2 A)、I L - 1 0 (図 4 2 B) および I L - 3 5 (I L - 1 2 a および E B I - 3 サブユニット、図 4 2 C および 4 2 D にそれぞれ示される) に対するリアルタイム P C R 分析を、100 IU/kg 処置群に属するマウスから単離した R N A を用いて行った。m R N A レベルは、100 IU/kg において、r F V I I I F c 群 ( $P < 0.05$ ) の試験サイトカインにおいて、その他の処置と比較して上方制御され、これにより、免疫寛容誘発性サイトカインを活発に発現することで免疫抑制性微小環境を促す脾細胞の存在が示された。免疫寛容マーカーの F o x p 3 (図 4 2 E)、C D 2 5 (図 4 2 F)、C T L A - 4 (図 4 2 G)、およびインドルアミン 2, 3 - ジオキシゲナーゼ (I D O - 1) (図 4 2 H) の m R N A 発現は、100 IU/kg 群からの全脾細胞においてより高かった。

#### 【0456】

P D - L 1 - P D - 1 経路の F A C S 解析

樹状細胞上の P D - L 1 (C D 2 7 4) は T 細胞上の P D - 1 (C D 2 7 9) と結合して、T 細胞の活性化および増殖を抑制し、それによって免疫応答の抑制をもたらす阻害経路を促進する。100 IU/kg 群から得た脾細胞を、表面 C D 1 1 c および P D - L 1 (図 4 3 A)、または C D 4 および P D - 1 (図 4 3 B) に対して染色した。100 IU/kg 用量において、P D - L 1 陽性の樹状細胞の割合 (%) および P D - 1 陽性の T 細胞の割合 (%) は、B D D - F V I I I および f l - r F V I I I を与えられている動物と比較して、r F V I I I F c を与えられている動物においてより高かった ( $P < 0.05$ )。これにより、r F V I I I F c による、樹状細胞および T 細胞の両方における免疫抑制経路の正の調節が示された。

#### 【0457】

考察

上記の実験結果により、50 および 100 IU/kg の用量の r F V I I I F c が、以下によって示されるように、低い免疫原性を有し、F V I I I に対する寛容を促進したことが示された：

(a) C D 4 + T 細胞における、他の F V I I I 分子と比較してより低レベルの免疫原性促進性 (pro-immunogenic) サイトカイン (I L - 2 および T N F - ) ;

(b) r F V I I I F c 注射マウスにおける免疫寛容に関与する調節性 T 細胞およびマーカー (F o x p 3、C D 2 5、P D - 1、C T L A 4) の上方調節。F o x p 3 + T r e g の重要性および血友病における F V I I I に対する寛容促進での C T L A 4 の役割が、以前に報告されている (Cao et al., J. Thromb. Haemost. 7(S1):88-91 (2009); Astermark et al. J. Thromb. Haemost. 5:263-5 (2007))。

(c) r F V I I I を注射されたマウスの脾細胞における、より高レベルの免疫寛容誘発性サイトカイン (I L - 1 0、T G F -、I L - 3 5)。これらのマーカーは、いくつかの研究において、重要な免疫調節性サイトカインであり、免疫寛容の主要な決定因子であることが示されている (Biet et al., Nat. Genet. 10:119-21 (1995))。

(d) r F V I I I F c 注射後のマウスにおける、免疫寛容誘発性樹状細胞集団 (P D - L 1、I D O - 1、および減少した C D 8 0) の増加。同時に、r F V I I I F c 処置マウスは、50 および 100 IU/kg の用量において F V I I I に対する抗体がより少ない、または存在しないこと (Liu et al., WFH Abstract #FB-WE-04.2-5 (2012))、並びに 50 IU/kg の r F V I I I F c で寛容化された後に 250 IU/kg の暴露に耐えたことも示された。

10

20

30

40

50

## 【0458】

## 結論

r F V I I I F c 処置マウスは、伝統的な F V I I I 治療と比較して、50 および 100 I U / k g の用量において、F V I I I に対する抗体がより少ないか、またはそれが存在しなかった。マウスにおける T 細胞および樹状細胞の試験に基づき、r F V I I I F c は、伝統的な F V I I I 治療よりも低い免疫原性であることが判明し、免疫寛容誘発性経路を促進した。r F V I I I F c は、免疫寛容を示すものである、血友病 A マウスの脾細胞における重要な免疫調節性サイトカインを上方制御した。まとめると、これらの発見は、低用量 (50 および 100 I U / k g) の r F V I I I F c を注射されたマウスの脾臓における免疫寛容誘発性の微小環境の存在を示している。

10

## 【0459】

これらの試験により、r F V I I I F c が樹状細胞シグナル伝達を活性化し、これが免疫寛容の重要な決定因子であることが初めて示された。これらの発見は、血友病 A マウスにおいて r F V I I I F c によって付与される、F V I I I に対する機能的免疫寛容の存在を示している。

## [ 実施例 15 ]

## 【0460】

血友病 A マウスにおける、X Y N T H A (登録商標) および A D V A T E (登録商標) と比較した、r F V I I I F c に対する抗体応答の評価

補充 F V I I I に対する抑制抗体の発生は前処置の無い患者の 20 ~ 30 % で生じ、血友病治療の最も重篤な合併症である。F V I I I の頻回投与を必要とする免疫寛容誘導 (I T I) が、阻害物質を発生させる患者を治療するために現在用いられている。しかし、これらの患者の一部は I T I に応答しない。例えば、Green, Haemophilia 17:831-838 (2011); Eckhardt et al. J. Thromb. Haemost. 9:1948-58(2011); Cao et al., J. Thromb. Haemost. 7(S1):88-91 (2009) を参照されたい。組換え F V I I I F c は、r F V I I I の半減期よりおよそ 1.6 倍長い半減期を有し、現在、第 2 / 3 相の臨床開発中である。本明細書で開示される実験により、r F V I I I F c の免疫原性および免疫寛容特性が、血友病 A (Hem A) マウスにおいて、他の r F V I I I 補充タンパク質と比較して評価される。

20

## 【0461】

(a) Hem A マウスにおける r F V I I I F c、X Y N T H A (登録商標) および A D V A T E (登録商標) の免疫原性比較

## 抗体応答

1 群あたり 9 ~ 12 匹の Hem A マウスを有する Hem A マウスの 4 つの群を、50 I U / k g、100 I U / k g および 250 I U / k g 用量の r F V I I I F c、X Y N T H A (登録商標)、A D V A T E (登録商標)、およびビヒクル対照で処置した。0 日目、7 日目、14 日目、21 日目、および 35 日目に各用量を投与した。0 日目、14 日目、21 日目、28 日目および 42 日目に血液を採取した (図 44)。

30

## 【0462】

r F V I I I F c は、50 I U / k g (図 45) および 100 I U / k g (図 46) において、X Y N T H A (登録商標) および A D V A T E (登録商標) と比較して有意により低い抗体応答を誘導した。しかし、全ての F V I I I タンパク質が、250 I U / k g において同様の抗体応答を示した (図 47)。中和抗体の力価は総結合抗体レベルと相関した (図 48)。

40

## 【0463】

(b) Hem A マウスにおける r F V I I I F c、X Y N T H A (登録商標) および A D V A T E (登録商標) の免疫原性比較

## T 細胞応答プロファイリング

脾細胞における T 細胞応答プロファイリングにおいて、r F V I I I F c、X Y N T H A (登録商標)、A D V A T E (登録商標)、およびビヒクル対照の追加用量を 53 日目

50

に投与した。脾臓を56日目に採取した(図49)。rFVIIIFcがCD4/CD25/Foxp3陽性Treg細胞の優勢を促進することが、結果により示された(図50、右パネル)。

#### 【0464】

##### 概要

rFVIIIFcの投与により、50および100IU/kgの用量において、XYNTHA(登録商標)およびADVATE(登録商標)と比較して有意により低度な抗体応答がもたらされた。50および100IU/kgのrFVIIIFc投与後の免疫寛容誘発プロファイルにより、rFVIIIFcがTreg細胞の優勢を促進し、FVIIIFcに対する免疫応答を抑制し得ることが示された。

10

#### 【0465】

##### (c) rFVIIIFc免疫寛容化試験

rFVIIIFcの反復投与がインビボにおいて機能的寛容を誘導し得るかどうかを調べるために、以下の投与計画を採用した。HemAマウス(8~10週齢)に、50IU/kgのrFVIIIFcまたはビヒクルを、毎週、4週間(0、7、14、21日目)注射し、その後35日目に1回注射した。49日目を起点として、これらのマウスに週1回の250IU/kgのrFVIIIFcを暴露して、これらの動物が高用量のrFVIIIFcに耐え得るかどうかを決定した。暴露用量は、試験の49日目を起点として0、7、14、および21日目に投与した(図51参照)。血液試料を特定の時点で採取して、ELISAを用いて抗FVIIIFc抗体の有無を確認した。図52に示されるように、rFVIIIFcの反復投与によって、250IU/kgの高用量で暴露されたときに、rFVIIIFcに対する抗体において統計的に有意な減少がもたらされたが、一方、ビヒクルを与えられた動物は暴露時により高いレベルの抗体を有した。これは、従った投与計画に基づく50IU/kgでのrFVIIIFcの反復投与が、より高用量のrFVIIIFc(250IU/kg)に対する寛容を誘導し得ることを明らかに示している。

20

#### 【0466】

##### 結論

治療量において、rFVIIIFcは、(1)XYNTHA(登録商標)およびADVATE(登録商標)と比較してより低い免疫原性であり、(2)HemAマウスにおいてFVIIIFcに対する免疫寛容を誘導することが可能であることが判った。

30

#### 【0467】

現在、低用量のrFVIIIFcでも、より高用量のrFVIIIFcに対する免疫寛容化をもたらすことができるかどうか決定されている。本試験では、より低用量のrFVIIIFc(すなわち25IU/kgおよび10IU/kg)が寛容誘導フェーズ中に用いられている。この後に、以前の研究で行われたような、250IU/kgのrFVIIIFcでの暴露、およびFVIIIFcに対する抗体の測定が行われる。

##### [実施例16]

#### 【0468】

##### 血友病AマウスにおけるrFVIIIFcのクリアランス経路

持続性組換え凝固FVIIIFc融合タンパク質(rFVIIIFc)は、現在、血友病Aを有する個体の発症時治療および予防的処置の第3相臨床試験にある。組換え完全長FVIIIFc(ADVATE(登録商標)、バクスター・ヘルスケア・コーポレーション社(BaxterHealthcare Corporation))と比較した場合、rFVIIIFcは、血友病Aを有する患者において、1.7倍に延長された半減期および有意に減少されたクリアランスを有する。Powell et al., Blood 119:3031-7(2012)を参照されたい。この向上した薬物動態(PK)プロファイルは、Fcと新生児Fc受容体(FcRn)との相互作用によって媒介される。Dumontet et al., Blood 119:3024-30(2012)を参照されたい。rFVIIIFcは、ヒト免疫グロブリンG1のFcドメインに直接結合した単一Bドメイン欠失ヒト凝固FVIIIFcから成り、FcRnとの相互作用を介して細胞取り込み(エンドサイトーシスまたはピノサイトーシス)後に自然に再循環される(図53)。肝臓常在性マク

40

50

ロファージ（クッパー細胞）を含む単球細胞（マクロファージおよび樹状細胞）は、フォンウィルブランド因子（VWF）およびFVIIIのクリアランスと関連付けられている（図54）。vanSchooten et al., Blood 112(5):1704-12(2008)を参照されたい。

【0469】

rFVIIIFcの取り込み、クリアランス、およびFcRn仲介性の再循環に關与する細胞型を明らかにするために、遺伝子修飾マウスモデルにおいて、rFVIIIFcのクリアランスに対するマクロファージおよびクッパー細胞の枯渇の影響を試験した。

【0470】

材料および方法

rFVIIIFcおよびrFVII（BDD）のクリアランスを3種のノックアウト（KO）マウスモデルにおいて比較した：（1）血友病A（FVII KO）、FVII欠損；（2）FVIIおよびVWFの二重KO（DKO）、FVIIおよびVWFの両方の発現欠如；並びに（3）FcRn-KO、FcRnの発現欠如。3種のモデル全てにおいて、マクロファージおよびクッパー細胞を、CLODROSOME（登録商標）（エンキャプスラ・ナノサイエンス社（EncapsulaNanoSciences, Inc））を用いて枯渇させ、このCLODROSOME（登録商標）は、マクロファージにより特異的に貪食されるリポソームの膜に包まれた毒性ATP類似体（クロドロネート）であり、アポトーシスを誘起させる。vanRooijen & Hendriks, Methods Mol. Biol. 605:189-203 (2010)を参照。

10

【0471】

各群の対照マウスをENCAPOSOME（登録商標）非毒性リポソームで処置した（図55）。FVIIまたはrFVIIIFcの単回静脈内用量（125または250 IU/kg）を、リポソームでの処置の24時間後に注射した。血液試料を、眼窩後または大静脈血液採取によって特定の時点で採取した（時点あたり4サンプル）。

20

【0472】

次に、血漿試料中のヒトFVII活性をFVII発色アッセイで測定し、PKパラメーターはノンコンパートメント解析モデルを用いてWINNONLIN（登録商標）ソフトウェア（ファースイト社（PharsightCorp.））で推定した。

【0473】

クッパー細胞およびマクロファージの枯渇を免疫組織化学染色で評価し、VisioPharmソフトウェア（デンマーク、ヒョースホルム）を用いて、または逆転写（reverse transcription）ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって、定量した。

30

【0474】

結果

（a）マクロファージおよびクッパー細胞の枯渇

図56は、血友病Aマウスの対照ENCAPOSOME（登録商標）（A、A'）処置またはCLODROSOME（登録商標）（B、B'）処置の24時間後の、特異的なマクロファージマーカーであるIba-1に対する抗体による代表的な肝臓切片の染色を示している。A'およびB'は、染色されたクッパー細胞（空色）、全組織領域（濃紺色）、および空領域（灰色）を強調している定量マスクを示している。同様の枯渇プロファイルが他のマウス系統で得られた。陽染領域の定量分析により、90%超の肝臓クッパー細胞が枯渇され、CLODROSOME（登録商標）処置後に3日間よりも長く（n=4）、対照ENCAPOSOME（登録商標）処置動物と比較して、低く維持されたことが示された（図57）。循環単球細胞もCLODROSOME（登録商標）処置の24時間以内に50%超減少し、これはF4/80+に対する標識抗体で染色された血液細胞のフローサイトメトリー分析によって評価された（n=4）。48時間以内に、枯渇した血液細胞は回復した（図57）。観察された肝臓内マクロファージの枯渇と一致して、マクロファージマーカーである上皮増殖因子モジュール含有ムチン様受容体1（epidermal growth factor module-containing mucin-like receptor 1: Emr1）（F4/80）の発現のRT-PCR分析により、CLODROSOME（登録商標）処置が、血友病Aマウスの肝

40

50

臓および肺においてEmr1のmRNA発現を95%超減少させたことが示された(図58)。Emr1はヒトタンパク質に使用される名称である。マウス相同体はF4/80として知られている。Emr1は成熟マクロファージの細胞表面上に存在する膜貫通型タンパク質である。

#### 【0475】

(b) マウスモデルにおけるFVIIのクリアランス

クッパー細胞がFVIIおよびVWFの両方のクリアランスに關与することを示唆する既に報告された結果(van Schooten CJ, et al. Blood. 112(5):1704-12(2008))とは対照的に、クッパー細胞の枯渇は、血友病AマウスにおけるFVIIクリアランスの予想された減少を引き起こさなかった(図59)。その逆に、血友病Aマウスにおけるクッパー細胞の枯渇によって、rFVIIIFcのクリアランスが有意に増加された(図59)。同様に、DKOマウスでは、クッパー細胞の枯渇はFVIIクリアランスを引き起こさず、rFVIIIFcのクリアランスを有意に増加させた(図60)。FcRn-KOマウスでは、クッパー細胞の枯渇はFVIIまたはrFVIIIFcのクリアランスに影響を与えなかった(図61)。

10

#### 【0476】

結論

血友病AマウスおよびDKOマウス(FVIIおよびVWF欠失)におけるマクロファージおよびクッパー細胞の枯渇はrFVIIIFcクリアランスを増加させたが、FVIIクリアランスは減少させず、このことは、マクロファージおよびクッパー細胞が、これらのマウスにおけるFVIIおよびrFVIIIFcの間のクリアランスの差の大半の原因となっている可能性があることを示している。VWFおよびFVII両方の非存在下では(DKOマウス)、マクロファージおよびクッパー細胞の枯渇は、rFVIIIFcのクリアランスを、FVIIのクリアランスに近づくレベルにまで増加させる。

20

#### 【0477】

血友病AマウスまたはDKOマウスにおけるFVIIクリアランスに対するクッパー細胞枯渇の影響の欠如は、以前の公表された研究と対照をなしている。van Rooijen & Hendriks, Methods Mol. Biol. 605:189-203 (2010)を参照されたい。FcRn-KOマウスにおけるマクロファージおよびクッパー細胞の枯渇は、FVIIおよびrFVIIIFcの間の有意なクリアランスの差異をもたらさなかったが、このことは、マクロファージが媒介するrFVIIIFc再循環におけるFcRnの潜在的役割を示している。

30

#### 【0478】

まとめると、これらの研究により、rFVIIIFcがマクロファージ依存のおよび/またはクッパー細胞依存に保護されること、並びにこれらの細胞における天然経路がFcRnにより媒介されるrFVIIIFcの再循環に寄与している可能性があることが示された。

[実施例17]

#### 【0479】

既存の抗第VII因子抗体に対する免疫寛容化

40

rFVIIIFcを与えられる患者が、異なるrFVII治療を以前に受けていたことは大いにあり得る。約30%の血友病A患者はFVIIに対する抗体を発生させ、これは現在のFVII補充療法においては重大な問題である。現在、FVII阻害物質を有する患者を寛容化するための唯一の承認された手法は、高用量のFVIIを、不定の期間、すなわち患者が寛容化されるまで、患者らに投与することである。従って、低用量rFVIIIFcが、T細胞およびB細胞のシグナル経路を阻害し寛容へと傾斜させることによって、FVIIの免疫原性を逆転させることができるかどうかを決定することは重要である。

#### 【0480】

本試験において、hemAマウス(8~10週齢)が、50IU/kgのBDD-FV

50

I I I ( X Y N T H A ( 登 録 商 標 ) ) または f l - F V I I I ( A D V A T E ( 登 録 商 標 ) ) を、週 1 回、5 週 間 注 射 さ れ る。スキームに示される特定の日にこれらの動物から採取した血液試料中の抗 F V I I I 抗体のレベルが決定される。抑制抗体の誘導の後、動物は、週 1 回、5 週 間 の 5 0 I U / k g の r F V I I I F c の 注 射 に 切 り 替 え ら れ る。これが寛容化段階となる。抗 F V I I I 抗体のレベルが、表示の通りに採取された血液試料から再度決定される。寛容化段階の後、動物は、5 0 I U / k g の X Y N T H A ( 登 録 商 標 ) または A D V A T E ( 登 録 商 標 ) を、別の 4 回 の 注 射 の た め に、再度注射され、採取された血液試料は抗 F V I I I 抗体の有無について検査される。寛容化が成功した場合、X Y N T H A ( 登 録 商 標 ) または A D V A T E ( 登 録 商 標 ) で の 二 次 暴 露 は、い かな る 抗 F V I I I 抗体も生じさせないはずであり、これは、F V I I I に対する免疫寛容を誘導する r F V I I I F c の 能 力 を 示 す も の で あ り 得 る。

10

[ 実 施 例 1 8 ]

【 0 4 8 1 】

T 細胞養子免疫療法および免疫寛容の導入

調節性 T 細胞 ( T r e g s ) は、F V I I I および他のペプチド治療薬に対する末梢性寛容の誘導および維持における主要因子である。機能的免疫寛容の有無を決定する際に用いられる重要な試験の 1 つは、寛容化動物から単離した T r e g 細胞をレシピエントに移植し、その後より高用量の F V I I I に暴露することによるものである。機能的な寛容移植の有無は、暴露されたレシピエントマウスにおける抗体産生の欠如または減少によって証明される。

20

【 0 4 8 2 】

本試験では、h e m A マウス ( 8 ~ 1 0 週 齢 ) に、5 0 I U / k g の r F V I I I F c またはピヒクルを毎週、4 週 間 ( 0 、 7 、 1 4 、 2 1 日 目 ) 注 射 し、その後 3 5 日 目 および 5 3 日 目 に 2 回 の 注 射 を 行 う こ と に よ り、寛容化される。血漿試料が、E L I S A を用いた抗 F V I I I 抗体レベルの決定のために採取される。5 6 日 目 に、抗体を有さないマウスが安楽死させられ、それらの脾臓が単離される。これらのマウスから脾細胞が採取され、脾細胞単離キット ( ミルテニーバイオテク社 ) を用いて単一細胞懸濁液にされる。T r e g s が、C D 4 C D 2 5 マウス T r e g 磁気ビーズ系単離キット ( ミルテニーバイオテク社 ) を用いて、全脾細胞から単離される。単離された T r e g s が細胞カウンターを用いて計数される。細胞懸濁液の一定分量が、単離物の純度を決定するための F A C S による表現型分析用に、3 % ホルマリンを用いて固定される。次に、T r e g s はレシピエントマウスに、2 0 0 μ L の食塩水中  $1 \times 1 0 ^ 6$  細胞 / マウスで、0 日 目 に I V 注 射 さ れ る。

30

【 0 4 8 3 】

1 日 目 に 開 始 し て、動物は 2 5 0 I U / k g の r F V I I I F c に暴露され、8、1 5、2 2、および 2 9 日 目 に 週 1 回 の 頻 回 注 射 を 受 け る。血液試料が、E L I S A を用いる血漿中抗 F V I I I 抗体解析用に、1 5、2 2、2 9 および 3 6 日 目 に 採 取 さ れ る。寛容の導入が成功した場合、r F V I I I F c 寛容化動物由来の T r e g を与えられたマウスは F V I I I に対する抗体を発生させないが、ピヒクル注射されたドナーマウスから単離された T r e g を注射されたマウスは抗 F V I I I 抗体の存在を示す。

40

[ 実 施 例 1 9 ]

【 0 4 8 4 】

r F V I I I F c による免疫寛容誘導の機構の特定：樹状細胞およびマクロファージを用いた試験

r F V I I I F c を他の F V I I I 製剤から区別する重要な特徴の 1 つは、自然発生的な成分である F c 部分の存在である。これは、免疫応答を抑制し免疫寛容応答を駆動する 1 つの原因因子となり得る。I g G および r F V I I I F c 内に存在する F c 分子は、古典的な I g G F c 受容体および F c R n と相互作用することができる。F c 受容体の中で、サブタイプの F c R I I b ( F c R 2 b ) は抑制性受容体であり、その受容体を有する細胞型の活性化を抑える抑制シグナルを送達する。F c R n を含む F c 受容体は、

50

抗原提示細胞（APC - 樹状細胞、マクロファージおよびB細胞）に主に局在化するが、T細胞には局在化しない。従って、rFVIIIFcがこれらの細胞内のFcR2bおよび/またはFcRnと結合して、免疫寛容誘発性表現型へと傾斜させ得る可能性がある。

【0485】

rFVIIIFcが樹状細胞およびマクロファージ内のFcR2bおよび/またはFcRnと結合して免疫寛容誘発性表現型を発生させるかどうかを確かめるために、以下の実験を行う：

1. Fc受容体と相互作用しないFVII単独またはFVIIIFc変異体（N297A）との比較における、rFVIIIFcによって制御される、マウスマクロファージ細胞株、脾臓マクロファージおよび脾臓樹状細胞内のmRNAレベルおよび細胞表面レベルにおける、マーカー（タンパク質）の特定。

2. RAW264.7マウスマクロファージ細胞株におけるFcγR2bまたはFcRnの過剰発現およびノックダウン、並びに下流標的を試験することによる、これらの受容体に対するrFVIIIFcの影響の調査。

3. rFVIIIFcに対するAPC応答における、TLR仲介性シグナル伝達等の重要な他の経路の関与の可能性の確認。

[実施例20]

【0486】

寛容誘導のための代替経路

rFVIIIFcに対する免疫寛容は粘膜経路を介して達成され得る。寛容誘導が可能な2つの部位は胃腸粘膜および呼吸粘膜である。rFVIIIFcに対する経口免疫寛容は、動物に餌として与えてまたは強制経口投与を用いて、該分子を腸管粘膜に送達することにより、誘導することができる。腸粘膜は、調節性免疫応答において重要な抗原提示細胞（APC）を含有する特殊な二次リンパ器官、すなわちパイエル板を有する。これらのAPCは、抗原を処理し、身体の他の部位に移動して抗原（この場合は外から供給されたFVII）存在下での免疫応答を抑制するように他の免疫系細胞をプログラムすることができる特殊な樹状細胞サブセットおよびTregサブセットを活性化することができる。この現象は、腸粘膜免疫系のAPC上に存在するFcRnおよび/またはFcγR2bとのFcの相互作用によって仲介され得る。呼吸粘膜は、腸に対して同じ機構に基づいて作動し得る、rFVIIIFcのエアロゾルの吸入によって寛容化することができる。

【0487】

免疫寛容が粘膜経路を介して達成できるかどうかを確かめるため、XYNTHA（登録商標）またはADVATE（登録商標）が経口的に、またはエアロゾルを介してhemAマウスに投与される。抑制抗体の誘導後、動物はrFVIIIFcに切り替えられる。これが寛容化段階となる。抗FVII抗体のレベルは表示の通りに採取された血液試料から決定される。寛容化段階の後、動物はXYNTHA（登録商標）またはADVATE（登録商標）を再度注射され、採取された血液試料が抗FVII抗体の有無について検査される。寛容化が成功した場合、XYNTHA（登録商標）またはADVATE（登録商標）での二次暴露は、いかなる抗FVII抗体も生じさせないはずであり、これは、粘膜投与後にFVIIに対する免疫寛容を誘導するrFVIIIFcの能力を示すものであり得る。

[実施例21]

【0488】

他の凝固因子に対する免疫寛容

FVII以外の凝固因子ペイロード（payload）に対するFcによって免疫寛容が与えられるかどうかを確かめるために、Fcに融合したFVIIa凝固因子（rFVIIaFc）、またはFcに融合したFIX凝固因子（rFIXFc）を含むキメラポリペプチドが作製される。rFVIIaFcおよびrFIXFcの凝固、発現、および精製は、当該技術分野において公知の方法に従って行われる。rFVIIaFcおよびrFIXFcの生化学的、生物物理学的および薬物動態学的な特徴付けが、上記実施例に開示された通

10

20

30

40

50

りに、および/または、当該技術分野において公知の方法を用いて行われる。市販の凝固因子と比較した r F V I I a F c および r F I X F c に対する抗体応答の評価、並びに免疫寛容研究が、上記の実施例に開示された通りに行われる。凝固因子ペイロード (payload) および r F I X F c または F V I I a F c 等の F c 部分を含むキメラポリペプチドは、未修飾凝固因子 (すなわち、F c 部分を有さない F I X または F V I I) に対する免疫寛容を効率的に誘導することができる

[ 実施例 2 2 ]

【 0 4 8 9 】

r F V I I I F c を用いる、F V I I I に対する免疫寛容の経胎盤移行

本研究の目的は、妊娠中マウスへの r F V I I I F c の投与が、胎盤を介して ( F c 部分の、胎盤細胞上の F c R n 受容体との相互作用により) 胎児に該分子を移行させることができるかどうか、並びに、初期段階での r F V I I I F c への胎児免疫系の暴露が寛容をもたらすかどうかを、F V I I I を自己抗原として認識させてそれに対する免疫反応を発生させないように胸腺をプログラムすることによって、決定することであった。

【 0 4 9 0 】

妊娠中マウスに、r F V I I I F c もしくは X Y N T H A (登録商標) の 1 回用量 ( 6 U ) を妊娠の 1 6 日目に眼窩後注射により静脈内に、または 2 回用量 (それぞれ 6 U) を妊娠の 1 5 日目および 1 7 日目に尾静脈注射により、注入した。X Y N T H A (登録商標) の免疫原性を、免疫化した母親から生まれた子において、子が成熟 ( 6 ~ 9 週齢) に達した後に、評価した。自己反応性 T 細胞を胸腺から除去する際に重要な役割を担う自己免疫調節分子の A I R E の発生と一致していたため、妊娠 1 6 日目を選択した。結果は、妊娠 1 6 日目における r F V I I I F c または X Y N T H A (登録商標) の単回注入による妊娠中マウスの投与を試験した第一の実験において、r F V I I I F c 処置妊娠中マウスから生まれた子は、X Y N T H A (登録商標) 処置妊娠中マウスから生まれた子と比較して、統計的に有意により低い、X Y N T H A (登録商標) に対するベテスダ力価を有した ( 図 6 2 ) ことを示した。妊娠 1 5 日目および 1 7 日目に妊娠中マウスの投与を試験した第二の実験において、r F V I I I F c 処置妊娠中マウスから生まれた子は、対照母親から生まれた子と比較して統計的に有意により低い、X Y N T H A (登録商標) に対するベテスダ力価、並びに X Y N T H A (登録商標) で処置された母親から生まれた子と比較してより低い力価の傾向を有した ( 図 6 3 ) 。

【 0 4 9 1 】

母体循環から胎児循環へのタンパク質 ( r F V I I I F c ) の経胎盤移行は、免疫化マウスから生まれた子における F V I I I 活性を検出することにより評価される。T 細胞レベルでの作用は、T 細胞プロファイリングおよび r F V I I I F c 寛容化された子からの T r e g 移植試験によって評価される。

[ 実施例 2 3 ]

【 0 4 9 2 】

r F V I I I F c は抗原提示細胞において免疫寛容誘発性マーカーを調節する

材料および方法

マウス: 1 2 9 x B 6 バックグラウンド上に F V I I I エクソン 1 6 ノックアウトを有する血友病 A ( H e m A ) マウス ( C 5 7 B L / 6 ) ( Bi, L., Lawler, A.M., Antonarakis, S.E., High, K.A., Gearhart, J.D., and Kazazian, H.H., Jr. 1995. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. Nat Genet 10:119-121) を、H. K a z a z i a n (ペンシルバニア大学、米国ペンシルバニア州フィラデルフィア) から入手して、バイオジェン・アイデック・ヘモフィリアまたはチャールスリバー研究所またはジャクソン研究所で繁殖コロニーとして維持した。使用された全ての動物手順は施設内動物管理使用委員会 ( I A C U C ) によって承認され、実験動物の飼育および使用の指針 ( Guide to the Care and Use of Laboratory Animals ) からガイドラインに基づいて行われた。

【 0 4 9 3 】

10

20

30

40

50

## 抗体および試薬

染色およびフローサイトメトリーに用いられた抗体は、BDバイオサイエンス社（米国ニュージャージー州フランクリン・レイクス）またはイーバイオサイエンス社（eBioscience）（米国カリフォルニア州サンディエゴ）から入手した。使用した抗体は、CD4およびPD-1（Tヘルパー細胞）、CD11c、CD80、およびPD-L1（樹状細胞）、並びにCD25（Treg細胞）等のマウス表面マーカー、細胞内サイトカイン（IL-2、IL-4、TNF- $\alpha$ ）、並びに転写因子（Foxp3）に対するものである。サイトカインおよび転写因子に対する細胞内染色用試薬は、BDバイオサイエンス社から購入した。組換えBドメイン欠失FVIIIFc（rFVIIIFc）および組換えBドメイン欠失FVII（rFVII）は、Peters et al. (Peters, R.T., Toby, G., Lu, Q., Liu, T., Kulman, J.D., Low, S.C., Bitonti, A.J., and Pierce, G.F. 2012. Biochemical and functional characterization of a recombinant monomeric Factor VIII-Fc fusion protein. J. Thromb Haemost. DOI: 10.1111/jth.12076) にある通りに合成した。

## 【0494】

他の第VII因子医薬原体、すなわちrBDD FVII XYNTHA（登録商標）（ワイス・ファーマシューティカルズ社、米国ペンシルバニア州フィラデルフィア）、および完全長FVII ADVATE（登録商標）（バクスター・ヘルスケア・コーポレーション社（Baxter Healthcare Corporation）、米国カリフォルニア州ウェストレイクビレッジ）は購入し、製造業者のガイドラインに従って再構成した。

## 【0495】

## マウスにおける免疫/寛容誘導

8～10週齢雄HemAマウスから成る3つの処置群に、50、100、または250 IU/kgの静脈内投与を与え、投与は0、7、14、21、35、および53日目に行われた。それぞれの処置および服用レベルを10匹のマウスに投与した。血液試料を0日目（出血前）、14、21、28、および42日目に眼窩後出血によって採取し、血漿を分離し、ELISAを用いて抗FVII抗体レベルを決定するために用いた。動物に53日目にもう一度注射し、56日目にCO<sub>2</sub>吸入により安楽死させ、脾臓を無菌PBS中に切除した。脾細胞をマウス脾臓分離キットおよびgentle MACS分離器（ミリテニーバイオテック社、ドイツ、コロニー）を用いて分離した。脾細胞の単一細胞懸濁液を、FACS染色用に3%ホルマリン（ボストン・バイオプロダクツ社（Boston BioProducts））中で固定するか、またはRNA単離用の解離緩衝液（ロシュ・アプライド・サイエンス社、インディアナ州インディアナポリス）中に保存した。免疫寛容を調べる研究のために、マウスに0、7、14、21、および35日目に50 IU/kgを最初に注射した。42日目にFVIIに対する抗体が存在しないことを確認した後、これらのマウスに、250 IU/kgのrFVIIIFcを週1回；すなわち、49、56、63、および70日目（再暴露の0、7、14、および21日目）に投与した。再暴露した動物を、14、21、および28日目に採取された出血時の抗FVII抗体レベルについて試験した。

## 【0496】

## 抗FVII抗体のELISA

従ったプロトコールはバイオジェン・アイデック・ヘモフィリアで社内設計された。アッセイの前に、全ての血漿試料を水浴中で56℃に温めて、処置により導入された残存凝固因子およびプレート上にコートされた標準物質を分解し得る抗凝固酵素を不活化した。1日目に、96ウェル、高結合能マイクロタイタープレート（ThermoImmulon 2HB）を、0.05 M炭酸ナトリウム（pH 9.6）中の1  $\mu$ g/ml（100  $\mu$ l/ウェル）のBドメイン欠失FVIIでコートし、4℃で一晩（12～18時間）インキュベートした。次の日、上清を除去し、プレートをPBST（0.05% Tween 20含有リン酸緩衝食塩水）で4回洗浄した。次にプレートを、200  $\mu$ l/ウェルの10%熱不活化ウマ血清含有PBST（pH 7.4）で、室温で60分間ブロッキングした。マウスIgGに

10

20

30

40

50

用いられる標準物質は、等量のGMA8002(A1)、GMA8008(C2)、GMA8011(C1)、GMA8015(A2)、GMA8016(A2)、GMA8005(A1/A3)を混合することにより調製された抗FVIIIMonoclonal抗体のポリクローナルプールであった。モノクローナル抗体は全て、グリーン・マウンテン・アンチボディズ社(バーモント州バーリントン)製であり、括弧内に示されるFVIIIDメインエピトープを有した。マウス血漿試験試料をブロッキング緩衝液中で希釈し、同濃度の加熱血漿を標準物質として含有した。次に、ブロッキング緩衝液を除去し、希釈した標準物質および試料を100 $\mu$ l/ウェル、2連で加えた。プレートを、オービタルシェーカー上で振盪させながら、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。PBSTで4回洗浄した後、100 $\mu$ l/ウェルの、ブロッキング緩衝液中で1:20000希釈したヤギ抗マウスIgG-HRPを加え、オービタルシェーカー上で振盪させながら37 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートした。プレートをPBSTで再度4回洗浄した後、100 $\mu$ l/ウェルのTMBを加え、室温で5~10分間インキュベートした。結果はプレートリーダーを用いてOD650で読み出した。

10

#### 【0497】

中和抗体の力価を決定するためのベテスダアッセイ

このアッセイにより、所与の血漿試料中の抗FVIIIMonoclonal抗体の力価が決定された。簡潔に述べると、前記アッセイは、血漿試料を既知濃度の組換えFVIIIMonoclonalと混合し、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートすることにより行われた。次に、混合物中の残存FVIIIMonoclonal活性を、第IXa因子、第X因子、リン脂質およびCaCl<sub>2</sub>の存在下、Coatest FVIIIMonoclonal SPキットを用いて検査した。FVIIIMonoclonalの活性を、あらゆる阻害物質の非存在下でrFVIIIMonoclonalを用いてプロットされたFVIIIMonoclonal活性の検量線を使用して、算出した。

20

#### 【0498】

FACS染色

T細胞および樹状細胞の応答プロファイリングを、単離マウス脾細胞に対して行った。脾臓リンパ細胞および樹状細胞を表面標的および細胞内標的に対して染色した。表面染色において、1 $\times$ 10<sup>6</sup>の全脾細胞を適切な濃度の抗体と一緒にインキュベートした。細胞内染色のために、細胞をBD Fix-Perm溶液(BDバイオサイエンス社)で透過処理した後、同一緩衝液中のサイトカインに対する抗体と一緒にインキュベートした。Foxp3染色を、Foxp3染色緩衝液(BDバイオサイエンス社)中の抗体を用いて行った。BD FACS Canto IIを用いて蛍光強度を記録し、FLOWJOソフトウェアを用いて解析した。リンパ球を、CD4および細胞内マーカーのIL-2、TNF- $\alpha$ 、およびIL-4で共染色した。調節性T細胞(Treg)を、表面マーカーのCD4およびCD25に対して染色した後、細胞内Foxp3に対して染色した。脾細胞をCD11cおよびPD-L1(樹状細胞)またはCD4およびPD-1(CD4+T細胞)に対して染色して、PD-L1-PD-1経路に關与する細胞を特定した。

30

#### 【0499】

リアルタイムPCRおよびリアルタイムPCRに基づくアレイ解析

全RNAを、RNA単離キット(ロシュ・アプライド・サイエンス社、インディアナ州インディアナポリス)を用いて単離し、cDNAに逆転写した(キアゲン社、ドイツ、ヒルデン)。試験遺伝子に対するリアルタイムPCRプライマーを、インテグレートッド・DNA・テクノロジー社(IDT technologies)のウェブサイト(www.idtdna.com)上で利用可能なオンラインアルゴリズムを用いて設計し、インテグレートッド・DNA・テクノロジー社(アイオワ州コーラルビル)から購入した。SYBR greenに基づくリアルタイムPCRを、ABI 7900 Fast BlockリアルタイムPCR装置(アプライドバイオシステムズ社、フォスターシティ、カリフォルニア州)においてQuantitect系(キアゲン社、ドイツ、ヒルデン)を用いて行った。リアルタイムPCRに基づくアレイについて、500ngの全cDNAをSYBR greenに基づくqPCRマスターミックスと混合し、96ウェルプレートアレイ上に分注した

40

50

(PAMM047Z、T細胞アネルギーおよび免疫寛容PCRアレイ(T-cellAnergy and Immune Tolerance PCR Array) ; SAバイオサイエンス社(SA Biosciences)、米国メリーランド州フレデリック)。ABI 7900 Fast BlockリアルタイムPCR装置(アプライドバイオシステムズ社、カリフォルニア州フォスターシティ)を用いて反応を実行した。7500ソフトウェア(バージョン2.0.5)を用いて結果を解析し、遺伝子転写物の相対レベルを、内在性ハウスキーピング遺伝子を対照として用い、2 - Ct相対定量法(2 - Ctrelative quantification method)(Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T))Method. Methods 25:402-408)を用いて測定した。正規化に使用したハウスキーピング遺伝子は、GAPDH、HPRT、Hsp90ab、 $\beta$ -アクチン、およびGusBであった。各試料において、ハウスキーピング遺伝子の平均Ct値をまとめて、Ctの算出に使用した。35を超える閾値までのサイクル数(thresholdcycle: Ct)を示したmRNAは解析から除外した。

10

#### 【0500】

T細胞増殖およびインターフェロン- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )レベルの決定

HemAマウス(8~10週齢)にFVIIII医薬原体を週1回、2週間注射した。2回目の注射の72時間後、マウスを安楽死させ、無菌PBSを用いる洗浄により腹腔マクロファージを採取した。脾臓T細胞を、磁気ビーズに基づくマウスCD4+T細胞単離キット(ミルテニ-バイオテック社、ドイツ)を用いて単離した。T細胞を、10 $\mu$ M CFSE(インビトロジェン社、カリフォルニア州カールズバッド)を用いて15分間、温めたPBS中で標識し、96ウェル超低接着プレート(コーニング社)に、1ウェルあたり1 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞/mlの密度の腹腔マクロファージと一緒に播種した。次に、細胞を、共起刺激抗体、すなわち抗CD28および抗CD49d(BDバイオサイエンス社)を含有するX-VIVO 15培地(ロンザ社)中0.1、1および10nMのrFVIIIIまたはビヒクルまたはCD3/CD28マイクロビーズ(ポジティブコントロール;ミルテニ-バイオテック社)と一緒に、37 $^{\circ}$ Cで96時間インキュベートした。インキュベーションの終わりに、培養上清中のIFN- $\gamma$ レベルを、メソスケールデバイス社(MesoScale Devices: MSD)製ELISAキットを用いて測定した。T細胞増殖を、FACS(BD FACS CANTO II)を用いて、前方散乱光および側方散乱光に基づいてゲーティングしたT細胞におけるCFSE蛍光強度(MFI)を測定することにより、決定した。

20

30

#### 【0501】

統計解析

結果の統計解析を、独立スチューデントt検定またはマンホイットニーのT検定を用いて行った。0.05未満のP値を有意と見なした。

#### 【0502】

結果

樹状細胞はプロフェッショナル抗原提示細胞であり、免疫応答を寛容に傾斜させる際に中枢となる重要な分子および酵素を有する。FVIIII医薬原体またはビヒクルを注射されたhemAマウスから得られた脾細胞を、CD11cおよびMHCクラスII分子に対して染色して、樹状細胞をゲーティングした。より多くの抗原提示を示す成熟樹状細胞において上方制御されている表面マーカーであるCD80、およびPD-1受容体に対するリガンドであるCD274(PD-L1)等のマーカーを発現している樹状細胞の脾臓成分を、これらの分子に対する特異的抗体を用いて共染色することにより、特定した。図63Aに示す通り、100IU/kgのrFVIIIIFcまたはBDD-FVIIIIを注射されたHemAマウス由来の脾細胞は、CD80を発現している樹状細胞の割合(%)において有意な減少を示し、このことは、未成熟樹状細胞が大量に存在することを示唆している。

40

#### 【0503】

f1-FVIIIIを与えられたマウスはビヒクルと比較してCD80+樹状細胞の割合

50

における減少を示したが、統計的有意性は達成されなかった（図64A）。50 IU/kg用量のrFV I I I F cを与えられているマウスについても同様の傾向であった。250 IU/kgでは、3種の処置のいずれも、脾細胞中のCD80+樹状細胞の割合における変化を示さなかった。

#### 【0504】

CD274 (PD-L1)を発現している脾臓樹状細胞のFACS解析からの結果により、100 IU/kgのrFV I I I F cが、ビヒクル処置および他のFV I I I 処置と比較してこれらの細胞の割合を増強させたことが明らかにされた（図64B）。この分子は、リアルタイムPCR分析によって示された通り、rFV I I I F cによってmRNAレベルでの制御も受けた（図64C）。このことは、rFV I I I F cが重要な免疫抑制経路の1つであるPD-L1:PD-1経路を調節することによって、FV I I Iの免疫原性を低減させることを示している。CD274に加えて、rFV I I I F cは、トリプトファン代謝に影響を与えることによりT細胞の増殖および活性化を制御する重要な酵素であるインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO)のmRNAレベルも上方制御した（図64D）。

10

#### [実施例24]

#### 【0505】

低用量のrFV I I I F cは、脾細胞における免疫寛容およびアレルギーのマーカーの発現を増強する

実験手順を実施例23に記載の材料および方法に従って実行した。

20

#### 【0506】

rFV I I I F cによって誘導される免疫寛容のマーカーを特定するために、免疫寛容およびアレルギーに特異的な遺伝子に焦点を当てたリアルタイムPCRに基づくアレイ (SAバイオサイエンス社)を使用した。50および250 IU/kgのrFV I I I F cおよびビヒクルを注射されたマウスから得られた脾細胞から単離されたmRNAを用いて、この医薬原体により活性化される新規の応答エレメントを特定した。

#### 【0507】

候補物質を、それらの発現レベル（ビヒクルよりも2倍高いまたは低い）、およびチューデントt検定に基づくp値 (< 0.05)に基づいて特定した。各遺伝子の相対発現を、一連の5つのハウスキーピング遺伝子の平均Ct値に対して正規化した後、2<sup>-Ct</sup>法 (Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25:402-408)を用いて決定した（実施例23、材料および方法を参照）。

30

#### 【0508】

これらの基準に基づき、実行されたアレイ解析によって、ビヒクルおよび250 IU/kgを注射されたマウスとの比較において、脾細胞レベルで50 IU/kgのrFV I I I F cによって優先的に制御された候補物質が明らかにされた（図65および図66）。これらには、Foxp3、CTLA-4、およびCD25等の寛容特異的遺伝子；Egr2、Dgka、およびCBL-B等のアレルギー関連遺伝子；腫瘍壊死因子スーパーファミリー (Tumor Necrosis Factor Superfamily: TNFSF)に属する遺伝子；プロスタグランジンシンターゼ2 (PTGS2)およびプロスタグランジンE2受容体 (PTGER2)の統計的に有意な発現上昇が含まれる（図66参照）。逆に、このアレイを用いて特定された下方制御されたいくつかの遺伝子は、CCL3およびSTAT3等の公知の炎症誘発性分子である（図66）。

40

#### 【0509】

これらの結果により、50 IU/kgのrFV I I I F cを与えられている動物の脾細胞内に、免疫寛容誘発性経路および免疫寛容誘発性微小環境の存在が示された。前記アレイを用いて決定された遺伝子発現プロファイルは、特定された候補物質に対する個々のプライマー対を使用するリアルタイムPCRを用いて妥当性を検査される。

#### [実施例25]

50

## 【0510】

250 IU/kg 群のマウスから得られた CD4 + 脾細胞は増殖し、高レベルの IFN - を産生する。

実験手順は実施例 23 に記載の材料および方法に従って実行した。

## 【0511】

T細胞増殖試験を行って、第 V I I I 因子特異的な T細胞応答をエキソピボで調べた。50 または 250 IU/kg の r F V I I I F c の週 1 回の注射を 2 回与えられたマウスマウスから単離された CD4 + T細胞を、C F S E で標識し、腹腔マクロファージ（抗原提示細胞；A P C）で再構成し、3つの濃度（0.1、1、および 10 nM）の Bドメイン欠失 r F V I I I の存在下でインキュベートした。

10

## 【0512】

C F S E 希釈シグナルに基づく増殖に関する F A C S 解析によって、250 IU/kg の r F V I I I F c で処置された群から得られた T細胞が、増殖において用量依存的な増加を示し、これが、10 nMにおいて統計的に有意であったことが明らかにされた（図 67）。並行して、50 IU/kg の r F V I I I F c で処置されたマウスから得られた T細胞は、漸増濃度の r F V I I I による、ビヒクルと比較した、増殖における有意な増加をエキソピボで示さなかった（図 67）。

## 【0513】

これらのインキュベーションの培養上清から測定された IFN レベルは、T細胞増殖パターン、すなわち、250 IU/kg の r F V I I I F c で処置されたマウス由来の T細胞からの分泌における用量依存的な増加（図 68 A）、それに対する、50 IU/kg の r F V I I I F c で処置されたマウス由来の T細胞から得られるレベルの無変化と一致する、同様のプロファイルを明らかにした（図 68 B）。

20

## 【0514】

F V I I I に対する免疫応答の抑制における r F V I I I F c の作用機序を分析するために、2種類の変異構築物（一方は F c 受容体に結合せず（r F V I I I F c - N 2 9 7 A と称する）、もう一方は F c R n 受容体への結合が欠如している（r F V I I I F c - I H H と称する））を使用した。これらの構築物を用いて、免疫抑制作用を引き起こす際のこれらの受容体の 1 つとの r F V I I I F c の相互作用を特定した。この目的を達成するために、250 IU/kg 用量（図 68 C）および 50 IU/kg 用量（図 68 D）の r F V I I I F c - N 2 9 7 A の週 1 回注射を 2 回受けたマウスに由来する T細胞の IFN 分泌プロファイルを試験した。

30

## 【0515】

250 IU/kg の r F V I I I F c および r F V I I I F c - N 2 9 7 A から得られた T細胞からの IFN 分泌の対照比較によって、サイトカインのレベルは、ビヒクルと比較して有意により高いレベルであるが、変異型を与えられている動物由来の T細胞において高度に低減されたことが明らかにされた。しかし、50 IU/kg 群の変異型タンパク質からの IFN のレベルは、50 IU/kg の r F V I I I F c のそれとの有意差を示さなかった。これにより、より高い用量の r F V I I I F c で観察されたより高度な抗体産生および T細胞増殖は、F c 非結合変異体によって無効にされる F c 受容体との F c の相互作用の結果であり得ることが示唆される。

40

## 【0516】

上記の特定の実施形態は本発明の一般的性質を十分に明らかにしているため、他の者は、必要以上の実験なしに、本発明の一般概念から逸脱することなく、当業者の技能の範囲内の知識を適用することによって、容易に改変することが可能であり、および/または特定の実施形態等の種々の応用に適合させることができる。従って、そのような適合および改変は、開示の実施形態の等価物の意味および範囲に含まれており、本明細書に示される教示および模範に基づくことが意図される。本明細書における語法または用語は説明を目的としたものであり、限定を目的としたものではなく、本明細書の専門用語または語法は、教示および模範に照らし合わせて当業者によって解釈されるものであることを理解され

50

たい。

表 1 : ポリヌクレオチド配列

A . Bドメイン欠失 F V I I I F c

( i ) Bドメイン欠失 F V I I I F c 鎖の DNA 配列 ( 下線は F V I I I シグナルペプチド、太字は F c 領域 ) ( 配列番号 2 をコードする配列番号 1 )

【化 1 - 1】

	A TGCAAATAGA GCTCTCCACC TGCTTCTTTC					
661						
721	<u>TGTGCCTTTT</u>	<u>GCGATTCTGC</u>	<u>TTTAGTGCCA</u>	CCAGAAGATA	CTACCTGGGT	GCAGTGGAAC
781	TGTCATGGGA	CTATATGCAA	AGTGATCTCG	GTGAGCTGCC	TGTGGACGCA	AGATTTCCTC
841	CTAGAGTGCC	AAAATCTTTT	CCATTCAACA	CCTCAGTCGT	GTACAAAAAG	ACTCTGTTTG
901	TAGAATFCAC	GGATCACCTT	TTCAACATCG	CTAAGCCAAG	GCCACCCTGG	ATGGGTCTGC
961	TAGGTCTTAC	CATCCAGGCT	GAGGTTTATG	ATACAGTGGT	CATTACACTT	AAGAACATGG
1021	CTTCCCATCC	TGTCAGTCTT	CATGCTGTTG	GTGTATCCTA	CTGGAAAGCT	TCTGAGGGAG
1081	CTGAATATGA	TGATCAGACC	AGTCAAAGGG	AGAAAGAAGA	TGATAAAGTC	TTCCCTGGTG
1141	GAAGCCATAC	ATATGTCTGG	CAGGTCTTGA	AAGAGAATGG	TCCAATGGCC	TCTGACCCAC
1201	TGTGCCTTAC	CTACTCATAT	CTTTCTCATG	TGGACCTGGT	AAAAGACTTG	AATTCAGGCC
1261	TCATTGGAGC	CCTACTAGTA	TGTAGAGAAG	GGAGTCTGGC	CAAGGAAAAG	ACACAGACCT
1321	TGCACAAATT	TATACTACTT	TTTGCTGTAT	TTGATGAAGG	GAAAAGTTGG	CACTCAGAAA
1381	CAAAGAACTC	CTTGATGCAG	GATAGGGATG	CTGCATCTGC	TCGGGCCTGG	CCTAAAAATGC
1441	ACACAGTCAA	GGTTATGTA	AACAGGTCTC	TGCCAGGTCT	GATTGGATGC	CACAGGAAAT
1501	CAGTCTATTG	GCATGTGATT	GGAAATGGGCA	CCACTCCTGA	AGTGCACCTA	ATATTCCTCG
1561	AAGGTACACAC	ATTTCTTGTG	AGGAACCATC	GCCAGGCGTC	CTTGGAAATC	TCGCCAATAA
1621	CTTTCCTTAC	TGCTCAAACA	CTCTTGATGG	ACCTTGGACA	GTTTCTACTG	TTTTTGCATA
1681	TCTCTTCCCA	CCAACATGAT	GGCATGGAAG	CTTATGTCAA	AGTAGACAGC	TGTCAGAGAG
1741	AACCCCAACT	ACGAATGAAA	AATAATGAAG	AAGCGGAAGA	CTATGATGAT	GATCTTACTG
1801	ATTCTGAAAT	GGATGTGGTC	AGGTTTGATG	ATGACAACCTC	TCCTTCCTTT	ATCCAAATTC
1861	GCTCAGTTGC	CAAGAAGCAT	CCTAAAACCTT	GGGTACATTA	CATTGCTGCT	GAAGAGGAGG
1921	ACTGGGACTA	TGCTCCCTTA	GTCCTCGCCC	CCGATGACAG	AAGTTATAAA	AGTCAATATT
1981	TGAACATGG	CCCTCAGCGG	ATTGGTAGGA	AGTACAAAAA	AGTCCGATTT	ATGGCATACA
2041	CAGATGAAAC	CTTTAAGACT	CGTGAAGCTA	TTCAGCATGA	ATCAGGAATC	TTGGGACCTT
2101	TACTTTATGG	GGAAGTTGGA	GACACACTGT	TGATTATATT	TAAGAAATCAA	GCAAGCAGAC
2161	CATATAACAT	CTACCCTCAC	GGAATCACTG	ATGTCCGTCC	TTTGTATTCA	AGGAGATTAC
2221	CAAAAGGTGT	AAAACATTTG	AAGGATTTTC	CAATTCTGCC	AGGAGAAATA	TTCAAATATA
2281	AATGGACAGT	GACTGTAGAA	GATGGGCCAA	CTAAATCAGA	TCCTCGGTGC	CTGACCCGCT
2341	ATTACTCTAG	TTTCGTAAAT	ATGGAGAGAG	ATCTAGCTTC	AGGACTCATT	GGCCCTCTCC
2401	TCATCTGCTA	CAAAGAATCT	GTAGATCAAA	GAGGAAACCA	GATAATGTCA	GACAAGAGGA
2461	ATGTCATCCT	GTTTCTGTGA	TTTGATGAGA	ACCGAAGCTG	GTACCTCACA	GAGAATATAC
2521	AACGCPTTCT	CCCCAATCCA	GCTGGAGTGC	AGCTTGAGGA	TCCAGAGTTC	CAAGCTCCCA
2581	ACATCATGCA	CAGCATCAAT	GGCTATGTTT	TTGATAGTTT	GCAGTTGTCA	GTTTGTTTGC
2641	ATGAGGTGGC	ATACTGGTAC	ATTCTAAGCA	TTGGAGCACA	GACTGACTTC	CTTCTGTCT
2701	TCTTCTCTGG	ATATACCTTC	AAACACAAAA	TGGTCTATGA	AGACACACTC	ACCTTATTCC
2761	CATTCTCAGG	AGAAACTGTC	TTCATGTCTG	TGGAAAACCC	AGGTCTATGG	ATTCTGGGGT
2821	GCCACAACCT	AGACTTTCGG	AACAGAGGCA	TGACCGCCTT	ACTGAAGGTT	TCTAGTTGTG
2881	ACAAGAACAC	TGGTATTAT	TACGAGGACA	GTTATGAAGA	TATTTACAGTA	TACTTGCTGA
2941	GTAAAAACAA	TGCCATTGAA	CCAAGAAGCT	TCTCTCAAAA	CCCACCAGTC	TTGAAAACGCC
3001	ATCAACGGGA	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATT	GACTATGATG
3061	ATACCATATC	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAAATC
3121	AGAGCCCCCG	CAGCTTTCAA	AAGAAAACAC	GACACTATTT	TATTGCTGCA	GTGGAGAGGC
3181	TCTGGGATTA	TGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA
3241	GTGTCCTTCA	GTTCAAGAAA	GTGTTTTTCC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC
3301	CCTTATAACG	TGGAGAACTA	AATGAACATT	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT	ATAAGAGCAG
3361	AAGTTGAAGA	TAATATCATG	GTAACCTTCA	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC	TATTCCTTCT
3421	ATTCTAGCCT	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	AGCAGAACCT	AGAAAAAACT
3481	TTGTCAAGCC	TAATGAAACC	AAAACCTACT	TTTGAAAAGT	GCAACATCAT	ATGGCACCCA
3541	CTAAAGATGA	GTTTGACTGC	AAAGCCTGGG	CTTATTTCTC	TGATGTTGAC	CTGGAAAAAG
3601	ATGTGCACTC	AGGCTGATT	GGACCCTTTC	TGGTCTGCCA	CACATAACACA	CTGAACCCCTG
3661	CTCATGGGAG	ACAAGTGACA	GTACAGGAAT	TTGCTCTGTT	TTTCACCATC	TTTGATGAGA
3721	CCAAAAGCTG	GTAATTCACT	GAAAATATGG	AAAGAAACTG	CAGGGCTCCC	TGCAATATCC
3781	AGATGGAAGA	TCCCACCTTT	AAAGAGAATT	ATCGCTTCCA	TGCAATCAAT	GGCTACATAA
3841	TGGATACACT	ACCTGGCTTA	GTAATGGCTC	AGGATCAAAG	GATTTCGATG	TATCTGCTCA
3901	GCATGGGCAG	CAATGAAAAC	ATCCATTCTA	TTCATTTTCAG	TGGACATGTG	TTCATGCTAC
3961	GAAAAAAGA	GGGTATAAAA	ATGGCATTGT	ACAATCTCTA	TCCAGGTGTT	TTTGAGACAG

10

20

30

40

## 【化 1 - 2】

4021 TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAATTT GGCGGGTGGG ATGCCTTATT GGCGAGCATC  
 4081 TACATGCTGG GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTCTAG ACTCCCCTGG  
 4141 GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT  
 4201 GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA CTTCAATTATT CCGGATCAAT CAATGCCCTGG AGCACCAAGG  
 4261 AGCCCTTTTC TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT GATTATTAC GGCATCAAGA  
 4321 CCCAGGGTGC CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA  
 4381 GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT  
 4441 TCTTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACCCCT CCAATTATTG  
 4501 CTCGATACAT CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCC CAGCACTCTT CGCATGGAGT  
 4561 TGATGGGCTG TGATTTAAAT AGTTCAGACA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT  
 4621 CAGATGCACA GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT  
 4681 CAAAAGCTCG ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC  
 4741 CAAAAGAGTG GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACCTACT  
 4801 AGGGAGTAAA ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC  
 4861 AAGATGGCCA TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGT TTTTCAGGGAA  
 4921 ATCAAGACTC CTTCCACACT GTGGTGAACCT CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGTACC  
 4981 TTCGAATCA CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT  
 5041 GCGAGGCACA GGACTCTAC **GACAAAACCT ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCAGAAC**  
 5101 **TCCTGGGCGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT**  
 5161 **CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCCTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA**  
 5221 **AGTTCAACTG GTACGTGGAC GCGTGGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG**  
 5281 **AGCAGTACAA CAGCAGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC**  
 5341 **TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGCTT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA**  
 5401 **AAACCATCTC GAGCCCAAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT**  
 5461 **CCCGGGATGA GCTGACCAAG AACCAAGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC**  
 5521 **CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA**  
 5581 **CGCCTCCCGT GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA**  
 5641 **AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGCTTCTT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA**  
 5701 **ACCCTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A**

10

20

( i i ) F c D N A 配列 ( 下線はマウス I g シグナルペプチド ) ( 配列番号 4 をコードする配列番号 3 )

## 【化 2】

7981 ATGGA GACAGACACA  
 8041 CTCCTGCTAT GGGTACTGCT GCTCTGGGTT CCAGGTTCCA CTGGTGACAA AACTCACACA  
 8101 TGCCACCGT GCCCAGCACC TGAATCCTG GGAGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCACCCCA  
 8161 AAACCCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC  
 8221 GTGAGCCACG AAGACCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT  
 8281 AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCCTGT GGTCAGCGTC  
 8341 CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGC AAAGTGC AA  
 8401 AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA  
 8461 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGC GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTCAGCCTG  
 8521 ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG  
 8581 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCAGCCT CCCGTGTTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC  
 8641 CTCTACAGCA AGCTACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC  
 8701 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG  
 8761 GGTAAA

30

## B . 完全長 F V I I I F c

( i ) 完全長 F V I I I F c の D N A 配列 ( 下線は F V I I I シグナルペプチド、太字は F c 領域 ) ( 配列番号 6 をコードする配列番号 5 )

40

## 【化 3 - 1】

661 ATG CAAATAGAGC TCTCCACCTG  
 721 CTTCTTTCTG TGCCTTTTGC GATTCTGCTT TAGTGCCACC AGAAGATACT ACCTGGGTGC  
 781 AGTGGAACTG TCATGGGACT ATATGCAAAG TGATCTCGGT GAGTGCCTG TGGACGCAAG  
 841 ATTTCTCTCT AGAGTGCCAA AATCTTTTCC ATTCAACACC TCAGTCTGTGT AAAAAAGAC  
 901 TCTGTTTGTG GAATTCACGG ATCACCTTTT CAACATCGCT AAGCCAAGGC CACCCTGGAT  
 961 GGGTCTGCTA GGTCTTACCA TCCAGGCTGA GGTATTATGAT ACAGTGGTCA TTACACTTAA  
 1021 GAACATGGCT TCCCATCCTG TCAGTCTTCA TGCTGTTGGT GTATCCTACT GGAAAGCTTC  
 1081 TGAGGGAGCT GAATATGATG ATCAGACCAG TCAAAGGGAG AAAGAAGATG ATAAAGTCTT  
 1141 CCCTGGTGGG AGCCATACAT ATGTCTGGCA GGTCTTGAAA GAGAATGGTC CAATGGCCTC

【化 3 - 2】

1201 TGACCCACTG TGCCTTACCT ACTCATATCT TTCTCATGTG GACCTGGTAA AAGACTTGAA  
1261 TTCAGGCCCTC ATTGGAGCCC TACTAGTATG TAGAGAAGGG AGTCTGGCCA AGGAAAAGAC  
1321 ACAGACCTTG CACAAATTTA TACTACTTTT TGCTGTATTT GATGAAGGGA AAAGTTGGCA  
1381 CTCAGAAACA AAGAACTCCT TGATGCAGGA TAGGGATGCT GCATCTGCTC GGGCCTGGCC  
1441 TAAAATGCAC ACAGTCAATG GTTATGTAAA CAGGTCTCTG CCAGGTCTGA TTGGATGCCA  
1501 CAGGAAATCA GTCTATTGGC ATGTGATTGG AATGGGCACC ACTCCTGAAG TGCACTCAAT  
1561 ATTCTCGAA GGTCACACAT TTCTTGTGAG GAACCATCGC CAGGCGTCCT TGGAAATCTC-  
1621 GCCAATAACT TTCCTTACTG CTCAAAACACT CTTGATGGAC CTTGGACAGT TTCTACTGTT  
1681 TTGTCATATC TCTTCCCACC AACATGATGG CATGGAAGCT TATGTCAAAG TAGACAGCTG  
1741 TCCAGAGGAA CCCCAACTAC GAATGAAAAA TAATGAAGAA GCGGAAGACT ATGATGATGA  
1801 TCTTACTGAT TCTGAAATGG ATGTGGTCCG GTTTGATGAT GACAACCTC CTTCCTTTAT  
1861 CCAAATTCGC TCAGTTGCCA AGAAGCATCC TAAAACCTGG GTACATTACA TTGCTGCTGA  
1921 AGAGGAGGAC TGGGACTATG CTCCTTAGT CTCGCCCC GATGACAGAA GTTATAAAAG  
1981 TCAATATTTG AACAAATGGCC CTCAGCGGAT TGGTAGGAAG TACAAAAAAG TCCGATTTAT  
2041 GGCATACACA GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAGCTATT CAGCATGAAT CAGGAATCTT  
2101 GGGACCTTTA CTTTATGGGG AAGTTGGAGA CACACTGTTG ATTATATTTA AGAATCAAGC  
2161 AAGCAGACCA TATAACATCT ACCCTCACGG AATCACTGAT GTCCGTCCTT TGTATTCAAG  
2221 GAGATTACCA AAAGGTGTAA AACATTTGCA GGATTTTCCA ATTCTGCCAG GAGAAATAT  
2281 CAAATATAAA TGGACAGTGA CTGTAGAAGA TGGGCCAACT AAATCAGATC CTCGGTGCCT  
2341 GACCCGCTAT TACTCTAGTT TCGTTAATAT GGAGAGAGAT CTAGCTTCAG GACTCATTGG  
2401 CCCTCTCCTC ATCTGCTACA AAGAATCTGT AGATCAAAGA GGAAACCAGA TAATGTCAGA  
2461 CAAGAGGAAT GTCATCTCTG TTTCTGTATT TGATGAGAAC CGAAGCTGGT ACCTCACAGA  
2521 GAATATAACA CGCTTTCTCC CCAATCCAGC TGGAGTGCAG CTTGAGGATC CAGAGTTCCA  
2581 AGCCTCCAAC ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTTTTT GATAGTTTGC AGTTGTGAGT  
2641 TTGTTTGCAT GAGGTGGCAT ACTGGTACAT TCTAAGCATT GGAGCACAGA CTGACTTCTT  
2701 TTCTGTCTTC TTCTCTGGAT ATACCTTCAA ACACAAAATG GTCTATGAAG ACACACTCAC  
2761 CCTATTCCCA TTCTCAGGAG AAAGTGTCTT CATGTGCGAT GAAAACCCAG GTCTATGGAT  
2821 TCTGGGGTGC CACAACCTAG ACTTTCGGAA CAGAGGCATG ACCGCCTTAC TGAAGGTTTC  
2881 TAGTTGTGAC AAGAACACTG GTGATTATTA CGAGGACAGT TATGAAGATA TTTCAGCATA  
2941 CTTGCTGAGT AAAACAATG CCATTGAACC AAGAAGCTTC TCCCAGAATT CAAGACACCC  
3001 TAGCACTAGG CAAAAGCAAT TTAATGCCAC CACAATTCCA GAAAATGACA TAGAGAAGAC  
3061 TGACCCCTGG TTTGCACACA GAACACCTAT GCCTAAAATA CAAAATGTCT CCTCTAGTGA  
3121 TTTGTTGATG CTCTTGCGAC AGAGTCTTAC TCCACATGGG CTATCCTTAT CTGATCTCCA  
3181 AGAAGCCAAA TATGAGACTT TTTCTGATGA TCCATCACCT GGAGCAATAG ACAGTAATAA  
3241 CAGCCGTGCT GAAATGACAC ACTTCAGGCC ACAGCTCCAT CACAGTGGGG ACATGGTATT  
3301 TACCCCTGAG TCAGGCCTCC AATTAAGATT AAATGAGAAA CTGGGGACAA CTGCAGCAAC  
3361 AGAGTTGAAG AAACCTGATT TCAAAGTTTC TAGTACATCA AATAATCTGA TTTCAACAAT  
3421 TCCATCAGAC AATTTGGCAG CAGGTACTGA TAATACAAGT TCCTTAGGAC CCCCAGTAT  
3481 GCCAGTTCAT TATGATAGTC AATTAGATAC CACTCTATTT GGCAAAAAGT CATCTCCCTT  
3541 TACTGAGTCT GGTGGACCTC TGAGCTTGAG TGAAGAAAAT AATGATTCAA AGTTGTTAGA  
3601 ATCAGGTTTA ATGAATAGCC AAGAAAGTTC ATGGGGAAAA AATGTATCGT CAACAGAGAG  
3661 TGGTAGGTTA TTTAAAGGGA AAGAGACTCA TGGACCTGCT TTGTTGACTA AAGATAATGC  
3721 CTTATTCAAA GTTAGCATCT CTTTGTTAAA GACAAAACAA ACTTCCAATA ATTCAGCAAC  
3781 TAATAGAAAAG ACTCACATTG ATGGCCCATC ATTATTAATT GAGAATAGTC CATCAGTCTG  
3841 GCAAAATATA TTAGAAAGTG AACTGAGTT TAAAAAAGTG ACACCTTTGA TTTCATGACAG  
3901 AATGCTTATG GACAAAAATG CTACAGCTTT GAGGCTAAAT CATATGTCAA ATAAACTAC  
3961 TTCATCAAAA AACATGGAAA TGGTCCAACA GAAAAAAGAG GGCCCCATC CACCAGATGC  
4021 ACAAATCCA GATATGTCGT TCTTTAAGAT GCTATTCTTG CCAGAATCAG CAAGGTGGAT  
4081 ACAAAGGACT CATGGAAAGA ACTCTCTGAA CTCTGGGCAA GGCCCCAGTC CAAAGCAATT  
4141 AGTATCCTTA GGACCAGAAA AATCTGTGGA AGGTGAGAAT TTCTTGTCTG AGAAAAACAA  
4201 AGTGGTAGTA GGAAAGGGTG AATTTACAAA GGACGTAGGA CTCAAAGAGA TGGTTTTTCC  
4261 AAGCAGCAGA AACCTATTTT TTAATAACTT GGATAATTTA CATGAAAATA ATACACACAA  
4321 TCAAGAAAAA AAAATTCAGG AAGAAATAGA AAAGAAGGAA ACATTAATCC AAGAGAATGT  
4381 AGTTTTGCCT CAGATACATA CAGTGACTGG CACTAAGAAT TTCATGAAGA ACCTTTTCTT  
4441 ACTGAGCACT AGGCAAAATG TAGAAGGTTT ATATGACGGG GCATATGCTC CAGTACTTCA  
4501 AGATTTTAGG TCATTAATG ATTCAACAAA TAGAACAAAG AAACACACAG CTCATTCTC  
4561 AAAAAAGGG GAGGAAGAAA ACTTGGAAAG CTTGGGAAAT CAAACCAAGC AAATGTGAGA  
4621 GAAATATGCA TGCACCACAA GGATATCTCC TAATACAAGC CAGCAGAATT TTGTCACGCA  
4681 ACGTAGTAAG AGAGCTTTGA AACAAATCAG ACTCCCACTA GAAGAAAACG AACTTGAAAA  
4741 AAGGATAATT GTGGATGACA CCTCAACCCA GTGGTCCAAA AACATGAAAC ATTTGACCCC  
4801 GAGCACCTC ACACAGATAG ACTACAATGA GAAGGAGAAA GGGGCCATTA CTCAGTCTCC  
4861 CTTATCAGAT TGCCTTACGA GGAGTCATAG CATCCCTCAA GCAAATAGAT CTCCATTACC  
4921 CATTGCAAAAG GTATCATCAT TTCCATCTAT TAGACCTATA TATCTGACCA GGGTCTTATT  
4981 CCAAGACAAC TCTTCTCATC TTCCAGCAGC ATCTTATAGA AAGAAAAGATT CTGGGTCCA  
5041 AGAAAGCAGT CATTCTTAC AAGGAGCCAA AAAAAATAAC CTTTCTTTAG CCATTCTAAC  
5101 CTTGGAGATG ACTGGTGATC AAAGAGAGGT TGGCTCCCTG GGGACAAGTG CCACAAATTC

10

20

30

40

【化 3 - 3】

5161	AGTCACATAC	AAGAAAGTTG	AGAACACTGT	TCTCCCGAAA	CCAGACTTGC	CCAAAACATC
5221	TGGCAAAGTT	GAATTGCTTC	CAAAAGTTCA	CATTTATCAG	AAGGACCTAT	TCCCTACGGA
5281	AACTAGCAAT	GGGTCTCCTG	GCCATCTGGA	TCTCGTGGAA	GGGAGCCTTC	TTCAGGGAAC
5341	AGAGGGAGCG	ATTAAGTGGA	ATGAAGCAAA	CAGACCTGGA	AAAGTTCCCT	TTCTGAGAGT
5401	AGCAACAGAA	AGCTCTGCAA	AGACTCCCTC	CAAGCTATTG	GATCCTCTTG	CTTGGGATAA
5461	CCACTATGGT	ACTCAGATAC	CAAAAAGAAG	GTGGAAATCC	CAAGAGAAGT	CACCAGAAAA
5521	AACAGCTTTT	AAGAAAAAGG	ATACCATTTT	GTCCTGAAC	GCTTGTGAAA	GCAATCATGC
5581	AATAGCAGCA	ATAAATGAGG	GACAAAATAA	GCCCGAAAATA	GAAGTCACCT	GGGCAAAGCA
5641	AGGTAGGACT	GAAAGGCTGT	GCTCTCAAAA	CCCACCAGTC	TTGAAACGCC	ATCAACGGGA
5701	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATT	GACTATGATG	ATACCATATC
5761	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAAATC	AGAGCCCCCG
5821	CAGCTTTCAA	AAGAAAAACG	GACACTATTT	TATTGCTGCA	GTGGAGAGGC	TCTGGGATTA
5881	TGGGATGAGT	ATGCTCCAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA	GTGTCCCTCA
5941	GTTCAAGAAA	GTTGTTTCC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC	CCTTATACCG
6001	TGGAGAACTA	AATGAACATT	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT	ATAAGAGCAG	AAGTTGAAGA
6061	TAATATCATG	GTAACTTCA	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC	TATTCCTTCT	ATTCTAGCCT
6121	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	AGCAGAACCT	AGAAAAAACT	TTGTCAAGCC
6181	TAATGAAACC	AAAACCTACT	TTTGGAAAGT	GCAACATCAT	ATGGCACCCA	CTAAAGATGA
6241	GTTTGACTGC	AAAGCTGGG	CTTATTTCTC	TGATGTTGAC	CTGGAAAAAG	ATGTGCATCT
6301	AGGCCTGATT	GGACCCCTTC	TGGTCTGCCA	CACTAACACA	CTGAACCCCTG	CTCATGGGAG
6361	ACAAGTGACA	GTACAGGAAT	TTGCTCTGTT	TTTCACCATC	TTTGATGAGA	CCAAAAGCTG
6421	GTAATTCACT	GAAAAATATG	AAAGAAACTG	CAGGGCTCCC	TGCAATATCC	AGATGGGAAG
6481	TCCCCTTTT	AAAGAGAATT	ATCGCTTCCA	TGCAATCAAT	GGCTACATAA	TGGATACACT
6541	ACCTGGCTTA	GTAATGGCTC	AGGATCAAAG	GATTCGATGG	TATCTGCTCA	GCATGGGCAG
6601	CAATGAAAAAC	ATCCATCTTA	TTCAATTCAG	TGGACATGTG	TTCACTGTAC	GAAAAAAGA
6661	GGAGTATAAA	ATGGCACTGT	ACAATCTCTA	TCCAGGTGTT	TTTGAGACAG	TGGAATGTT
6721	ACCATCCAAA	GCTGGAATTT	GCGGGTGGGA	ATGCCTTATT	GGCGAGCATC	TACATGCTGG
6781	GATGAGCACA	CTTTTCTGG	TGTACAGCAA	TAAGTGTGAG	ACTCCCCTGG	GAATGGCTTC
6841	TGGACACATT	AGAGATTTTC	AGATTACAGC	TTCAGGACAA	TATGGACAGT	GGGCCCCAAA
6901	GCTGGCCAGA	CTTCATTATT	CCGGATCAAT	CAATGCCTGG	AGCACCAGG	AGCCCTTTTC
6961	TTGGATCAAG	GTGGATCTGT	TGGCAACAAT	GATTATTCAC	GGCATCAAGA	CCCAGGTTGC
7021	CCGTCAGAAG	TTCTCCAGCC	TCTACATCTC	TCAGTTTATC	ATCATGTATA	GTCTTGATGG
7081	GAAGAAGTGG	CAGACTTATC	GAGGAAATTC	CACTGGAACC	TTAATGGTCT	TCTTTGGCAA
7141	TGTGGATTCA	TCTGGGATAA	AACACAATAT	TTTAAACCCCT	CCAATTATTG	CTCGATACAT
7201	CCGTTTGCAC	CCAATCATT	ATAGCATTTCG	CAGCACTCTT	CGCATGGAGT	TGATGGGCTG
7261	TGATTTAAAT	AGTTGCAGCA	TGCCATTGGG	AATGGAGAGT	AAAGCAATAT	CAGATGCACA
7321	GATTACTGCT	TCATCTACT	TTACCAATAT	GTTTGCCACC	TGGTCTCCTT	CAAAAGCTCG
7381	ACTTCACCTC	CAAGGGAGGA	GTAATGCCTG	GAGACCTCAG	GTGAATAATC	CAAAAGAGTG
7441	GCTGCAAGTG	GACTTCCAGA	AGACAATGAA	AGTCACAGGA	GTAACACTC	AGGGAGTAAA
7501	ATCTCTGCTT	ACCAGCATGT	ATGTGAAGGA	GTCTCTCATC	TCCAGCAGTC	AAGATGGCCA
7561	TCAGTGGAAT	CTCTTTTTTC	AGAATGGCAA	AGTAAAGGTT	TTTCAGGGAA	ATCAAGACTC
7621	CTTCACACT	GTGGTGAAT	CTCTAGACCC	ACCGTTACTG	ACTCGTACC	TTCGAATTCA
7681	CCCCCAGAGT	TGGGTGCACC	AGATTGCCCT	GAGGATGGAG	GTTCTGGGCT	GCGAGGCACA
7741	GGACCTCTAC	<b>GACAAAACCTC</b>	<b>ACACATGCCC</b>	<b>ACCGTGCCCA</b>	<b>GCTCCAGAAC</b>	<b>TCCTGGGCGG</b>
7801	<b>ACCGTCAGTC</b>	<b>TTCTCTTCC</b>	<b>CCCCAAAACC</b>	<b>CAAGGACACC</b>	<b>CTCATGATCT</b>	<b>CCCGGACCCC</b>
7861	<b>TGAGGTCACA</b>	<b>TGCGTGGTGG</b>	<b>TGGACGTGAG</b>	<b>CCACGAAGAC</b>	<b>CCTGAGGTCA</b>	<b>AGTTCAACTG</b>
7921	<b>GTACGTGGAC</b>	<b>GGCGTGGAGG</b>	<b>TGCATAATGC</b>	<b>CAAGACAAAG</b>	<b>CCGCGGGAGG</b>	<b>AGCAGTACAA</b>
7981	<b>CAGCACGTAC</b>	<b>CGTGTGGTCA</b>	<b>GCGTCTCAC</b>	<b>CGTCTGCAC</b>	<b>CAGGACTGGC</b>	<b>TGAATGGCAA</b>
8041	<b>GGAGTACAAG</b>	<b>TGCAAGGTCT</b>	<b>CCAACAAAGC</b>	<b>CCTCCAGCC</b>	<b>CCCATCGAGA</b>	<b>AAACCATCTC</b>
8101	<b>CAAAGCCAAA</b>	<b>GGGCAGCCCC</b>	<b>GAGAACCACA</b>	<b>GGTGTACACC</b>	<b>CTGCCCCCAT</b>	<b>CCCGGGATGA</b>
8161	<b>GCTGACC AAG</b>	<b>AACCAGTCA</b>	<b>GCCTGACCTG</b>	<b>CCTGGTCAAA</b>	<b>GGCTTCTATC</b>	<b>CCAGCGACAT</b>
8221	<b>CGCCGTGGAG</b>	<b>TGGGAGAGCA</b>	<b>ATGGGCAGCC</b>	<b>GGAGAACAAC</b>	<b>TACAAGACCA</b>	<b>CGCCTCCCGT</b>
8281	<b>GTTGGACTCC</b>	<b>CAGCGCTCCT</b>	<b>TCTTCCTCTA</b>	<b>CAGCAAGCTC</b>	<b>ACCGTGGACA</b>	<b>AGAGCAGGTG</b>
8341	<b>GCAGCAGGGG</b>	<b>AACGTCTTCT</b>	<b>CATGCTCCGT</b>	<b>GATGCATGAG</b>	<b>GCTCTGCACA</b>	<b>ACCCTACAC</b>
8401	<b>GCAGAAGAGC</b>	<b>CTCTCCCTGT</b>	<b>CTCCGGGTAA</b>	<b>A</b>		

10

20

30

40

50

( i i ) F c ( A ( i i ) ( 配列番号 3 ) と同一配列 ) ]

表 2 : ポリペプチド配列

A . Bドメイン欠失 F V I I I - F c 単量体ハイブリッド ( B D D F V I I I F c 単量体二量体 ) : B D D F V I I I F c および F c 鎖を共発現することにより生成。

コンストラクト = H C - L C - F c 融合物。

F c 発現カセットを B D D F V I I I - F c と一緒に同時導入して、 B D D F V I I I F c 単量体 - を生成させる。

B D D F V I I I F c 鎖において、 F c 配列は太字で示され ; H C 配列は二重下線で示され ; 残りの Bドメイン配列はイタリックで示される。

シグナルペプチドには下線が引かれている。

i ) Bドメイン欠失F V I I I - F c鎖(下線は19アミノ酸シグナル配列)(配列番号2)

【化4】

MQIELSTCFFLCLLRFCFS
ATRRYYLGAVELSDWYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTTFVEFTDHLFNIAPRPPWMLLGPITQAEVYDVTVVI
TLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDFLCLTYSLSHVDLVKDLNSGL
IGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVI
GMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLQFLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAE
DYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSOYLNNGPQIRGRKYKVRFMA
YTDETFKTRAIQHESGILGPLYGEGVDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVT
VEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLIICYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQ
LEDPEFAQSNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVEYEDTLTLFPFSGETVFMSENPGLW
ILGCHNSDFRNRGMTALLKVS SCDKNTGDY YEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNPVVLKRHQREITRRTLQSDQEEIDYDDTI
SVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPPQFKKVVVFQEFDTGDSFTQPLYRGELE
HLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSISEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHHMPTKDEFDCKAWAYFSD
VDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIM
DTLPGLVMAQDQIRIRWYLLSMGNSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMST
LFLVYSNKCQTPGLMASGHIRDQFITASGOYQGWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFPSWIKVDLLAPMIIHGKIQGARQKFSLSYI
SQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIARYIRLHPHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKA
ISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQ
WTLFFQNGKVKVQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLR IHPQSVWHQIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

i i ) F c鎖(下線はマウスI g鎖由来の20アミノ酸の異種シグナルペプチド)(配列番号4)

20

【化5】

METDTLLLWVLLLWVPGSTG
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

B. 完全長F V I I I F c単量体ハイブリッド(完全長F V I I I F c単量体二量体) : F V I I I F cおよびF c鎖の共発現によって生成。

コンストラクト=HC-B-LC-Fc融合物。Fc発現カセットを完全長F V I I I - F cと一緒に同時導入して、完全長F V I I I F c単量体を生成する。F V I I I F c鎖において、Fc配列は太字で示され; HC配列は二重下線で示され; Bドメイン配列はイタリックで示される。シグナルペプチドには下線が引かれる。

30

i ) 完全長F V I I I F c鎖(下線はF V I I Iシグナルペプチド(配列番号6))

【化6】

MQIELSTCFFLCLLRFCFS  
ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTTFVEFTDHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVI  
TLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVLDLVDLNSGL  
IGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVDFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVI  
GMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLQGFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAE  
DYDDDLTDEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHKPTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRYSYKSQYLNNGPQRIGRKYKVRFMA  
YTDETFKTRIAIQHESGILGPLLYGEVGDTLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVT  
VEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLIICYKESVDQRGNQIMSDKRNIVLFSVFDENRWSWYLTENIQRFPLNPAGVQ  
LEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYIILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVEYEDTLTLPFSGETVFMSENPGLW  
ILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPFWA  
HRTMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYTFSDDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLN  
EKLGTAAATELKKLDKVSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDPTLFGKSSPLTESGGPLSLSEENNSK  
LLESGLMNSQESSWGKNVSTESGRLFKGKRAHGPAALLTKDNALFKVSI SLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNI  
LESDETFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSEFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSL  
NSGQGPSKQLVSLGPEKSVEGQNFLESEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFNLNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETL  
IQENVVLPQIHTVTGTFKFMKNLFLSTRQNVESYDGAYPVLQDFRSLNDSNTRTKKHTAHFSKKEEENLEGLGNQTKQIVFK  
YACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPSLSDCLTR  
SHSIPQANRSPPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASyrKKDsgvQESSHFLQgAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGS  
GTSATNSVTYKKVENTVLPKDLPKTSGKVLELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTGAIKWNEANRPGKVPFLR  
VATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWSQEKSPKTAFFKKKDTILSLNACESNHAAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTER  
LCSQNPVLRKHQREITRITLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDEFDIYEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNR  
RAQSGSVPQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSIYEEEDQRQGAEPKRF  
VKPNETKTYFWKVVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT  
ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPLGLVMAQDQIRWYLLSMGNSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNL  
YPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPMGASGHIRDQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWST  
KEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIARYIR  
LHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAI SDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQK  
TMKVTGVTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRME  
VLGCEAQDLYDKTHTCPPEPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

i i ) F c 鎖 ( 下線はマウス I g 鎖由来の 20 アミノ酸の異種シグナルペプチド ) ( 配列番号 4 )

【化7】

METDTLLLWVLLLWVPGSTG  
DKTHTCPPEPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK

30

【 図 1 】

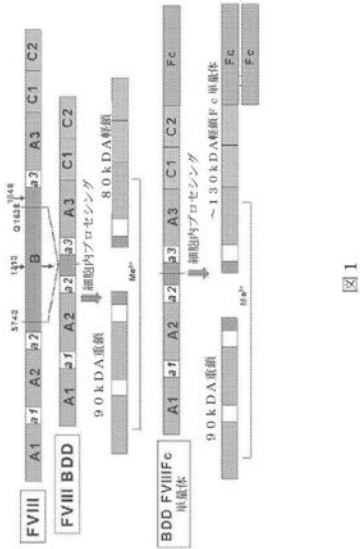


図 1

【 図 2 】

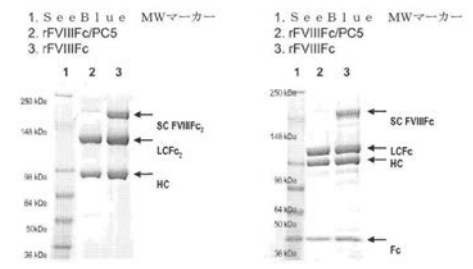


図 2 A

図 2 B

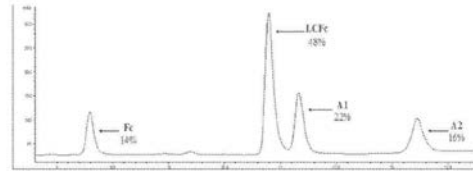


図 2 C

【 図 3 】

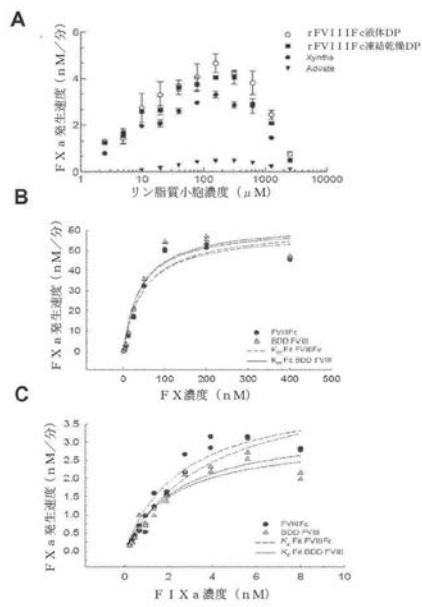


図 3

【 図 4 】

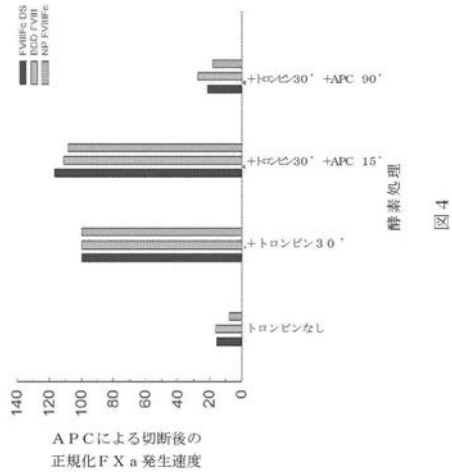


図 4



【 図 9 】

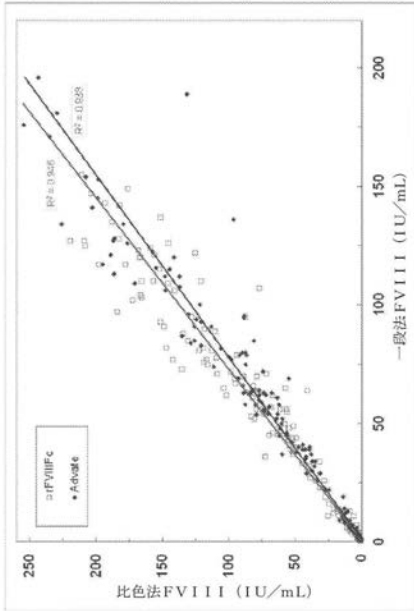


図 9

【 図 10 】

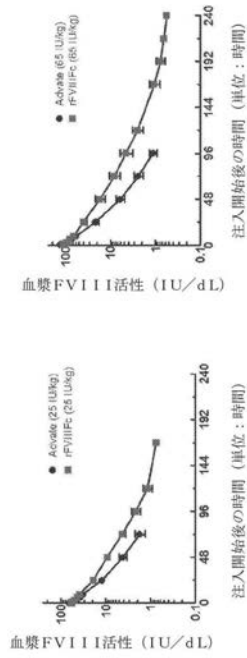


図 10 A

図 10 B

【 図 11 】

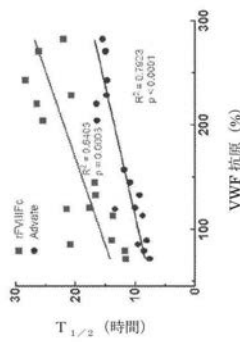


図 11 B

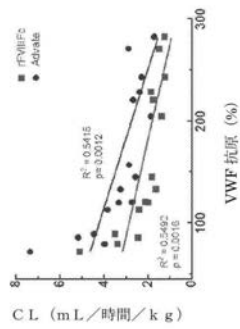


図 11 A

【 図 12 】

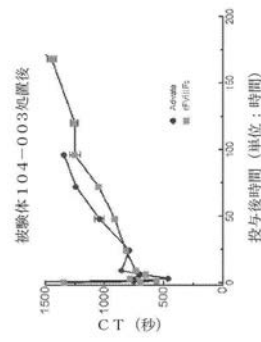


図 12 B

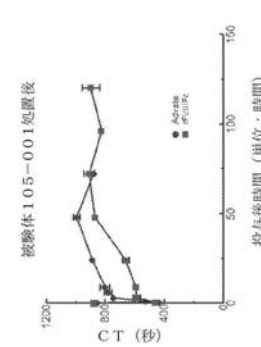


図 12 A

【 図 1 3 】

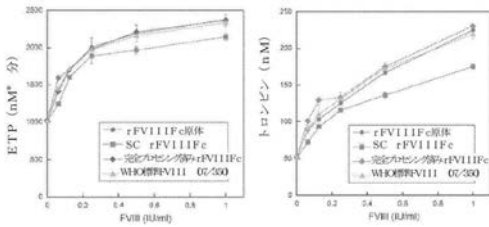


図 13 A

図 13 B

【 図 1 4 】

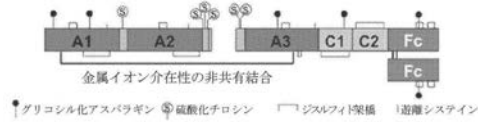


図 1 4

【 図 1 5 】

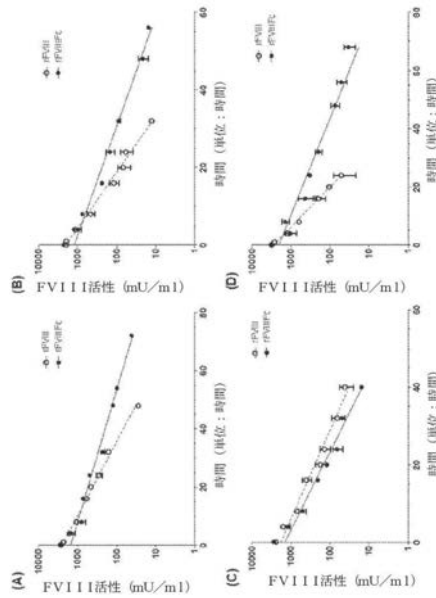


図 1 5

【 図 1 6 】

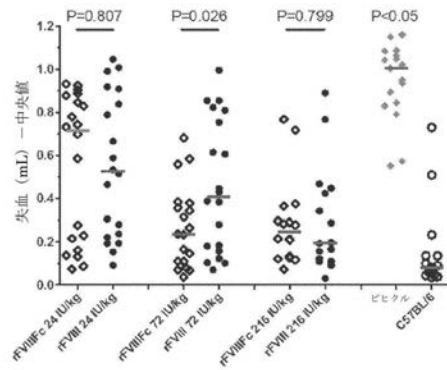


図 1 6

【 図 1 7 】

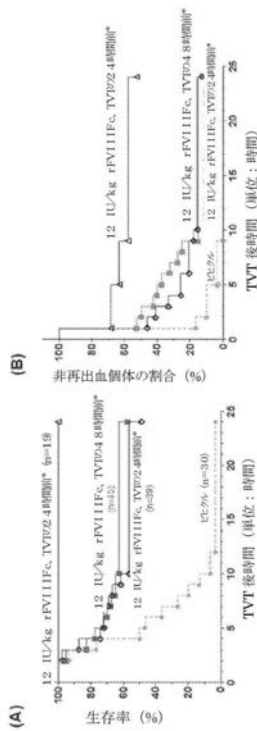
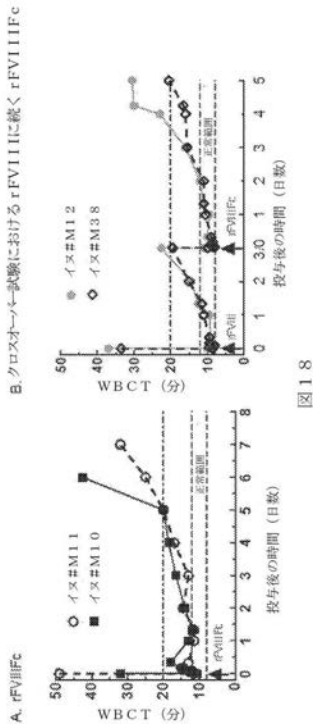
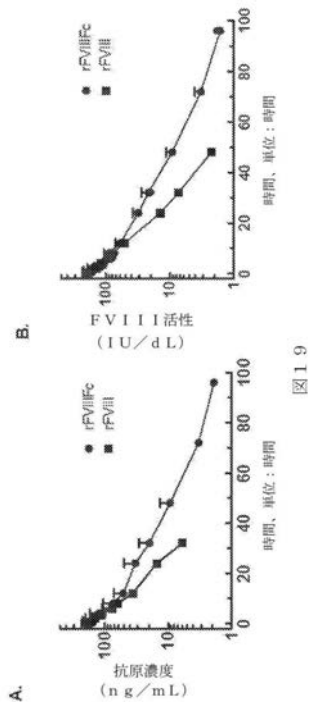


図 1 7

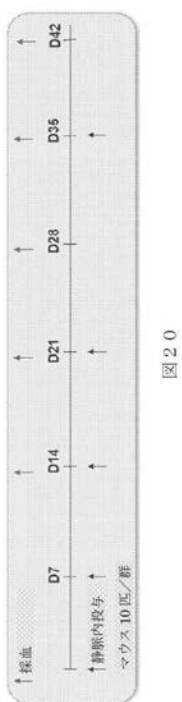
【 図 1 8 】



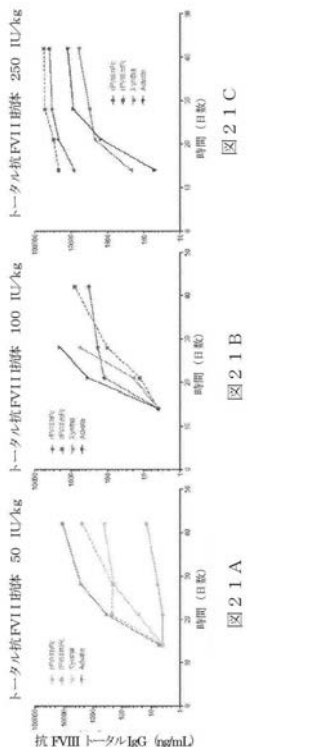
【 図 1 9 】



【 図 2 0 】

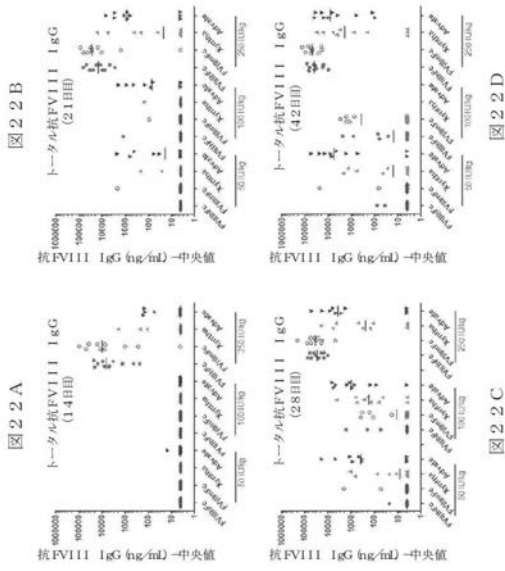


【 図 2 1 】



抗 FVIII トータル IgG (ng/mL)

【 図 2 2 】



【 図 2 3 】

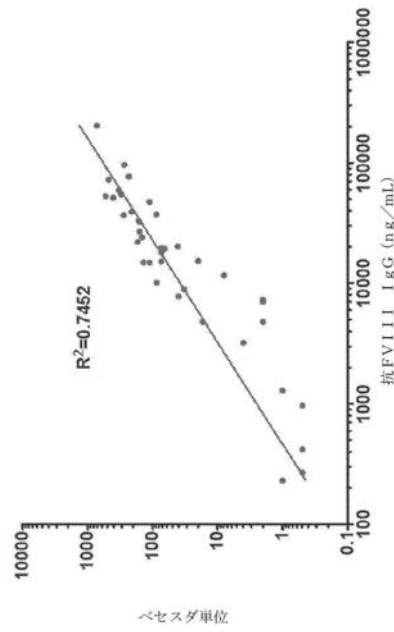


図 2 3

【 図 2 4 】

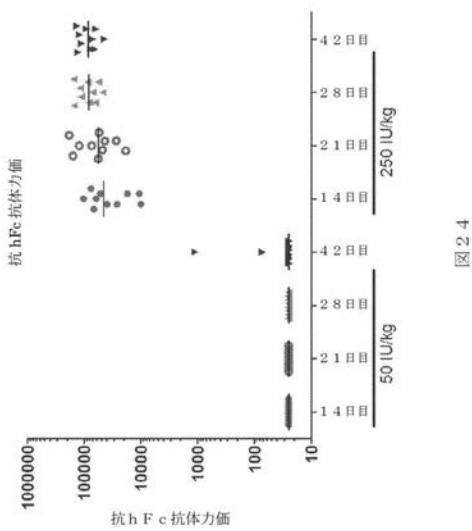


図 2 4

【 図 2 6 】



図 2 6

【 図 2 5 】

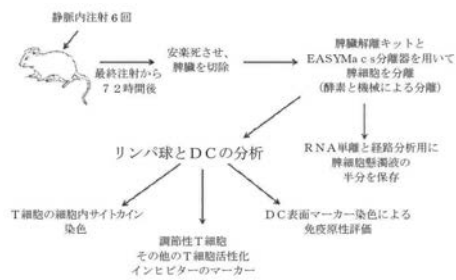


図 2 5

【 図 2 7 】

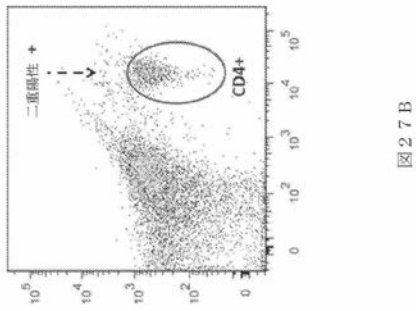


図 2 7 B

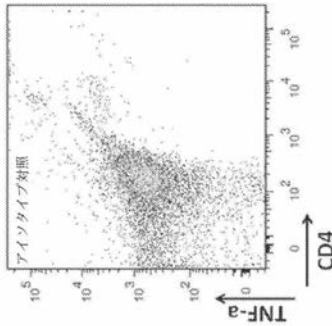


図 2 7 A

【 図 2 8 】

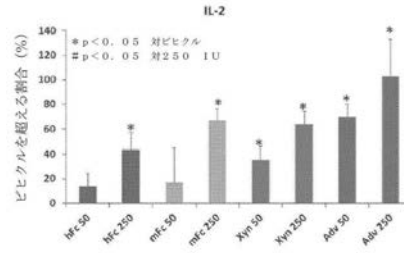


図 2 8

【 図 2 9 】

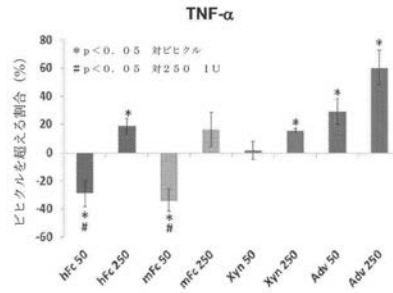


図 2 9

【 図 3 0 】

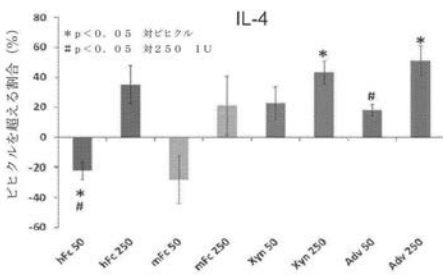


図 3 0

【 図 3 2 】

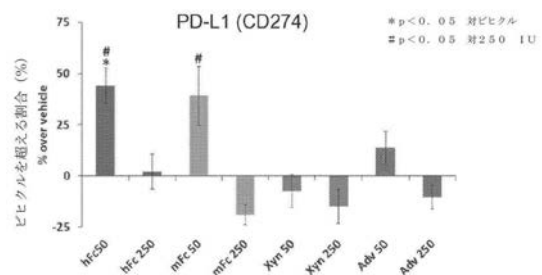


図 3 2

【 図 3 1 】

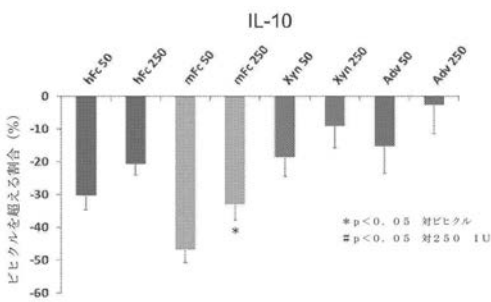


図 3 1

【 図 3 3 】

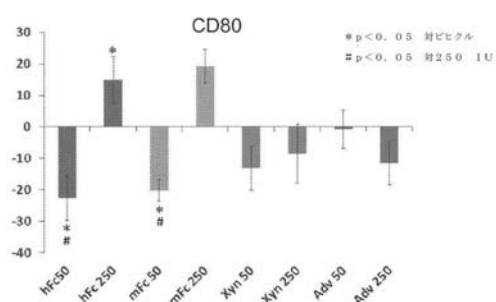


図 3 3



【 図 4 1 】

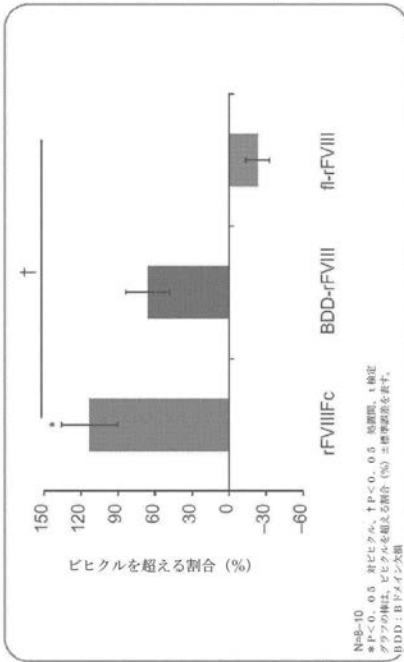


図 4 1

【 図 4 2 】

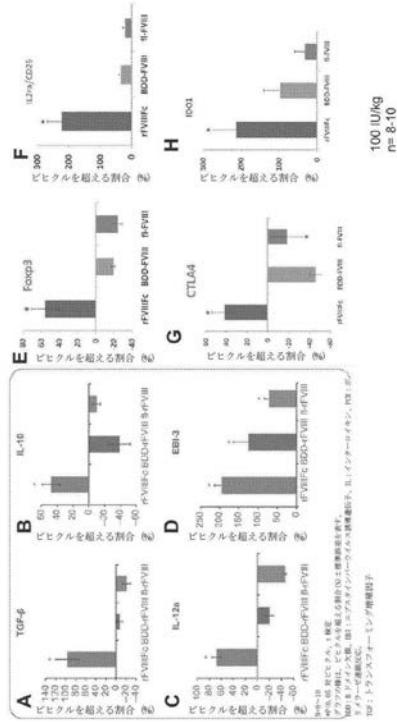


図 4 2

【 図 4 3 】

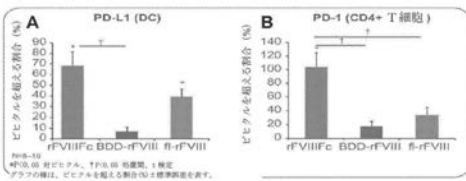


図 4 3

【 図 4 4 】

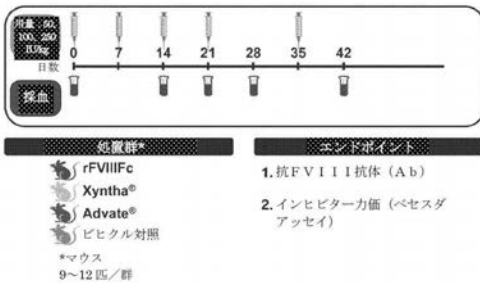


図 4 4

【 図 4 5 】

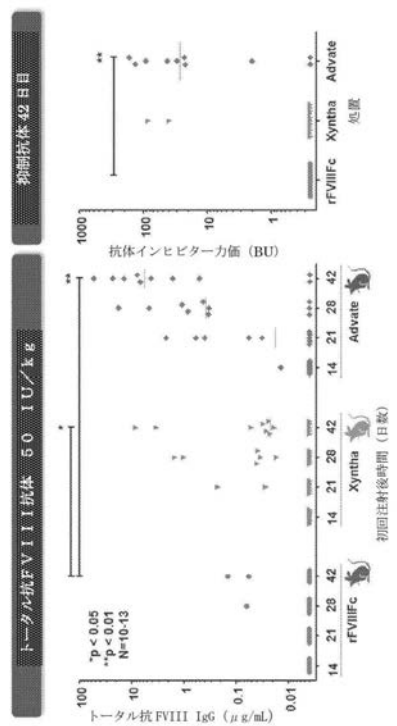


図 4 5

【 図 4 6 】

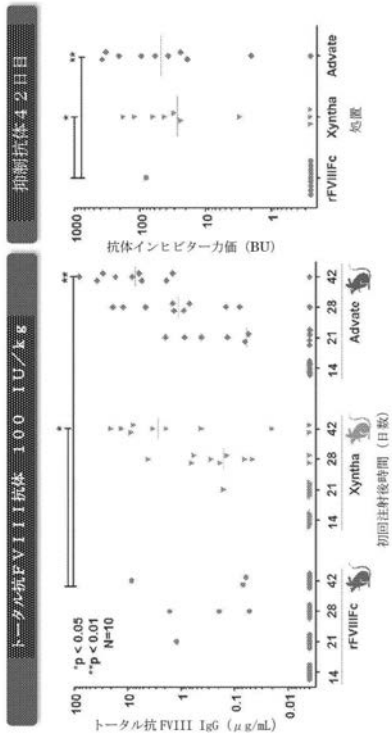


図 4 6

【 図 4 7 】

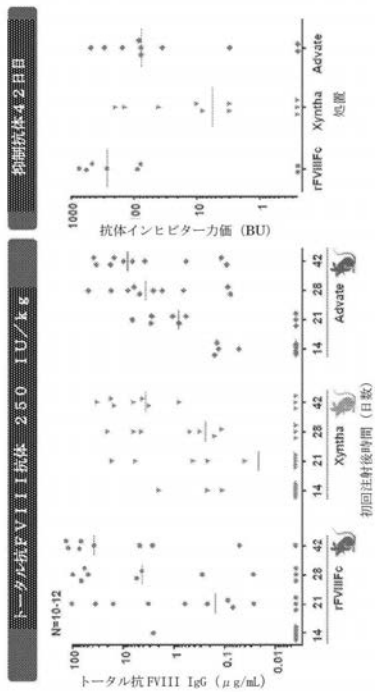


図 4 7

【 図 4 8 】

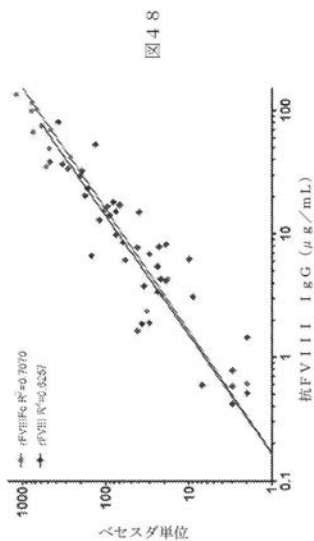


図 4 8

【 図 4 9 】

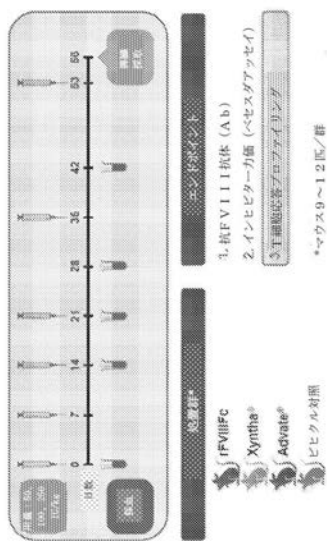


図 4 9

【 図 5 0 】

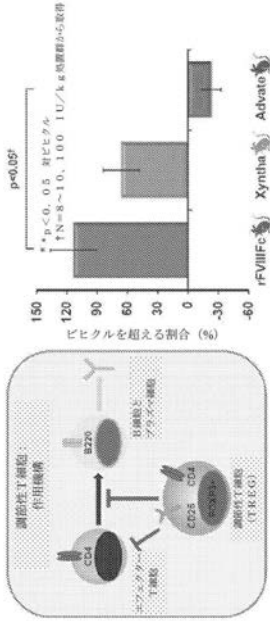


図 5 0

【 図 5 2 】

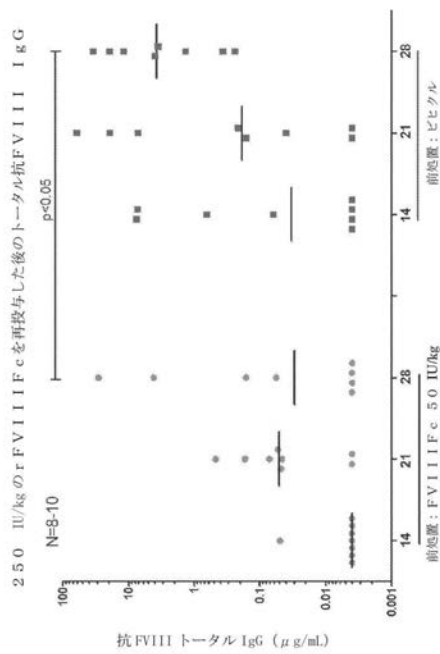


図 5 2

【 図 5 1 】

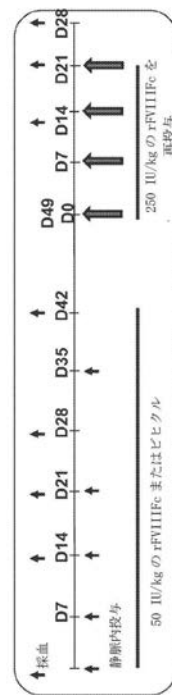


図 5 1

【 図 5 3 】

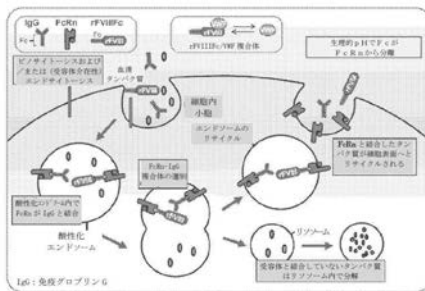


図 5 3

【 図 5 4 】

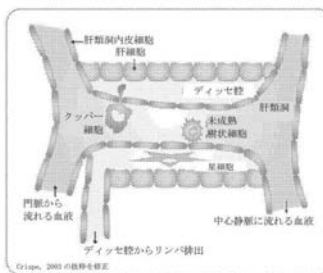


図 5 4

【 図 5 5 】

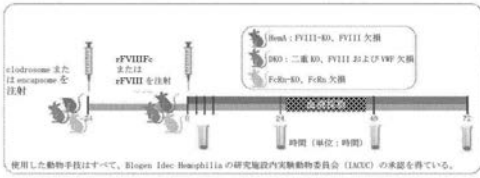


図 5 5

【 図 5 6 】

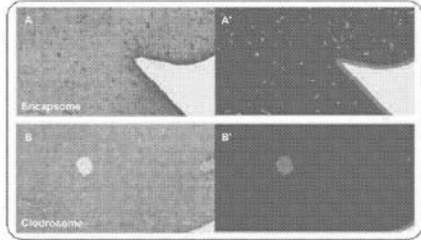
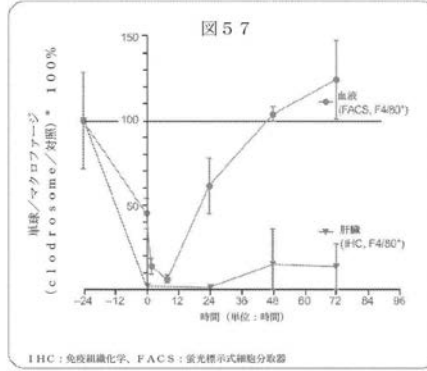


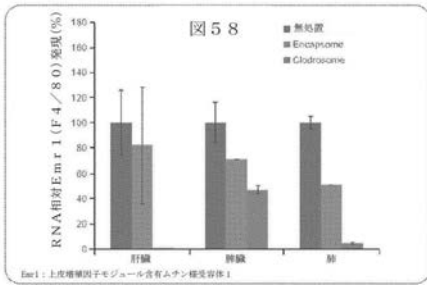
図 5 6

【 図 5 7 】



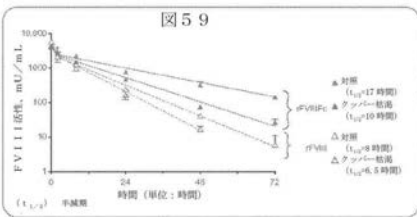
IHC: 免疫組織化学, FACS: 蛍光標式細胞分選器

【 図 5 8 】

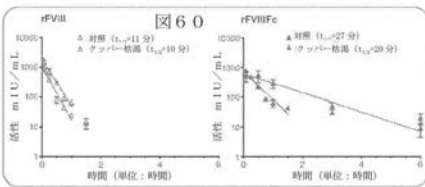


Emr1: 上皮増殖因子モジュール含有ムニン様受容体1

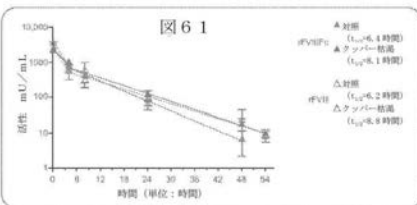
【 図 5 9 】



【 図 6 0 】



【 図 6 1 】



【 図 6 2 】

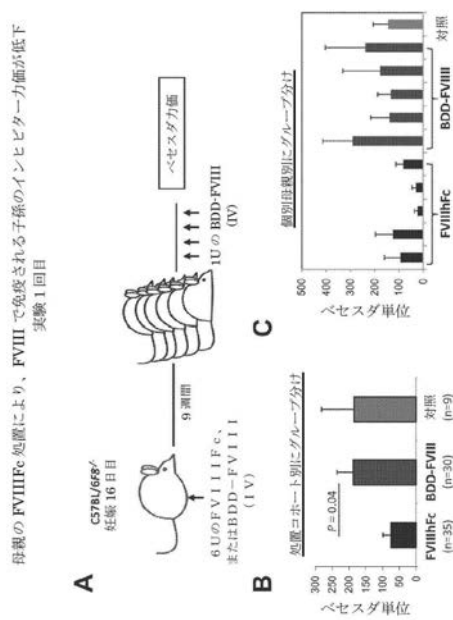


図 6 2

【 図 6 3 】

母親の FVIII<sup>+</sup>処置により、FVIII で免疫される子孫のインヒビター力価が低下  
実験 2 回目

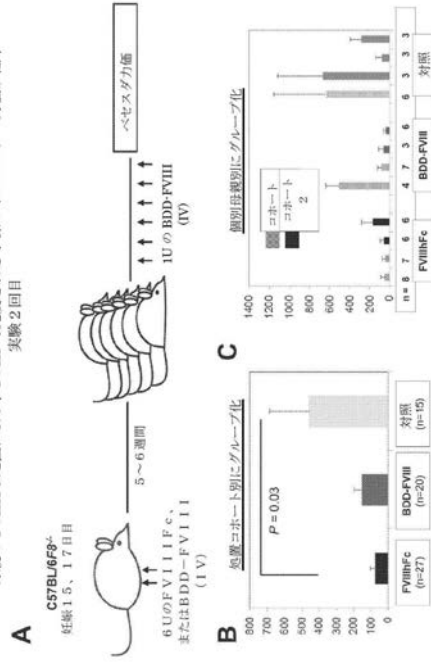


図 6 3

【 図 6 4 】

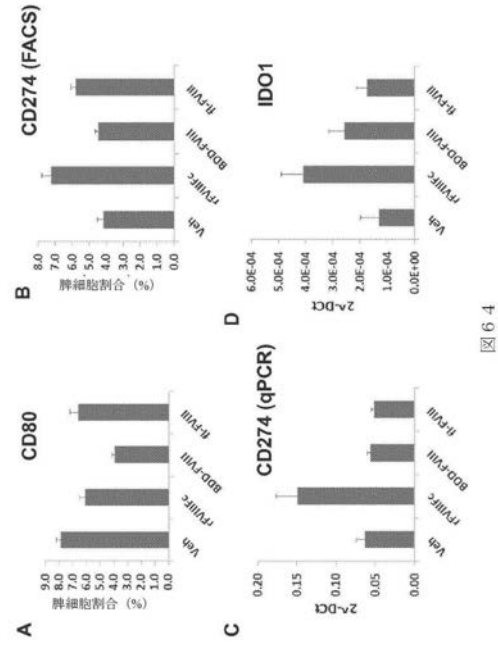


図 6 4

【 図 6 5 】

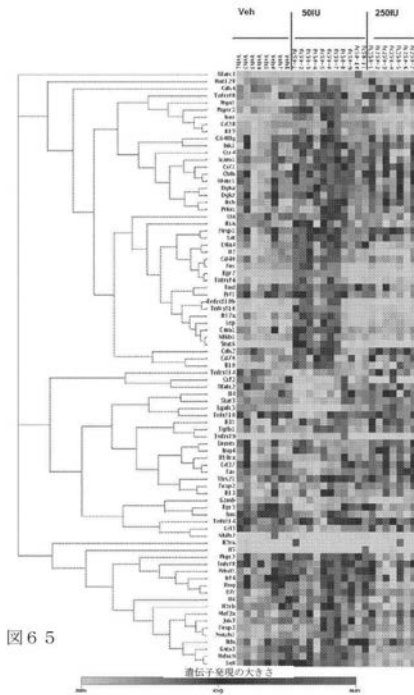


図 6 5

【 図 6 6 】

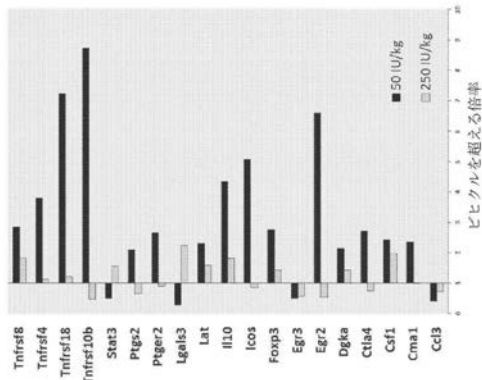


図 6 6

【 図 6 7 】

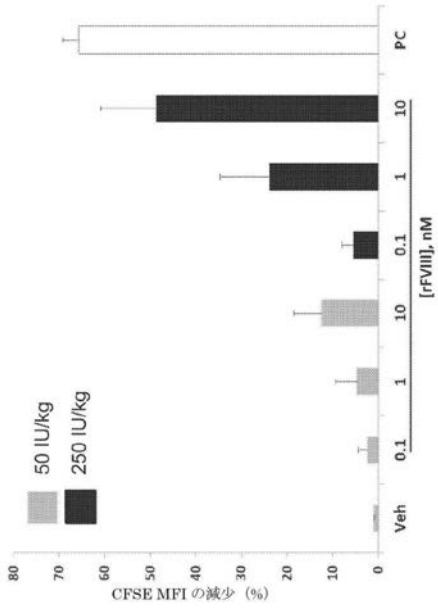


図 6 7

【 図 6 8 】

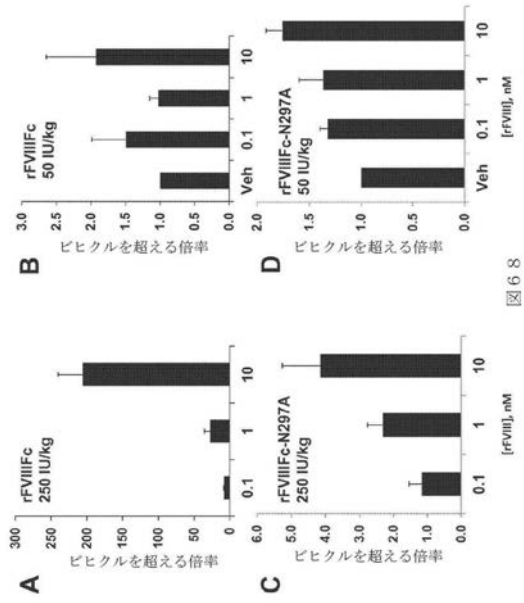


図 6 8

【 配列表 】

2017149784000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 0 7 K	14/755	(2006.01)	C 0 7 K	14/755
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/00
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ハイヤン ジャン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 8 , ベルモント , ベイベリー レーン 3

(72)発明者 トンヤオ リウ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1 , レキシントン , バックマン ドライブ 3

(72)発明者 スリラム クリシュナモージー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 5 5 , メドフォード , リヴィア ビーチ パーク  
ウェイ 3 0 , アpartment 5 1 2

(72)発明者 ネイル ジョゼフソン

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 4 - 1 2 5 6 , シアトル , テリー アベニュー 9 2  
1 , ピュージェット サウンド ブラッド センター

(72)発明者 ピアース グレン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ , ケンブリッジ センター  
1 4

F ターム(参考) 4C084 AA02 BA01 BA08 BA22 BA23 BA41 CA53 DA39 DC15 NA06  
NA14 ZA531 ZA532 ZB081 ZB082  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA65 DA66 DA76 EA24  
FA74 GA21 GA22

【外国語明細書】

2017149784000001.pdf