

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-532176

(P2013-532176A)

(43) 公表日 平成25年8月15日 (2013.8.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/755 (2006.01)	C O 7 K 14/755 Z N A	4 C O 7 6
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	4 C O 8 4
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 H O 4 5
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 37/465	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-519027 (P2013-519027)	(71) 出願人	509091848
(86) (22) 出願日	平成23年7月6日 (2011.7.6)		ノヴォ ノルディスク アー/エス
(85) 翻訳文提出日	平成25年3月7日 (2013.3.7)		デンマーク、ハウスヴェア ディーケー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/061349		2880, ノヴォ アレー
(87) 国際公開番号	W02012/007324	(74) 代理人	100108453
(87) 国際公開日	平成24年1月19日 (2012.1.19)		弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	61/365,478	(74) 代理人	100064908
(32) 優先日	平成22年7月19日 (2010.7.19)		弁理士 志賀 正武
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100089037
(31) 優先権主張番号	10169592.2		弁理士 渡邊 隆
(32) 優先日	平成22年7月15日 (2010.7.15)	(74) 代理人	100110364
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 実広 信哉
		(72) 発明者	ヘンリック・エスターゴード
			デンマーク・DK-3650・ウルストゥ
			ゲ・レグネルスヴァイ・4
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定化させた第VII因子バリエント

(57) 【要約】

本発明は、修飾された凝固因子に関する。特に、本発明は、半減期延長部分とコンジュゲートして安定化させた第VII因子分子、ならびにこのような分子の使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

FVIII活性を有し、in vitroにおける安定性を増大させた、組換えFVIIIバリエーションであって、半減期延長部分とコンジュゲートされ、in vitroにおける安定性を結果として増大させるアミノ酸変化が導入されている、組換えFVIIIバリエーション。

【請求項 2】

ジスルフィド架橋を含む、請求項1に記載の組換えFVIIIバリエーション。

【請求項 3】

前記ジスルフィド架橋が、FVIIIバリエーションの2つのドメインを共有結合により連結している、請求項2に記載の組換えFVIIIバリエーション。

10

【請求項 4】

ジスルフィド架橋が、重鎖と軽鎖とを連結している、請求項2に記載の組換えFVIIIバリエーション。

【請求項 5】

疎水性のアミノ酸残基によるアミノ酸置換を含み、導入された疎水性のアミノ酸残基が、FVIIIバリエーションの疎水性相互作用およびin vitroにおける安定性を増大させる、請求項1から4のいずれか一項に記載の組換えFVIIIバリエーション。

【請求項 6】

正に帯電したアミノ酸残基および負に帯電したアミノ酸残基の形態でアミノ酸置換を含むバリエーションであって、導入された帯電残基が、FVIIIバリエーションの静電相互作用およびin vitroにおける安定性を増大させる、請求項1から5のいずれか一項に記載の組換えFVIIIバリエーション。

20

【請求項 7】

Bドメイン切断バリエーションである、請求項1から6のいずれか一項に記載の組換えFVIIIバリエーション。

【請求項 8】

側鎖基が、切断Bドメインに位置するOグリカンに連結され、前記FVIIIバリエーションが活性化すると、前記側鎖基が除去される、請求項7に記載の組換えFVIIIバリエーション。

【請求項 9】

Bドメインの配列が、配列番号2に示される、請求項7または8に記載の組換えFVIIIバリエーション。

30

【請求項 10】

半減期延長部分が、親水性ポリマー、抗体またはその抗原結合断片、Fcドメイン、ポリペプチド、および脂肪酸または脂肪酸誘導体からなる群から選択される、請求項1から9のいずれか一項に記載の組換えFVIIIバリエーション。

【請求項 11】

配列番号3によるアミノ酸配列を含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の組換えFVIIIバリエーション。

【請求項 12】

以下の置換:S149CおよびE1969Cを含む、請求項1から11のいずれか一項に記載の組換えFVIIIバリエーション。

40

【請求項 13】

以下の置換:D666CおよびS1788Cを含む、請求項1から11のいずれか一項に記載の組換えFVIIIバリエーション。

【請求項 14】

請求項1から13のいずれか一項に記載のFVIIIバリエーションを含む医薬組成物。

【請求項 15】

血友病を治療するための、請求項1から13のいずれか一項に記載のFVIIIバリエーションまたは請求項14に記載の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、修飾された凝固因子に関する。特に、本発明は、半減期延長部分にコンジュゲートして安定化させた第VIII因子分子に関する。本発明はさらに、このような分子の使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

A型血友病とは、凝固因子VIII(FVIII)活性の欠損または機能不全により引き起こされる、遺伝性の出血障害である。その臨床症状は、一次止血に関するのではなく(血栓の形成は正常に行われる)、二次的なトロンビン形成が行われなために、血栓が不安定なことである。A型血友病は、血液から単離するか、または組換えを介して生成させた凝固因子FVIIIの静脈内注射により治療する。現在の治療に関する推奨は、従来のオンデマンド治療から、予防へと推移しつつある。フォンウィレブランド因子に結合した内因性FVIIIの循環半減期は、12~14時間であり、したがって、患者が実質的に無症状の生活を得るには、毎週複数回にわたり予防治療を実施するべきである。多くの患者、とりわけ、小児および若年者にとって、静脈内(IV)投与は、大きな不都合および/または痛みを伴う。

10

【0003】

循環半減期が著明に延長された第VIII因子バリエーションの開発では、各種の方法が用いられている。これらの方法のうちの多くは、第VIII因子と、例えば、PEG(ポリエチレングリコール)などの親水性ポリマーとのコンジュゲーションに関する。WO03031464は、PEG基をポリペプチドに存在するグリカンに結合させうる、酵素的な手法について開示している。Blood-2009-11-254755は、PEG基を特異的にコンジュゲートしうる、表面が露出されたCys残基の導入について開示している。

20

【0004】

FVIII分子へのジスルフィド架橋の導入は、WO02103024により知られている。しかし、このような、ジスルフィド架橋を含むFVIIIバリエーションは、in vivoにおける循環半減期の延長を結果としてもたらさなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

30

【特許文献1】WO03031464

【特許文献2】WO02103024

【特許文献3】EP0319315

【特許文献4】米国特許第5,985,265号

【特許文献5】WO99/55377

【特許文献6】WO09108806

【特許文献7】WO2007/056191

【特許文献8】WO2006102652

【特許文献9】EC2.4.99.4

【特許文献10】EC2.4.99.6

40

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Blood-2009-11-254755

【非特許文献2】MacEwan SR、Chilkoti A、Biopolymers、2010;94:60頁

【非特許文献3】Schellenberger Vら、Nat Biotechnol、2009;27:1186頁

【非特許文献4】Schlapschy Mら、Protein Eng Des Sel、2007 ;20 :273頁

【非特許文献5】Dennis MSら、J Biol Chem、2002、277:35035頁

【非特許文献6】Biopolymer、2010;94(1):60~77頁

【非特許文献7】Dombkowski、Bioinformatics (2003) 19: 1852~3頁

【非特許文献8】Kjalke Eur J Biochem、234、773頁

50

- 【非特許文献 9】Thim Lら、Haemophilia 2010; 16: 349 ~ 48頁
【非特許文献 10】Cho M-Sら、J Biomed Sci 2002; 9:631 ~ 63頁
【非特許文献 11】Parker ETおよびLollar P.、Biochemistry、2007;46:9737 ~ 42頁
【非特許文献 12】Gale AJら、J Thromb Haemost、2006;4:1315 ~ 22頁
【非特許文献 13】Wakabayashi Hら、J Thromb Haemost、2009;7:438 ~ 44頁
【非特許文献 14】Lisman Tら、J Thromb Haemost 2005; 3: 742 ~ 751頁
【非特許文献 15】Hemker HCら、Pathophysiol Haemost Thromb 2003; 33:4 ~ 15頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

10

したがって、当技術分野では、第VIII因子活性を伴い、in vivoにおける循環半減期が著明に延長された、FVIIIバリエーションが必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、FVIII活性を有する組換えFVIIIバリエーションであって、FVIIIバリエーションを半減期延長部分とコンジュゲートし、in vitroにおけるバリエーションの安定性を増大させるために、FVIIIバリエーションにアミノ酸変化を導入した組換えFVIIIバリエーションに関する。本発明はさらに、療法におけるこのような分子の使用にも関する。本発明による分子は、in vivoにおける循環半減期が、野生型第VIII因子と比較して著明に延長されている。

【図面の簡単な説明】

20

【0009】

【図1】異なる濃度の野生型FVIIIおよびバリエーションで得られる、トロンビン活性の最大レベルを示す図である。データは、各々を2.7nMの野生型FVIIIにより得られる比率に照らして標準化した、5回にわたる個別の実験に由来するデータの平均およびSEMである。

【発明を実施するための形態】

【0010】

定義：

フォンウィレブランド因子(vWF):vWFは、血漿中に存在する大型の単量体/多量体糖タンパク質であり、内皮(パイベル-パラデ小体)、巨核細胞(血小板の顆粒)、および内皮下結合組織において構成的に生成する。その主要な機能は、他のタンパク質、特に、第VIII因子への結合であり、創傷部位への血小板の接着において重要である。第VIII因子は、vWFに結合するが、循環中では不活性である。第VIII因子は、vWFに結合しないと、急速に分解されるか、または除去される。したがって、FVIIIにおけるvWF結合能の低減または除去は、これまでのところ、循環半減期が延長された因子FVIIIのバリエーションを得るのにまったく望ましくない手法であると考えられてきた。しかし、分子が半減期延長部分にコンジュゲートされているならば、部位特異的突然変異誘発によってvWFを低減または除去することが可能でありうる。EP0319315において開示されている通り、vWFへの結合の原因となる第VIII因子内の領域は、残基1670 ~ 1684にわたる領域である。この領域に関わる、第VIII因子の点突然変異バリエーションおよび/または欠失突然変異バリエーションは、vWFに対する結合能を変化させると想定されている。本発明により特に好ましい点突然変異の例には、以下の点突然変異: Y1680F、Y1680R、Y1680N、およびE1682T、およびY1680Cのうちの1または複数を含むバリエーションが含まれる。

30

40

【0011】

第VIII因子分子:FVIII/ 第VIII因子とは、肝細胞が主に生成させる、大型の複合体糖タンパク質である。FVIIIは、シグナルペプチドを含めた2351アミノ酸からなり、相同性により規定される複数の異なるドメインを含有する。3つのAドメイン、単独のBドメイン、および2つのCドメインが存在する。ドメインの順序は、NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOHと列挙することができる。FVIIIは、B-A3間境界で分離される2本の鎖として、血漿中を循環する。該鎖は、二価金属イオン結合により連結される。A1-A2-B鎖を重鎖(HC)と称するのに対し、A3-C1-C2を軽鎖(LC)と称する。本明細書で用いられる「第VIII因子」または「FVIII

50

Ⅰ」とは、内因性凝固経路のメンバーであり、血液凝固に不可欠である、ヒト血漿糖タンパク質を指す。「天然FVIII」は、配列番号1 (アミノ酸1～2332)に示される、全長ヒトFVIII分子である。Bドメインは、配列番号1のアミノ酸741～1648にわたる。

【0012】

配列番号1(野生型のヒトFVIII):

ATRRYYLGAVELSDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLEFETDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQA
EVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLS
HVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNR
SLPGLIGCHRSVYVHVIGMGTTPPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPI TFLTAQTLLMDLGQFLLFCHIS
SSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNPSFIIQIRSVAKKH
PKTWVHYIAAEEDWDYAPLVL
APDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD
TLLII FKNQASRPYNIYPHGI
TDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFFVN
MERDLASGLIGPLLCYKESVD
QRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNI
MHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYIL
SIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNR
GMTALLKVSSCDKNTGDY
EEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD
PWFARHTPMPKIQNVSSDLLMLLRQSPT
PHGLSLSDLQEAKEYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTFRPQLHHS
GDMVFTPESGLQLRLNEKLGT
TAATELKKLDFKVSS
TSNNLISITPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLD
TTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEEN
NDSKLLSEGLMNSQESSW
GKNVSSSTESGRLFKGR
AHGPALLTKDNALFKVSI
SLLKTNKTSNNSATNRKTH
IDGPSLLIENSPSVWQNI
LES
DTEFK
KVTPILHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQKKEGPI
PPDAQNPDMSEFFKMLFL
PESARWIQRTHGKNSLNS
GQGPSPKQLVSLGPEKS
VEGQNFLESEKNKVVGK
GEFTKDVGLKEMVFPSS
RNLFTNLNLDNLHEN
NTHNQEKKIQEEIEK
KETLIQENVVLPQIHTVTG
TKNFMKNLFLSTRQNV
EGSYDGAYAPVLQD
FRSLNDSTNRTKKHTA
HFSKKGEEENLEGL
GNQTKQI
VEKYACTTRIS
PNTSQQNFVTQRSK
RALKQFRLPLEETE
LEKRI
VDDTSTQWSKNMKHL
TPSTLTQIDYNEK
EKGAITQSP
LSDCLTRSHSIPQAN
RSPLPIAKVSSFPS
IRPIYLTRVLFQDN
SSHLPAAS
YRKKDSGVQESSH
FLQGAKK
NNLSLA
ILTLEMTGDQREV
GSLGTSATNSVTYK
KVENTVLPKPD
LPKTS
GKV
ELLPKVHIYQKDL
FPTETSNGSPGH
LDL
VEGSL
LLQGTEGAIKWNEAN
RPGKV
PFLRVATESSAK
TPSKLLDPLAW
DNHYGTQIPKEE
WKSQEK
SPEKTAFKKKDTIL
SL
LNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNP
PV
LKRHQREI
TRTT
LQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIY
DEDENQSPRSFQK
KTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNR
NAQSGSV
PQFKKV
VFQEF
TDGSFTQPL
YRGELNEHLGLLG
PYIRAEVEDNIMV
TFRNQASRPYSFYSS
LSY
EEDQ
RQGAEP
RKNFV
KPNETKTYFWKVQHH
MAPTKDEFDCKAWAY
FSD
VDLEKDVHSGLIGPL
LVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFF
TIFDETSWYFTENMER
NCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHA
INGYIMDTLPGLVMAQDQRI
RWYLLSMGSNENIHSIH
FSGHVFTVRKKEEYK
MALYNLYPGVFETV
EMLPSKAGIWRVEC
LIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYS
GSINAWSTKEPF
SWIKVDLLAPMI
IHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI
FNPPIIARYIRLHP
THYSIR
STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKASDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKV
TGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLLTRYLRIPHQSWVHQIALR
MEVLGCEAQDLY

10

20

30

【0013】

本発明による第VIII因子分子/パリアントは、残っているドメインが、配列番号1のアミノ酸番号1～740および1649～2332に示される配列に緊密に対応する、Bドメイン切断因子FVIII分子でありうる。

【0014】

本発明によるFVIIIパリアントは、配列番号1に示される配列と若干異なる場合があり、これは、*in vitro*における安定性を増大させる目的で、アミノ酸置換が導入されるという事実のために、3つのAドメインおよび2つのCドメインが、配列番号1に示されるアミノ酸配列(アミノ酸1～740および1649～2332)とは若干、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20アミノ酸異なりうることを意味する。例えば、vWV結合能を低減する目的で、他の突然変異を導入することもできる。さらに、例えば、LRP、各種の受容体、他の凝固因子、細胞表面など、他の各種の構成要素、グリコシル化部位の導入および/または除去などにより、第VIII因子の結合能を修飾するために、分子内の他の位置にアミノ酸修飾(置換、欠失など)を導入することが妥当と思われる。

40

50

【0015】

本発明による第VIII因子バリエーションは、第VIII因子活性を有するが、これは、凝固カスケード内で、FVIIIと機能的に類似するかまたは同等の形で機能し、活性化血小板においてFIXaと相互作用することによりFXaの形成を誘導し、血栓の形成を支援する能力を意味する。活性化は、*in vitro*において、例えば、血栓解析、内因性トロンビンポテンシャル解析など、当技術分野でよく知られる技法により評価することができる。本発明による第VIII因子分子は、天然ヒトFVIIIのFVIII活性の少なくとも約10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、および100%であるか、または100%をさらに超えるFVIII活性を有する。

10

【0016】

FVIIIの固有の安定性/*in vitro*における安定性:

例えば、FVIIIなどのポリペプチドの「固有の(*intrinsic*)安定性」または「*in vitro*における安定性」とは、場合によって、「安定性」、「物理的安定性」、「固有の(*inherent*)安定性」、「構造的安定性」、「化学的安定性」、「固有の(*intrinsic*)安定性」、「熱力学的安定性」、「熱的安定性」、「フォールディングの安定性」などを指す。このような用語の一般的な主題は、それらが、ポリペプチドの*in vitro*における安定性を指し、この*in vitro*における安定性が、その三次元構造を安定化させるように作用するポリペプチドの固有の特性の総体として見られうることである。FVIIIは、*in vivo*において多数のクリアランス機構の下にあるため、FVIIIの*in vivo*における安定性とFVIIIの*in vitro*における安定性との間には著明な差が存在する。これまで、FVIIIの*in vivo*における循環半減期の延長を、この分子の*in vitro*における安定性を改善することにより得ることは考慮されてこなかった。

20

【0017】

当技術分野では、多様な側鎖を伴うFVIIIのコンジュゲーションが、FVIIIの*in vivo*における循環半減期の延長を得るための手段として知られている。例えば、FVIII分子のコンジュゲーションにより、循環半減期を約2倍に、すなわち、約24時間まで延長しうることが既に裏付けられている。37 °CのTAP/ヒルジン抗凝固血漿中の半減期により決定される野生型FVIIIの*in vitro*における安定性は、約30時間である。理論により拘束されることなしに述べると、本発明の背後にある根拠は、FVIII分子を1または複数の側鎖とコンジュゲートすると、FVIIIの*in vitro*における安定性が、その*in vivo*における循環半減期を何らかの形でさらに延長するための制限パラメータとなるということである。こうして、本発明者らは、1または複数の共有結合により連結された側鎖を、FVIII分子の*in vitro*における安定性を結果として増大させる、FVIIIの点突然変異/アミノ酸変化と組み合わせると、効果が驚くほど増強されることを示した。本発明による分子により得られるであろうさらに驚くべき効果は、結果として得られるFVIIIバリエーションが、活性化FVIII分子からのA2ドメインの解離速度の減少をもたらす特定の突然変異/アミノ酸変化の結果としてより強力な分子をもたらす、比活性の著明な増大も保有しうることである。FVIIIバリエーションが、例えば、野生型FVIIIまたは*in vitro*における安定化のためのアミノ酸変化を伴わないBドメイン切断FVIIIバリエーションと比較して、*in vitro*における安定性を増大させているかどうかを決定するには、例えば、実施例6において開示される塩化グアジニウムアッセイを用いることができる。

30

40

【0018】

本明細書で用いられるアミノ酸変化とは、アミノ酸の置換、欠失、および付加を指す。本発明によるアミノ酸変化は、A1ドメイン、A2ドメイン、A3ドメイン、C1ドメイン、およびC2ドメインのうちの1または複数における1カ所、2カ所、3カ所、または数カ所(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15カ所)のアミノ酸置換の形態であることが好ましい。例えば、1つ、2つ、または3つのジスルフィド架橋の導入、および/または疎水性アミノ酸残基の導入、および/または静電相互作用の導入、および/またはFVIIIに結合させた金属イオン、例えば、CuイオンもしくはZnイオンの結合を安定化

50

させるアミノ酸置換の導入、および/または酸化に対する抵抗の増大を結果としてをもたらすアミノ酸置換など、*in vitro*における安定性を増大させたFVIIIバリエーションを得る多くの方法を想定することができる。

【0019】

Bドメイン切断/欠失第VIII因子分子：第VIII因子におけるBドメインは、配列番号1のアミノ酸741～1648にわたる。Bドメインは、複数の異なる部位で切断されることから、循環血漿中のFVIII分子には大きな異質性が生じる。グリコシル化が高度なBドメインの正確な機能は、知られていない。知られていることは、このドメインが凝固カスケードにおけるFVIII活性にとって不可欠であるということである。したがって、組換えFVIIIは、Bドメイン欠失/切断バリエーションの形態で生成することが多い。

10

【0020】

内因性の全長FVIIIは、単鎖前駆体分子として合成される。分泌される前に、前駆体は、重鎖および軽鎖へと切断される。組換えBドメイン欠失FVIIIは、2つの異なる戦略により生成させることができる。Bドメインのない重鎖および軽鎖を2つの異なるポリペプチド鎖として個別に合成する(2本鎖戦略)か、またはBドメイン欠失FVIIIを、単鎖前駆体ポリペプチド鎖として合成し(単鎖戦略)、これを、全長FVIII前駆体と同じ形で重鎖および軽鎖へと切断する。

【0021】

Bドメイン欠失/切断FVIII前駆体ポリペプチドでは、重鎖部分と軽鎖部分とが通常、リンカーにより隔てられている。Bドメイン欠失FVIII内に免疫原性エピトープを導入する危険性を最小化するために、リンカー配列は、FVIIIのBドメインに由来することが好ましい。少なくとも、リンカーは、Bドメイン欠失FVIII前駆体ポリペプチドを重鎖および軽鎖へと切断するプロテアーゼの認識部位を含まなければならない。全長FVIIIのBドメインでは、アミノ酸1644～1648が、この認識部位を構成する。Bドメイン欠失FVIIIが活性化するとリンカーの除去をもたらすトロンビン部位は、重鎖内に配置される。したがって、リンカーのサイズおよびアミノ酸配列が、トロンビンの活性化による、残りのFVIII分子からのリンカーの除去に影響を与える可能性は低い。Bドメインの欠失/切断は、FVIIIを生成させるのに有利である。にもかかわらず、生成能を低下させることなく、Bドメインの一部をリンカー内に組み入れることもできる。生成能に対するBドメインの負の影響が、Bドメインのいかなる特定のサイズまたは配列に帰せられたことはない。

20

30

【0022】

好ましい実施形態によれば、切断/欠失Bドメインが含む潜在的なO-グリコシル化部位は1つだけであり、1または複数の側鎖基/半減期延長部分が、好ましくはリンカーを介して、共有結合によりこのO-グリコシル化部位にコンジュゲートされる。

【0023】

本発明によるBドメイン切断分子におけるO結合オリゴ糖は、組換え手段により、かつ/またはBドメインの切断を介して新規のO-グリコシル化部位を生じさせることにより人工的に創出されたO-グリコシル化部位に結合させることができる。いずれの場合にも、Bドメイン切断第VIII因子のアミノ酸配列をデザインし、その後、このアミノ酸配列を、コンピュータによる(*in silico*)解析にかけ、切断Bドメイン内にO-グリコシル化部位がある確率を予測することにより、このような分子を生成させることができる。このようなグリコシル化部位を有する確率が比較的高い分子を、適切な宿主細胞内で合成した後、グリコシル化パターンを解析し、その後、切断Bドメイン内にO結合グリコシル化を有する分子を選択することができる。第VIII因子分子はまた、多数のN結合オリゴ糖も含有し、これらのうちの各々は、半減期延長部分を結合させるためのアンカーとしても用いることができる。

40

【0024】

野生型のFVIII分子におけるBドメインの長さは、約907アミノ酸である。本発明によるFVIIIバリエーションにおける切断Bドメインの長さは、例えば、約12～500アミノ酸、約12～400アミノ酸、12～300アミノ酸、12～200アミノ酸、15～100アミノ酸、15～75アミノ酸、15

50

～50アミノ酸、15～45アミノ酸、20～45アミノ酸、20～40アミノ酸、または20～30アミノ酸など、例えば、約10アミノ酸～約700アミノ酸など、約10～約800アミノ酸で変化しうる。切断Bドメインは、重鎖および/もしくは軽鎖の断片、ならびに/または野生型FVIII分子内には見出されない、人工的に導入された配列の断片を含みうる。本明細書では、「Bドメイン切断」および「Bドメイン欠失」という用語を互換的に用いることができる。

【0025】

半減期延長部分/側鎖/側鎖基:本発明によるFVIIIバリエーションは、翻訳後修飾を介して、または融合タンパク質の形態で、半減期延長部分/側鎖基と共有結合によりコンジュゲートされる。したがって、FVIIIの以下の修飾:アルキル化、アシル化、エステル形成、ジスルフィド形成またはアミド形成などのうちの1または複数を実施することができる。これには、PEG化FVIII、システイン-PEG化FVIII、およびこれらのバリエーションが含まれる。本発明によるFVIIIバリエーションはまた、他の生物適合性脂肪酸およびこれらの誘導体、親水性ポリマー(ヒドロキシエチルデンプン、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸、ヘパロサンポリマー、ホスホリル-塩素ベースのポリマー、フレキシマー、デキストラン、ポリシアル酸)、ポリペプチド(抗体、抗体の抗原結合断片、Fcドメイン、トランスフェリン、アルブミン、エラスチン様ペプチド(MacEwan SR, Chilkoti A, Biopolymers, 2010;94:60頁)、XTENポリマー(Schellenberger Vら、Nat Biotechnol、2009;27:1186頁)、PAS化またはHAP化(Schlapschy Mら、Protein Eng Des Sel、2007 ;20 :273頁)、アルブミン結合ペプチド(Dennis MSら、J Biol Chem、2002、277:35035頁)などにもコンジュゲートすることができる。

10

20

【0026】

本発明によるFVIIIは、1または複数の疎水性の半減期延長部分/側鎖基(場合によって、リンカー)を介してアシル化することができる。 $-(CH_2)_{12}$ -部分を有する化合物は、本発明の文脈において可能なアルブミン結合剤である。疎水性の半減期延長部分は、このような部分が、アルブミンと非共有結合を形成し、これにより、血流中のアシル化されたFVIIIバリエーションの循環を促進することが可能であるという事実のために、アシル化されたFVIIIバリエーションとアルブミンとの複合体は、崩壊してFVIIIバリエーションを放出することが緩徐であるにとどまるために、「アルブミン結合剤」と称する場合もある。FVIIIは、化学的方法、ならびに本質的にWO03031464において開示されている工程に従う酵素的「糖アシル化」法を用いてアシル化することができる。酵素的方法は、任意の有機溶媒の使用を回避する利点を有する。

30

【0027】

「PEG化されたFVIII」という用語は、PEG分子とコンジュゲートされたFVIIIを意味する。PEG分子は、任意のアミノ酸残基または炭水化物部分を含めた、FVIIIの任意の部分に結合しうることを理解されたい。「システイン-PEG化されたFVIII」という用語は、FVIIIに導入されたシステインのスルフヒドリル基にPEG分子をコンジュゲートしたFVIIIを意味する。

【0028】

PEGは、デキストランなどの多糖と比較して、架橋形成することが可能な反応基をごく少数しか有さないもので、適切なポリマー分子である。特に、単一官能性PEG、例えば、メトキシポリエチレングリコール(mPEG)は、その結合化学反応が比較的単純である(ポリペプチド上の結合基とコンジュゲートすることが可能な反応基がただ1つである)ので、対象のPEGである。結果として、架橋形成の危険性が消失し、結果として得られるポリペプチドコンジュゲートの均一性が増大し、ポリマー分子のポリペプチドとの反応を制御することが容易となる。

40

【0029】

ポリマー分子(複数可)をポリペプチドに共有結合させるためには、ポリマー分子のヒドロキシル末端基を、活性化形態で、すなわち、反応性官能基を伴う形態でもたす。PEG化は、ポリペプチド上における全てのコンジュゲーション可能な結合基(すなわち、ポリペプチド表面に露出されている結合基)を指向する場合もあり、1または複数の特異的な結

50

合基、例えば、N末端アミノ基(米国特許第5,985,265号)、N結合グリカンおよび/またはO結合グリカンなどを指向する場合もある。さらに、コンジュゲーションは1工程で達成される場合もあり、段階的に達成される場合(例えば、WO99/55377において記載される場合)もある。半減期延長部分をO結合グリカンおよび/またはN結合グリカンに連結する酵素的手法は、WO03031464において開示されている。

【0030】

融合タンパク質:融合タンパク質/キメラタンパク質とは、元は個別のタンパク質をコードする、2つ以上の遺伝子を接合することにより創出されるタンパク質である。この融合遺伝子が翻訳されると、元のタンパク質の各々に由来する機能的特性を伴う単一のポリペプチドが結果としてもたらされる。したがって、本発明によるFVIIIバリエーションの側鎖は、FVIIIに融合させたポリペプチドの形態でありうる。したがって、本発明によるFVIIIは、例えば、抗体および「Fc融合誘導体」または「Fc融合タンパク質」など、FVIIIに半減期の延長を付与しうるペプチドに融合させることができる。

10

【0031】

本明細書では、Fc融合タンパク質が、IgG抗体の循環半減期が比較的長いために、IgGのFcドメインが好ましいことが多いが、任意の抗体アイソタイプに由来しうるFcドメインに融合させたFVIIIを包含することを意図する。さらに、例えば、補体の結合および/または特定のFc受容体への結合など、特定のエフェクター機能を調節するために、Fcドメインを修飾することも可能である。FVIIIを、FcRn受容体に結合する能力を有するFcドメインと融合させると、一般に、野生型FVIIIタンパク質の半減期と比較して、融合タンパク質の循環半減期の延長が結果としてもたらされる。IgGのFcドメインの234、235、および237位における突然変異は一般に、FcRI受容体に対する結合の低減を結果としてもたらし、おそらくはまた、FcRIIaおよびFcRIII受容体に対する結合の低減も結果としてもたらす。これらの突然変異は、FcRn受容体に対する結合を変化させず、このため、細胞内再循環経路を介して循環半減期の延長が促進される。本発明による融合タンパク質の修飾されたIgGのFcドメインは、特定のFc受容体に対するアフィニティーの減少を結果としてもたらす以下の突然変異(L234A、L235E、およびG237A)、およびC1qを介する補体結合の低減を結果としてもたらす以下の突然変異(A330SおよびP331S)のそれぞれのうちの1または複数を含む。

20

【0032】

FVIIIはまた、例えば、血小板の表面において発現するタンパク質に特異的な抗体(例えば、AP3抗体)など、例えば、血小板に特異的に結合する能力を伴うタンパク質など、FVIIIに循環半減期の延長を付与する能力を有する他の任意のポリペプチドに融合させることもできる。

30

【0033】

FVIIIはまた、例えば、HAP化による延長部分($\text{Gly}_x\text{-Ser}_y$)_n (Protein Eng Des Sel、2007年6月;20(6):273~84頁)、XTEN/rPEGによる延長部分(非疎水性のポリアミノ酸)(Nat Biotechnol、2009年12月;27(12):1186~90頁)、PAS化による延長部分(アミノ酸Pro、Ala、およびSerからなる不活性な分解可能部分と融合させることにより、生物学的に活性なタンパク質に大きな流体力学容量を付与し、これにより、腎臓による濾過を介するそのクリアランスを遅延させるのに有効な方法をもたらす)、ELPによる延長部分(エラスチン様ペプチドによる延長部分)(Biopolymer、2010;94(1):60~77頁)、およびアルブミン結合ペプチドによる延長部分(J Biol Chem、2002年9月20日;277(38):35035~43頁)など、「ポリペプチドによる延長部分」に融合させることもできる。

40

【0034】

糖タンパク質:「糖タンパク質」という用語は、「骨格」アミノ酸配列のうちの1または複数のアミノ酸残基に結合した、1または複数のオリゴ糖(グリカン)を含有する、ペプチド、オリゴペプチド、およびポリペプチドを包含することを意図する。グリカンは、N結合グリカンの場合もあり、O結合グリカンの場合もある。

【0035】

50

したがって、「末端シアル酸」または互換的な「末端ノイラミン酸」とは、グリカンまたはオリゴ糖鎖内の末端糖残基として連結されたシアル酸残基を包含することを意図する、すなわち、各分岐の末端の糖は、2 3連結または 2 6連結を介してガラクトースへと連結されたN-アセチルノイラミン酸である。

【0036】

「ガラクトースまたはその誘導体」という用語は、天然のD-ガラクトースなどのガラクトース残基、またはN-アセチルガラクトサミン残基など、その誘導体を意味する。

【0037】

「末端ガラクトースまたはその誘導体」という用語は、グリカンまたはオリゴ糖鎖内の末端糖残基として連結された、ガラクトースまたはその誘導体を意味し、例えば、各分岐の末端糖が、ガラクトースまたはN-アセチルガラクトサミンである。

10

【0038】

「アシアロ糖タンパク質」という用語は、1または複数の末端シアル酸残基が、例えば、シアリダーゼによる処理を介して、または基底をなすガラクトースもしくはN-アセチルガラクトサミンの「層」から、少なくとも1つのガラクトース残基またはN-アセチルガラクトサミン残基を露出させる(「露出されたガラクトース残基」)化学的処理を介して除去された糖タンパク質を包含することを意図する。

【0039】

一般に、N-X-S/Tモチーフを得るように、アミノ酸の突然変異を導入することにより、野生型FVIIIの一部ではないN結合グリカンをもつFVIII分子を導入することができる。本発明のFVIII分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10以上のN結合グリカンを含む。N結合グリカンの構造は、高マンノース形態または複合体形態である。高マンノースグリカンは、グリカンの非還元性端部に、末端マンノース残基を含む。複合体のN-グリカンは、非還元性端部に、シアル酸、ガラクトース、またはN-アセチルグルコサミンを含む。

20

【0040】

シアリルトランスフェラーゼ:シアリルトランスフェラーゼは、シアル酸を、新たに生成するオリゴ糖へと転移させる酵素である。各シアリルトランスフェラーゼは、特定の糖ヌクレオチドのドナー基質に特異的である。シアリルトランスフェラーゼは、シアル酸を、糖脂質(ガングリオシド)、または糖タンパク質のN結合グリカンもしくはO結合グリカンにおける末端のガラクトースに付加する。シアリルトランスフェラーゼは、半減期延長部分を、FVIII分子に存在するグリカンに酵素的にコンジュゲートするとき用いるのに適する。

30

【0041】

本発明によるFVIIIバリエーションを生成させるのに適する宿主細胞は、FVIIIバリエーション分子が、フォールディングおよび翻訳後修飾、例えば、グリコシル化および硫酸化において、適切にプロセッシングされることを確保するために、哺乳動物に由来することが好ましい。本発明を実施する場合、細胞は、哺乳動物細胞、より好ましくは、CHO細胞系、COS-1細胞系、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞系、およびHEK293細胞系が含まれるがこれらに限定されない、確立された哺乳動物細胞系である。好ましいBHK細胞系は、通常BHK 570細胞と称するtk-ts13 BHK細胞系である。他の適切な細胞系には、ラットHep 1細胞、ラットHep II細胞、TCMK細胞、NCTC 1469細胞、DUKX細胞、およびDG44(CHO細胞系)が含まれるがこれらに限定されない。また、3T3細胞、Na-malwa細胞、骨髓腫細胞、および骨髓腫細胞の他の細胞との融合細胞も有用である。現在のところ、好ましい細胞は、HEK293細胞、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、および骨髓腫細胞であり、特に、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である。本発明によるFVIIIバリエーションはまた、トランスジェニック動物(好ましくは、トランスジェニック哺乳動物)により生成させることもでき、トランスジェニック植物(好ましくは、植物の塊茎において発現するトランスジェニック植物)により生成させることもできる。

40

【0042】

50

医薬組成物:本明細書では、医薬組成物が、例えば、RTU(ready-to-use)滅菌水性組成物、または、例えば、水中もしくは水性緩衝液中で再構成しうる乾燥滅菌組成物など、非経口投与に適する、本発明による第VIII因子分子を含む組成物を包含することを意味することが好ましい。本発明による組成物は、各種の薬学的に許容される賦形剤、安定化剤などを含みうる。このような組成物中のさらなる成分には、保湿剤、乳化剤、抗酸化剤、充填剤、等張性調整剤、キレート化剤、金属イオン、油性媒体、タンパク質(例えば、ヒト血清アルブミン、ゼラチン、またはタンパク質)、および双性イオン(例えば、ベタイン、タウリン、アルギニン、グリシン、リシン、およびヒスチジンなどのアミノ酸)が含まれる。このようなさらなる成分が、本発明の医薬製剤の全体的な安定性に有害な影響を与えるべきでないことは当然である。非経口投与は、シリンジ、場合によって、ペン型シリンジによる皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射、または静脈内注射を介して実施することができる。代替的に、非経口投与は、注入ポンプにより実施することもできる。

10

20

30

40

50

【0043】

循環半減期:本発明との関連で用いられる「循環半減期」という用語は、in vivoにおいて測定した循環半減期を指す。本発明によるFVIIIバリエーションは、野生型FVIIIと比較して、循環半減期が著明に延長されている。好ましくは本発明によるFVIIIバリエーションの循環半減期は、野生型FVIIIと比較して、少なくとも約2倍、好ましくは少なくとも約3倍、より好ましくは少なくとも約4倍、なおより好ましくは少なくとも約5倍、および最も好ましくは少なくとも約6倍延長される。循環半減期を測定するには、以下のアッセイを用いることができる:全凝固時間アッセイ、TEG(登録商標)アッセイ、ROTEM(登録商標)アッセイ、FVIII:C血栓アッセイ、トロンビン生成時間アッセイ、比色活性アッセイ、ELISAなど。

【0044】

本明細書で用いられる「治療」という用語は、それを必要とする任意のヒト対象または他の動物対象に対する医学的治療を指す。前記対象は、前記特定の治療の使用が、前記ヒト対象または他の動物対象の健康に有益であることを示す一時的または決定的な診断を施した治療者による身体検診を受けていることが期待される。前記治療のタイミングおよび目的は、対象の健康状態に従い、個体により異なりうる。したがって、前記治療は、予防的治療の場合もあり、緩和的治療の場合もあり、対症的治療の場合もあり、かつ/または治癒的治療の場合もある。

【0045】

第1の態様では、本発明が、FVIII活性を有し、in vitroにおける安定性を増大させた、組換えFVIIIバリエーションであって、半減期延長部分とコンジュゲートされ、in vitroにおける安定性を結果として増大させるアミノ酸変化が導入されている組換えFVIIIバリエーションに関する。したがって、FVIIIバリエーションは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10カ所の、in vitroにおける安定性を結果として増大させるアミノ酸変化を含み得る。

【0046】

本発明の一実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、ジスルフィド架橋を含む。別の実施形態では、前記バリエーションが、2つのジスルフィド架橋を含む。第3の実施形態では、前記バリエーションが、3つのジスルフィド架橋を含む。

【0047】

本発明の別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、FVIIIバリエーションの2つのドメインを共有結合により連結する少なくとも1つのジスルフィド架橋を含む。別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、A1ドメインをA2ドメインに共有結合により連結する少なくとも1つのジスルフィド架橋を含む。別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、A2ドメインをA3ドメインに共有結合により連結する少なくとも1つのジスルフィド架橋を含む。別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、A3ドメインをC1ドメインに共有結合により連結する少なくとも1つのジスルフィド架橋を含む。別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、A1ドメインを(i)A2ドメインおよびA3ドメイン、または(ii)A2ドメインおよびC2ドメイン、または(iii)A3ドメインおよびC2ドメインに共有結合により連結する2つのジスルフィド架橋を含む。別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、重鎖を軽鎖に共有結

合により連結する少なくとも1つのジスルフィド架橋を含む。別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、Dombkowski [Bioinformatics (2003) 19: 1852~3頁]により記載されるジスルフィド結合の合理的なデザイン手順に従う、改変された計算手順により選択される位置に配置される少なくとも1対のシステイン残基を含む。この手順は、低解像度のx線結晶構造の不確実性を説明するように改変されているが、高解像度の構造モデルの場合なら、固有のタンパク質の可塑性および可撓性も説明しうるであろう。よって、この新規の手順は、ジスルフィド架橋の形状を記載する結合角ならびにねじれ角についてより大きな許容度を容認する。

【0048】

別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、Gly102-Ala1974、Tyr105-Gly1960、Ser149-Glu1969、Pro264 -Gln 645、Ser268-Phe673、Asn280-S524、His281-Asp525、Arg 282-Thr 522、Ser285-Phe673、Glu287-Phe673、His311-Phe 673、Ile 312-Pro 672、Ser 313-Ala 644、Ser313-Gln645、Ser 314-Ala 644、Ser 314-Gln 645、Ser314-Thr646、Asp647-Asn1950、Phe648-Tyr1979、Leu649-Gly1981、Ser650-Gly1981、Gly655-Ala1800、Tyr656-Ser1791、Thr657-Ser1788、Met 662-Lys1827、Met 662-Asp1828、Val 663-Glu1829、Tyr 664-Thr 1826、Y664-Lys1967、Asp666-Ser1788、Thr667-Gly1981、Thr667-Ser1788、Leu668-Ser1788、Gly686-Ser1791、Thr669-Tyr1979、Thr669-Val1982、Phe671-Tyr1979、Gly686-Arg1803、His693-Gly1981、Asn 694-Pro 1980、Asn694-Asn1950、Ser 695-Glu 1844およびAsp696-Asn1950 (配列番号1における位置)からなる群から選択される位置に配置される少なくとも1対のシステイン残基を含む。

【0049】

本発明の別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、A1ドメイン、A2ドメイン、またはA3ドメイン内に、FVIIIバリエーションのin vitroにおける安定性に寄与する少なくとも1つのドメイン内ジスルフィド架橋を含む。別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、Ser13-Lys47、Lys48-Gly171、Val80-Gly145、Gly102-Tyr156、Leu277-Gln297、Lys380-Asp459、Ser650-His693、Ser654-Trp688、Thr1695-Asn1770、Lys1845-Lys1887、Ala1877-Tyr1943、およびSer1946-Leu1978(配列番号1における位置)からなる群から選択される位置に配置される少なくとも1対のシステイン残基を含む。

【0050】

別の実施形態では、本発明による前記FVIIIバリエーションが、疎水性アミノ酸残基を伴うアミノ酸置換を含み、導入された疎水性アミノ酸残基により、FVIIIバリエーションの疎水性相互作用およびin vitroにおける安定性が増大する。別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、以下の突然変異:Met147Leu、Leu152Pro、Ser313Pro、Leu377Phe、Met539Pro、Thr646Pro、Met662Leu、Cys692Ser、Met1973Leu、およびGlu1793Pro(配列番号1における位置)のうちの1または複数を含む。

【0051】

別の実施形態では、本発明による前記FVIIIバリエーションが、電荷の変化を伴うアミノ酸置換を含み、導入され帯電残基により、FVIIIバリエーションの静電相互作用およびin vitroにおける安定性が増大する。別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、以下の突然変異:

Gln316Lys、Gln316Lys/Met539Pro、Gln316His、Glu287Ala/Glu676Ala、Asp666Asn、Asp666Val、Arg279Ala/Lys1967Ala、Arg279Gln/Lys1967Gln、Glu287Val、Glu676Val、Glu287Val/Glu676Val、Asp519Ala/Glu665Ala、Asp519Ala/Glu665Val、Asp519Ala/Glu1984Ala、Asp519Ala/Glu1984Val、Asp519Val/Glu665Val、Asp519Val/Glu1984Ala、Asp519Val/Glu1984Val、Glu665Ala/Glu1984Ala、Glu665Ala/Glu1984Val、Glu665Val/Glu1984Ala、Glu665Val/Glu1984Val、Asp519Ala/Glu665Val/Glu1984Ala、Asp519Val/Glu665Val/Glu1984Ala、Asp519Val/Glu665Val/Glu1984Val、Asp519Ala、Asp519Val、Asp525Glu/Asp605Glu、Arg489Gly/Asp525Glu/Asp605Glu、Glu665Ala、Glu665Val、Glu1984AlaおよびGlu1984Val (配列番号1における位置)のうちの1つ、2つ以上を含む。

【0052】

別の実施形態では、本発明による前記FVIIIバリエーションが、直接、または酸化に感受性であるメチオニン残基の除去を介して、FVIIIに結合させた金属イオン、例えば、CuイオンもしくはZnイオンの結合を安定化させるアミノ酸置換であって、これらの変化が、FVIIIバリエーションのin vitroにおける安定性を増大させることに寄与するアミノ酸置換を含む。別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、以下の突然変異:Met320Gln、Met320Gln/Met2010Gln、Met2010Gln、Leu649His、Phe697His、Leu649His/Phe697His、Gly2003Ser、およびSer313Gly(配列番号1における位置)のうちの1または複数を含む。

【0053】

別の実施形態では、本発明による前記FVIIIバリエーションが、Bドメイン切断バリエーションである。別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、切断Bドメインに位置するOグリカンに連結された半減期延長部分であって、前記FVIIIバリエーションが活性化すると除去される半減期延長部分を含む。このバリエーションが、他のいかなる半減期延長部分も含まない場合は、したがって、活性化FVIIIバリエーションが、野生型の活性化FVIIIタンパク質と高度に類似する構造を有する。好ましい実施形態では、Bドメインの配列が、配列番号2に示される。

10

【0054】

別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、選択的に導入された遊離システインに連結された半減期延長部分を含む。別の実施形態では、前記FVIIIバリエーションが、選択的に導入された遊離システインに連結された半減期延長部分であって、前記FVIIIバリエーションが活性化すると除去される半減期延長部分を含む。このバリエーションが、他のいかなる側鎖基を含まない場合は、したがって、活性化FVIIIバリエーションが、野生型の活性化FVIIIタンパク質と高度に類似する構造を有する。

20

【0055】

別の実施形態では、本発明による前記FVIIIバリエーションが、親水性ポリマー、PEG基、抗体(またはその抗原結合断片)、Fcドメイン、アルブミン、ポリペプチド、および脂肪酸または脂肪酸誘導体/アルブミン結合剤からなる群から選択される少なくとも1つの半減期延長部分を含む。別の実施形態では、半減期延長部分が、例えば、FVIII/Fcドメイン融合タンパク質、抗体/FVIII融合タンパク質、アルブミン/FVIII融合タンパク質、またはトランスフェリン/FVIII融合タンパク質など、前記FVIIIバリエーションに融合させた融合パートナーの形態である。別の実施形態では、抗体(またはその抗原結合断片)が、例えば、GP1Ib/IIIa特異的抗体などの血小板特異的抗体である。

30

【0056】

本発明の一実施形態では、融合パートナーが、FVIII分子のA3ドメインを置換している。別の実施形態では、融合パートナーが、第VIII因子のBドメインに挿入されており、Bドメインは、場合によって、切断Bドメインである。別の実施形態では、融合パートナーが、第VIII因子のC2ドメインのN末端に挿入されている。

【0057】

一実施形態では、本発明による前記FVIIIバリエーションのvWF結合能が低減されている。

【0058】

一実施形態では、本発明による前記FVIIIバリエーションが、配列番号3(M662C+D1828C)によるアミノ酸配列を含む。配列番号3(M662C+D1828C)によるアミノ酸配列を含むFVIIIバリエーションは、切断Bドメインに位置するOグリカンに結合させたPEG分子またはアルブミン結合剤と酵素的にコンジュゲートすることが好ましい。PEG分子のサイズは、約40kDaであることが好ましい。Bドメイン(場合によって、切断されうる)に位置するOグリカンに結合させた半減期延長部分とコンジュゲートした、本発明によるFVIIIバリエーションは一般に、前記FVIIIバリエーションが活性化すると、Bドメインにおける側鎖基が除去されるので、野生型活性化FVIII分子の構造を模倣する能力を有する。

40

【0059】

一実施形態では、本発明によるFVIIIバリエーションが、以下の置換:S149CおよびE1969Cを含む。

50

【0060】

一実施形態では、本発明によるFVIIIバリエーションが、以下の置換:D666CおよびS1788Cを含む。

【0061】

別の実施形態では、本発明によるFVIIIバリエーションが、N1950位のアミノ酸置換を含み、前記置換が、N1950Q、N1950F、およびN1950Iからなる群から選択される。この置換は、N1950QまたはN1950Iであることが好ましい。

【0062】

別の実施形態では、本発明によるFVIIIバリエーションが、以下の置換:D519VおよびE1984Aを含む。

10

【0063】

別の態様は、本発明によるFVIIIバリエーションのうちのいずれか1つをコードするDNA分子に関する。別の態様は、本発明によるDNA分子を含むベクターおよび宿主細胞に関する。したがって、別の態様は、本発明によるFVIIIバリエーションを生成させる方法に関する。このような方法は、本発明によるFVIIIバリエーションをコードするDNA分子を含む宿主細胞を、適切な条件下においてインキュベートするステップと、前記FVIIIバリエーションを単離するステップと、場合によって、FVIIIバリエーションを側鎖基とコンジュゲートするステップとを含む。

【0064】

別の態様は、場合によって、1または複数の薬学的に許容される賦形剤を伴う、本発明によるFVIIIバリエーションを含む医薬組成物に関する。この処方物は、静脈内投与を意図する非経口処方物であることが好ましい。処方物は、凍結乾燥形態にある、本発明によるFVIIIバリエーションを含む1つの容器の形態であることが可能であり、場合によって、水性溶媒を含有する1つの容器であることが可能であるが、この場合は、凍結乾燥画分を水性画分中で溶解させてから投与する。

20

【0065】

別の態様は、血友病を治療するための、本発明によるFVIIIバリエーションの使用に関する。

【0066】

別の態様は、血友病の治療法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の、本発明によるFVIIIバリエーションを投与するステップを含む治療法に関する。

30

【0067】

最後の態様は、場合によって、血友病の治療において用いられる1または複数の他の薬物(例えば、線溶剤の阻害剤)と組み合わせた、血友病の治療のための、本発明によるFVIIIバリエーションの使用に関する。

【0068】

(実施例)

本明細書で用いられる「N8」および「F8-500」とは、既にW009108806の例において開示されている、Bドメインが切断されたFVIIIバリエーションのアミノ酸配列を指す。「N8」/「F8-500」バリエーションは、配列番号2に示される配列を伴うBドメインを有し、この分子の活性化変化形は、内因性活性化FVIIIと本質的に同一である。この分子の特異的突然変異バリエーションを、配列番号1の番号付けによる特異的アミノ酸置換を後続させた「F8-500」と称する。この分子の一部のバリエーションは、好ましくは、切断Bドメイン内のOグリカンに位置する半減期延長部分にさらにコンジュゲートすることもできる。例えば、40kDaのPEG部分を、Oグリカンに結合させる場合は、この分子を、例えば、「40K-PEG-[O]-...」と名付ける。

40

【0069】

(実施例1)

組換えBドメイン切断O-グリコシル化第VIII因子およびそのバリエーション、例えば、第VIII因子(M662C-D1828C)または第VIII因子(D519V-E1984A)の生成

50

細胞系および培養工程

第VIII因子のcDNAを用いて、哺乳動物用の発現プラスミドを構築した。前記プラスミドは、Y1680F突然変異を含むBドメイン欠失第VIII因子、全長ヒト第VIII因子のアミノ酸1～740を含む第VIII因子重鎖、および全長ヒト第VIII因子のアミノ酸1649～2332を含む第VIII因子軽鎖をコードする。重鎖配列および軽鎖配列は、全長ヒト第VIII因子のアミノ酸741～750および1638～1648による配列を含む21アミノ酸のリンカー(SFSQNSRHPSQNPPVLKRHQRE:配列番号2)により連結した。このプラスミドによりコードされる第VIII因子アミノ酸配列は、配列番号3(M662C-D1828C)に示される通りである:

【0070】

配列番号3(FVIII M662C+D1828C)

ATRRYYLGAVELSDYMQSDLGELPVDARFPPRPVKSFPFNTSVVYKKTLEFVETDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEV
YDTVVI TLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLS
HVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNR
SLPGLIGCHRSVYVHVHIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPI TFLTATQTLTLLMDLGQFLLFCHI SSHQHDMG
EAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFI QIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEDWDYAPLVL
APDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAI QHESGILGPLLYGEVGDITLLIFKNQASRPYNIYPHGI
TDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFI LPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVD
QRGNQIMSDKRNVI LFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNI MHSINGYVFDLQLSVCLHEVAYWYIL
SIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKCVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYE
DSYEDI SAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQS
PRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEV
EDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHMAPTKCEFDCKAWAYFSDVDLEKDV
HSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETQSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMD
TLPGLVMAQDQRI RWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLH
AGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI IHGIKTQ
GARQKFSSLYISQFI IMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGI KHNIFNPPIIARYIRLHPHYSIRSTLRMELM
GCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTVGTTQG
VKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCE
AQDLY

【0071】

チャイニーズハムスター卵巢(CHO)細胞に、前記プラスミドをトランスフェクトし、ジヒドロ葉酸レダクターゼ系により選択し、最終的に、動物成分非含有培地中で培養されるクローン懸濁液生成細胞をもたらした。

【0072】

工程の第1のステップは、作業用の細胞バンクバイアルに由来する細胞バイアルを、化学的に規定された、動物成分非含有増殖培地へと播くことである。まず融解後、細胞を、T型フラスコ内でインキュベートする。融解の1または2日後、細胞をシェーカーフラスコへと移し、細胞密度を $0.2 \sim 3.0 \times 10^6$ 個/mlに維持するために、培養物容量を系列希釈により拡張する。次のステップは、シェーカーフラスコ中の培地を、種培養用バイオリアクターへと移すことである。ここで培養物容量をさらに拡張してから、最終的に生成用バイオリアクターへと移す。化学的に規定された、同じ、動物成分非含有培地を、全ての接種物拡張ステップに用いる。生成用バイオリアクターへと移した後で、培地に、生成物濃度を増大させる成分を補充する。生成用バイオリアクターでは、サイクル時間を3日間とする反復バッチ工程で細胞を培養する。回収時には、培養物容量の80～90%を、回収タンクへと移す。次いで、初期細胞密度を得るために、残りの培養液を、新鮮な培地で希釈し、次いで、新規の増殖期を開始する。遠心分離および濾過により回収バッチを洗浄し、保持タンクへと移してから、精製工程を開始する。保持タンク内の細胞を含まない回収物に緩衝液を添加し、pHを安定化させる。

【0073】

生成試行が終了するまでに、細胞バンクの生成を終了させるために、細胞を回収して凍

10

20

30

40

50

結させる。この細胞バンクを、マイコプラズマ、滅菌性、およびウイルス汚染について検査する。

【0074】

精製

細胞培養培地から、Bドメイン欠失第VIII因子(M662C-D1828C)を単離するために、Capto MMCカラムにおける濃縮ステップ、免疫吸着クロマトグラフィーによるステップ、アニオン交換クロマトグラフィーステップ、および最後のゲル濾過ステップを含めた、4ステップの精製手順を用いた。典型的には、以下の手順を用いた：11リットルの滅菌濾過培地を、緩衝液A：20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、50mMのNaCl、0.02%のTween 80、pH=7.5中で平衡化したCapto MMC(GE Healthcare、Sweden)によるカラム(1.6×12cm)へと、流速15ml/分で送入した。75mlの緩衝液Aでカラムを洗浄した後、1.5MのNaClを含有する75mlの緩衝液Aで洗浄した。20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween 80、2.5MのNaCl、8Mのエチレングリコール、pH=7.5により、流速1ml/分でタンパク質を溶出させた。8mlの画分を回収し、第VIII因子活性についてアッセイした(比色アッセイ)。第VIII因子を含有する画分をプールし、通常約50mlのプール容量を得た。

【0075】

第VIII因子に対するモノクローナル抗体を開発した(Kjalke Eur J Biochem、234、773頁)。エピトープマッピング(結果は示さない)により、この抗体F25は、アミノ酸残基725~740の重鎖最C末端配列を認識することが判明した。本質的に、製造元により説明される通りに、ゲル1ml当たり2.4mgの密度で、F25抗体を、NHS活性化セファロース4 FF(GE Healthcare、BioSciences AB、Uppsala、Sweden)に連結した。前出の工程によるプールを、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween 80、pH=7.3で10倍に希釈し、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、150mMのNaCl、0.02%のTween 80、1Mのグリセロール、pH7.3で平衡化したF25 Sepharoseカラム(1.6×9.5cm)へと、流速0.5ml/分で適用した。UVシグナルが一定となるまで、カラムを平衡化緩衝液で洗浄し、次いで、UVシグナルが一定となるまで、再度、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.65MのNaCl、pH7.3で洗浄した。20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween 80、2.5MのNaCl、50%のエチレングリコール、pH=7.3により、流速1ml/分で、第VIII因子を溶出させた。1mlの画分を回収し、第VIII因子活性についてアッセイした(実施例3を参照されたい)。第VIII因子を含有する画分をプールし、通常約25mlのプール容量を得た。

【0076】

イオン交換ステップのために、緩衝液A：20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween 80、1Mのグリセロール、pH=7.3および緩衝液B：20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween 80、1Mのグリセロール、1MのNaCl、pH=7.3を調製した。85%の緩衝液A/15%の緩衝液Bにより、流速2ml/分で、Macro-Prep 25Q Support(Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA)によるカラム(1×10cm)を平衡化した。前出の工程によるプールを、緩衝液Aで10倍に希釈し、流速2ml/分でカラムへと送入した。85%の緩衝液A/15%の緩衝液Bにより、流速2ml/分でカラムを洗浄し、流速2ml/分で120mlの15%緩衝液B~70%緩衝液Bにわたる直線勾配により、第VIII因子を溶出させた。2mlの画分を回収し、第VIII因子活性(FVIII:C)についてアッセイした。第VIII因子を含有する画分をプールし、通常約36mlのプール容量を得た。

【0077】

前出の工程によるプールを、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween 80、1Mのグリセロール、150mMのNaCl、pH=7.3で平衡化した調製グレードのSuperdex 200(GE Healthcare、Bio-Sciences AB、Uppsala、Sweden)カラム(2.6×60cm)へと1ml/分で適用し、溶出させた。3mlの画分を回収し、第VIII因子:Cについてアッセイした(実施例3を参照されたい)。第VIII因子を含有する画分をプールし、通常約57mlのプール容量を得た。第VIII因子を含有するプールを、-80℃で保存した。

【0078】

FVIII:CおよびELISAの測定により判定される通り、上記の4ステップの精製手順を用い

10

20

30

40

50

ることにより、約15%の全収量が得られた。

【0079】

(実施例2)

組換えOグリコシル化第VIII因子をPEG化する手順

実施例1で得られた組換え第VIII因子分子は、以下の手順を用いてポリエチレングリコール(PEG)とコンジュゲートする。

【0080】

グリコPEG化反応を効率的とするには、FVIII濃度を>5mg/mlとすることが必要とされる。FVIIIは通常可溶性ではないので、選択された緩衝液組成物のスクリーニングをこれらの濃度で実施した(Table 1(表1)を参照されたい)。これらの考慮に基づき、50mMのMES、50mMのCaCl₂、150mMのNaCl、20%のグリセロール、pH6.0を含有する緩衝液が、適切な反応緩衝液であることが判明した。

【0081】

上記で記載した通りに精製した組換えFVIIIは、段階的溶出を用いるPoros 50 HQカラムによるイオン交換、Sartorius Vivaspın(PES)フィルター、10kDaのカットオフ、またはAmicon 10kDa MWCO PESフィルターを介して、反応緩衝液中で6~10mg/mLの濃度まで濃縮した。FVIIIのグリコPEG化は、反応緩衝液(50mMのMES、50mMのCaCl₂、150mMのNaCl、20%のグリセロール、0.5mMのアンチパイン、pH6.0)中で、第VIII因子(BDD)(最終濃度を約4.7mg/mLとする)を、シアリダーゼ(A.ウリファシエンス(A. urifaciens))(159mU/mL)、CMP-SA-グリセロール-PEG-40kDa(WO2007/056191を参照されたい)(5モル等量)、およびMBP-ST3Gal1(540mU)(WO2006102652)と混合することにより開始した。反応混合物は、転換収率が総量の約20~30%となるまで、32℃でインキュベートした。

【0082】

インキュベーションの後、試料を、緩衝液A(25mMのトリス、5mMのCaCl₂、20mMのNaCl、20%のグリセロール、pH7.5)で希釈し、Source 15Qカラム(内径1cm×6cm、4.7mL、1mL/分、280nm)に適用した。結合した材料を、緩衝液Aで洗浄し、緩衝液B(25mMのトリス、5mMのCaCl₂、1MのNaCl、20%のグリセロール、pH7.5)による段階的勾配を用いて溶出させた。緩衝液Bを約25%とするカラムから、グリコPEG化第VIII因子-(O)-SA-グリセロール-PEG-40kDaを溶出させた。

【0083】

シアリダーゼ処理中にNグリカン上で露出されている遊離ガラクトース部分を遮断するために、反応緩衝液(50mMのMES、20mMのCaCl₂、150mMのNaCl、10mMのMnCl₂、20%のグリセロール、pH6.0)中で、第VIII因子-SA-グリセロール-PEG-40kDa(最終濃度を1.0mg/mLとする)のプール画分を、CMP-SA(2,000モル等量)およびMBP-SBD-ST3Gal3(WO2006102652)(400mU/mL)と混合し、32℃で11時間にわたりインキュベートした。

【0084】

結果として得られる、キャッピングされたグリコPEG化第VIII因子-SA-グリセロール-PEG-40kDaを、50mMのMES、50mMのCaCl₂、150mMのNaCl、10%のグリセロール、pH6.0で平衡化したSuperdex 200カラム(内径10mm×3000mm、280nm)上で流速を0.25mL/分とするゲル濾過を介して、cmp-SAおよびST3GalIIIから分離した。生成物である第VIII因子-SA-グリセロール-PEG-40kDaは、38分後に溶出する。ピーク画分を回収し、アリコート分割し、後続の解析にかけた。

【0085】

(実施例3)

Oグリカンにおける40kDa-グリコPEG-BDD-FVIII(M662C-D1828C)

水(pH7.3)中にイミダゾール(20mM)、塩化カルシウム(10mM)、Tween 80(0.02%)、塩化ナトリウム(500mM)、およびグリセロール(1M)からなる緩衝液中で、BDD-FVIII(M662C-D1828C:配列番号3)(5.32mg、4.4ミリグラム/mL)を融解させた。

【0086】

アルトロバクター・ウレアファシエンス(Arthrobacter ureafaciens)に由来するシアリ

10

20

30

40

50

ダーゼ(20マイクロリットルの緩衝液中に2.4U)、シアリルトランスフェラーゼ(His-ST3Gal I-1、2.5mg/ml、6.75U、12マイクロリットル、EC2.4.99.4、W02008102652)、およびシチジナーリン酸N-5'-PEG-グリセロール-ノイラミン酸、CMP-SA-グリセロール-PEG-40kDa(1.9mM、41マイクロリットルの緩衝液、78ナノモル、W02007/056191を参照されたい)を添加した。最終容量を、1.5mlとした。結果として得られる混合物を、摂氏23度で24時間にわたり静置した。混合物を、緩衝液A(水(pH7.3)中にイミダゾール(20mM)、塩化カルシウム(10mM)、Tween 80(0.02%)、およびグリセロール(1M))で20mlへと希釈した。

【0087】

結果として得られる混合物を、MonoQ 5/50 GLカラム(GE Healthcare BioSciences、Hillrad、Denmark)へと投入した。固定化された材料を、緩衝液A(10カラム容量)で洗浄し、その後、0~100%の緩衝液B(水(pH7.3)中にイミダゾール(20mM)、塩化カルシウム(10mM)、Tween 80(0.02%)、塩化ナトリウム(1M)、およびグリセロール(1M))による勾配(10CVにわたり100%の緩衝液A、10CVにわたり0~20%の緩衝液B、10CVにわたり20%の緩衝液B、25CVにわたり20~100%の緩衝液B、および5CVにわたり100%の緩衝液B)を用いて、それをカラムから溶出させた。

【0088】

回収された材料を、シチジナーリン酸N-5'アセチル-ノイラミン酸(53マイクログラム)およびシアリルトランスフェラーゼ(MBP-SBD-ST3Gal-III、EC2.4.99.6、W02006102652を参照されたい)と混合した。最終容量および濃度は、それぞれ、2.56mlおよび0.46mg/ml(FVIII)、0.132mg/ml(MBP-SBD-ST3Gal-III)、ならびに54マイクロモル(シチジナーリン酸N-5'アセチル-ノイラミン酸)であった。

【0089】

混合物は、摂氏32度で1時間にわたり静置し、このとき、混合物を、緩衝液Aで20mlまで希釈した。結果として得られる混合物を、MonoQ 5/50 GLカラム(GE Healthcare Bio-Sciences)へと投入した。固定化された材料を緩衝液Aで洗浄し、その後、0~100%(10CVにわたり100%の緩衝液A、10CVにわたり0~20%の緩衝液B、10CVにわたり20%の緩衝液B、25CVにわたり20~100%の緩衝液B、および5CVにわたり100%の緩衝液B)の勾配を用いて、それをカラムから溶出させた。単離された画分中のタンパク質含量は、SDS-PAGEゲル(Invitrogen、7%酢酸トリス、NuPAGE酢酸トリス泳動用緩衝液、70分間、150V、非還元条件)を用いて評価した。

【0090】

選択された画分をプールし、Amicon Ultra Centrifuge Tube(Millipore、カットオフ:50kDa)を用いて濃縮した。濃縮後の容量は、0.5mlとなった。結果として得られた溶液を、水(pH7.0)中のヒスチジン(1.5g/l)、塩化カルシウム(250mg/l)、Tween 80(0.1g/l)、塩化ナトリウム(18g/l)、およびスクロース(3g/l)からなる緩衝液中であらかじめ平衡化したSuperose 6 10/300 GLカラム(GE Healthcare Bio-Sciences、Hillrad、Denmark;カラム容量を24mlとする)へと投入した。言及された緩衝液および0.6ml/分の流速を用いて、混合物の成分を、1.5カラム容量にわたり、サイズを1mlとする画分へと分離した。選択された画分をプールした(0.015mg/ml、2ml)。

【0091】

(実施例4)

比色アッセイにおいて測定されたFVIII:C

以下の通りに、Coatest SP試薬(Chromogenix)を用いるFVIII比色アッセイにおいて、rFVIII化合物5~8のFVIII活性(FVIII:C)を評価した: Coatestアッセイ緩衝液(防腐剤を伴う、50mMのトリス、150mMのNaCl、1%のBSA、pH7.3)中で、FVIII試料およびFVIII基準物質(例えば、NIBSCによる、国際FVIII基準物質第7版に照らして校正した精製野生型rFVIII)を希釈した。50µlの試料、基準物質、および緩衝液による陰性対照を、96ウェルマイクロ滴定プレート(Nunc)に二連で添加した。Coatest SPキットによる第IXa因子/第X因子試薬、リン脂質試薬、およびCaCl₂を、5:1:3(容量:容量:容量)で混合し、このうちの75µlを、ウェルに添加した。室温で15分間にわたるインキュベーション後、50µlの第Xa因子基

10

20

30

40

50

質S-2765/トロンピン阻害剤I-2581ミックスを添加し、反応物を室温で10分間にわたりインキュベートしてから、pH3の1Mクエン酸25 μ lを添加した。620nmにおける吸光度を基準波長として用いるSpectramaxマイクロ滴定プレートリーダー(Molecular Devices)上で、415nmにおける吸光度を測定した。陰性対照による値を、全ての試料から減じ、FVIII濃度と対比してプロットした吸光度値の線形回帰により、検量線を作成した。試料の活性を、HPLCにより決定されるタンパク質濃度で除することにより、比活性を計算した。軽鎖に対応するクロマトグラムのピーク下面積を積分し、野生型非修飾rFVIIIに対する並行的な解析における同じピーク面積と比較することにより、かつ、アミノ酸解析を介して飼料の濃度を決定した。Table 1(表1)におけるデータは、FVIII:Cの比活性が、O-グリコPEG化されたrFVIII化合物について維持されたことを裏付ける。

10

【0092】

(実施例5)

一段階血栓アッセイにおいて測定されたFVIII:C

以下の通り、一段階FVIII血栓アッセイにより、rFVIII化合物のFVIII:Cをさらに評価した。HBS/BSA緩衝液(1%のBSAを伴う、20mMのhepes、150mMのNaCl、pH7.4)中で、rFVIII試料およびFVIII基準物質(例えば、NIBSCによる、国際FVIII基準物質第7版に照らして校正した精製野生型rFVIII)を、約10U/mlまで希釈した後、VWF (Dade Behring)を含有するFVIII欠損血漿中で10倍に希釈した。その後、試料を、HBS/BSA緩衝液中で希釈した。単一の因子プログラムを用いて、ACL300R測定器またはACL5000測定器(Instrumentation Laboratory)上で、APTT血栓形成時間を測定した。VWF (Dade Behring)を伴うFVIII欠損血漿をアッセイ血漿として用い、SynthASil(HemosIL (商標); Instrumentation Laboratory)をaPTT試薬として用いた。血栓測定器では、希釈した試料または基準物質を、37 で、FVIII欠損血漿およびaPTT試薬と混合する。塩化カルシウムを添加し、血栓形成までの時間を、濁度により決定する。FVIII基準物質の希釈液による血栓形成時間の検量線に基づき、試料中のFVIII:Cを計算する。Table 1(表1)におけるデータは、血栓形成と比色活性との比を裏付ける。

20

【0093】

【表1】

Table 1: 比色比活性および比色活性と対比した血栓形成活性

グリコPEG化された N8 化合物	比色比活性(IU/mg)	血栓形成と比色活性との比
N8	11819 \pm 727(5)	1.02 \pm 0.12(3)
F8-500-M662C-D1828C	10076 \pm 433(3)	0.92 \pm 0.05(3)
40K-PEG-[O]-N8	9760 \pm 886(8)	0.78 \pm 0.06(3)
40K-PEG-[O]-F8-500-M662C-D1828C	11722 \pm 699(3)	0.58 \pm 0.05(3)

30

【0094】

(実施例6)

FVIIIバリエーションをスクリーニングするためのFVIIIのin vitroにおける安定性についての塩化グアニジニウム加速化アッセイ

40

異なるFVIIIバリエーションにおいて1Mの塩化グアニジニウムを伴う/伴わない場合のFVIII活性(FVIII:C)を、Coatest SP試薬(Chromogenix)を用いる比色FVIIIアッセイにより評価した。FVIII突然変異バリエーションの生成および発現は、以下の通りに実施した。cMycタグをコードする断片を、28アミノ酸のBドメインリンカーを伴うFVIIIをコードする発現構築物中の重鎖のC末端に挿入した(Thim Lら、Haemophilia 2010; 16: 349~48頁)。このFVIII-cMyc2の発現レベルおよび活性は、タグ付けされていないFVIIIと同様であった。さらなる制限部位を、FVIII-cMyc2発現構築物に付加しバリエーション間におけるドメインのスワッピングを容易にした。

【0095】

製造元の推奨に従いHKB11細胞(Cho M-Sら、J Biomed Sci 2002; 9:631~63頁)および29

50

3フェクチン(Invitrogen)を用いる無血清トランスフェクションを実施した。懸濁液であるHKB11細胞を、 50U mL^{-1} のペニシリンおよび 50ug mL^{-1} のストレプトマイシンで補充した市販のFreestyle 293発現培地(Invitrogen #12338-018)中で増殖させた。細胞を、シェーカー内で細胞懸濁液として増殖させ、5%の CO_2 および95%の相対湿度下、 37°C でインキュベートした。細胞を、細胞 3×10^5 個 mL^{-1} の密度で播種し、3~4日間ごとに継代培養した。自動式細胞カウティングのために画像解析ソフトウェアを用いるCedex (Innovatis)解析により、生細胞濃度および全細胞濃度を評価した。生細胞は、それらが色素であるトリパンブルーを排除する能力により検出された。トランスフェクションの96時間後に細胞を採取し、静かに遠心分離することにより細胞ペレットを単離した。その後、細胞ペレットを、0.5MのNaClを含有するFreestyle 293発現培地中に再懸濁させた。静かに遠心分離した後、FVIIIを含有する上清を採取し、さらなる解析まで -80°C で保存した。

10

【0096】

rFVIII試料およびFVIII基準物質(ヒト校正用血漿、Chromogenix)を、Coatestアッセイ緩衝液(50mMのトリス、150mMのNaCl、1%のBSA、pH7.3、防腐剤)中で希釈した。 $5\text{ }\mu\text{L}$ の試料(100 ng/ml)を、2Mの塩化グアニジニウム $5\text{ }\mu\text{L}$ と(最終濃度:1Mの塩化グアニジニウム)、別の試料を $5\text{ }\mu\text{L}$ のCoatestアッセイ緩衝液と混合し(最終濃度:0Mの塩化グアニジニウム)、室温で1時間にわたりインキュベートし、FVIIIバリエーションの変性を可能とした。 $490\text{ }\mu\text{L}$ のCoatestアッセイ緩衝液を添加し、試料を4倍に希釈した。あらかじめ希釈した(100倍、400倍、1600倍および6400倍)試料 $50\text{ }\mu\text{L}$ 、基準物質、および緩衝液である陰性対照を、96ウェルSpectramaxマイクロ滴定プレートに添加した。Coatest SPキットによる第IXa因子/第X因子試薬、リン脂質試薬、および CaCl_2 を5:1:3(容量:容量:容量)に混合し、この混合物 $75\text{ }\mu\text{L}$ をウェルに添加した。室温で15分間にわたるインキュベーション後に、 $50\text{ }\mu\text{L}$ の第IXa因子基質S-2765/トロンピン阻害剤I-2581ミックスを添加し、反応物を、室温で5分間にわたりインキュベートしてから、1Mのクエン酸、pH3、 $25\text{ }\mu\text{L}$ を添加した。 620 nm における吸光度を基準波長として用いるEnvisionプレートリーダー(Perkin-Elmer)により、 405 nm における吸光度を測定した。全ての試料から陰性対照の値を減じ、FVIIIの安定性と対比してプロットした基準物質の吸光度値の線形回帰により検量線を作成した。安定性は、1Mの塩化グアニジニウムと共にインキュベートした試料の活性を、0Mの塩化グアニジニウムと共にインキュベートした試料の活性で除することによる「比」として計算した。表中のデータは、対照およびバリエーションのうちの少数、とりわけ、1950位に突然変異を伴うバリエーションだけがアッセイにおいて安定であることを裏付ける。

20

30

【0097】

【表 2 A】

Table 2: FVIII の in vitro における安定性を改善するために本明細書で記載される通りにデザインされる多様な FVIII 変異体についてのスクリーニングアッセイによる安定化データの概要

変異体	比
スクリーニングデータ	
F8-500-H311Q	0.000
F8-500-H311Y	0.000
F8-500-H311F	0.000
F8-500-H311I	0.000
F8-500-H311L	0.000
F8-500-I312L	0.000
F8-500-I312V	0.000
F8-500-I312T	0.000
F8-500-S313N	0.000
F8-500-S313Q	0.000
F8-500-S313H	0.000
F8-500-S313P	0.000
F8-500-S314V	0.000
F8-500-S314T	0.000
F8-500-Q316K	0.000
F8-500-Q316N	0.000
F8-500-Q316A	0.000
F8-500-A644V	0.000
F8-500-A644T	0.000
F8-500-A644S	0.000
F8-500-Q645H	0.000
F8-500-Q645N	0.000
F8-500-Q645V	0.000
F8-500-Q645S	0.000
F8-500-T646N	0.000
F8-500-T646S	0.000
F8-500-T646A	0.000
F8-500-D647K	0.000
F8-500-D647Q	0.000
F8-500-D647N	0.000
F8-500-F648Y	0.000
F8-500-F648L	0.000
F8-500-F648I	0.000
F8-500-L649I	0.000
F8-500-L649V	0.000
F8-500-S650T	0.000
F8-500-S650V	0.000
F8-500-M1947H	0.000
F8-500-M1947Q	0.000
F8-500-M1947F	0.000
F8-500-M1947L	0.026

【表 2 B】

(表 2 Aの続き)

F8-500-S1949K	0.000
F8-500-S1949H	0.000
F8-500-S1949Q	0.000
F8-500-S1949N	0.000
F8-500-N1950Q	0.134
F8-500-N1950F	0.022
F8-500-N1950I	0.096
F8-500-N1950L	0.000
F8-500-N1950V	0.000
F8-500-E1951K	0.000
F8-500-E1951H	0.000
F8-500-E1951Q	0.000
対照	
F8-500	0.016 ± 0.016
F8-500-Q316H (Parker および Lollar, 2007)	0.084
F8-500-M662C+D1828C(Gale ら, 2006)	0.325
F8-500-D519V-E1984A(Wakabayashi ら, 2009)	0.241

Parker ET および Lollar P, Biochemistry, 2007;46:9737~42 頁

Gale AJ ら, J Thromb Haemost, 2006;4:1315~22 頁

Wakabayashi H ら, J Thromb Haemost, 2009;7:438~44 頁

【 0 0 9 9 】

(実施例7)

クエン酸で安定化させた血漿における減衰

FVIIIまたはFVIIIパリアント(10 μl)を、クエン酸で安定化させてA型血友病血漿(George King Bio-Medical Inc.)90 μlに、1IU/mlの濃度となるまで添加し、37 °Cで0、3、6、20、24、44、および48時間にわたりインキュベートした。その後、比色アッセイにおいて、FVIII活性について試料を解析した:FVIII試料およびFVIII基準物質(例えば、NIBSCによる第7次国際FVIII基準物質に照らして校正された野生型FVIII)の希釈液を、Coatestアッセイ緩衝液(防腐剤を伴う50mMのトリス、150mMのNaCl、1%のBSA、pH7.3)中で希釈した。50 μlの試料、基準物質、および緩衝液による陰性対照を、96ウェルマイクロ滴定プレート(Nunc)に2連で添加した。Coatest SPキットによる第IXa因子/第X因子試薬、リン脂質試薬、およびCaCl₂を5:1:3(容量:容量:容量)に混合し、この混合物75 μlをウェルに添加した。室温で15分間にわたるインキュベーション後に、50 μlの第Xa因子基質S-2765/トロンビン阻害剤I-2581ミックスを加し、反応物を、室温で10分間にわたりインキュベートしてから、1Mのクエン酸、pH3、25 μlを添加した。620nmにおける吸光度を基準波長として用いるSpectramaxマイクロ滴定プレートリーダー(Molecular Devices)により、415nmにおける吸光度を測定した。全ての試料から陰性対照の値を減じ、残りの試料のFVIII活性を、校正された野生型FVIII希釈液から作成された検量線に基づき計算した。FVIII活性を、インキュベーション時間と対比してプロットし、GraphPad Prismソフトウェアによる単相減衰についての式を用いて血漿半減期(t_{1/2})を計算した。以下の表は、文献(Gale AJら、J Thromb Haemost 2006; 4: 1315~22頁; Wakabayashi Hら、J Thromb Haemost 2009; 7: 438~44頁)において既に記載されているFVIII-M662C-D1828CおよびFVIII-D519V-E1984Aの血漿t_{1/2}と共に、野生型FVIIIおよびS149C-E1969C置換を伴うFVIIIの血漿t_{1/2}を示す。FVIII-S149C-E1969Cの血漿中の安定性は、野生型FVIIIと比較して増大した。

【 0 1 0 0 】

【表 3】

Table 3.クエン酸で安定化させた A 型血友病血漿における FVIII 変異体の安定性

試料	血漿中の安定性、t1/2(時間)	
	最良の近似値	95%信頼区間
野生型 FVIII	9.8	(6.6~18.8)
FVIII-D519V-E1984A (Wakabayashi H ら)	72.3	(51.7~120.1)
FVIII-M662C-D1828C (Gale ら)	56.8	(42.9~83.7)
FVIII-S149C-E1969C	33.8	(23.5~60.4)

10

【 0 1 0 1 】

(実施例8)

ヒルジン/TAPで安定化させた血漿における減衰

クエン酸で安定化させたA型血友病血漿(George King Bio-Medical Inc.)に、ヒルジン(5.7 µg/ml)およびダニ抗凝固タンパク質(TAP、12.9g/ml)を添加し、塩化カルシウムを20mMまで添加することにより、血漿を再石灰化させた。FVIIIまたはFVIIIバリエーション(10 µl)を、ヒルジン-TAPで安定化させた血漿90 µlに、1IU/mlの濃度となるまで添加し、37 °Cで最長7日間の期間にわたり、例えば、0、3、6、24、48、72、96、168、192および216時間にわたりインキュベートした。その後、実施例7において記載した比色アッセイにおいて、FVIII活性について試料を解析した。以下の表は、野生型FVIIIの血漿t1/2、ならびに文献(Gale AJら、J Thromb Haemost 2006; 4: 1315~22頁; Wakabayashi Hら、J Thromb Haemost 2009; 7: 438~44頁)において既に記載されているFVIII-M662C-D1828CおよびFVIII-D519V-E1984Aを含めたバリエーションの血漿t1/2を示す。データは、重鎖と軽鎖との間にジスルフィド架橋を挿入したFVIIIバリエーションであるD666C-S1788Cの、ヒルジン-TAPで安定化させた血漿中の安定性が、野生型FVIIIと比較して増強されていることを示す。

20

【 0 1 0 2 】

【表 4】

Table 4.再石灰化させた A 型血友病血漿における FVIII 変異体の安定性

試料	血漿中の安定性、t1/2(時間)	
	最良の近似値	95%信頼区間
野生型 FVIII	35.5	29.6~44.3
FVIII-D519V-E1984A (Wakabayashi H ら)	86.0	58.9~160
FVIII-M662C-D1828C (Gale ら)	148	107~238
FVIII-D666C-S1788C	134	93~240

30

【 0 1 0 3 】

(実施例9)

トロンビン生成

洗浄した血小板を、記載される通りに(Lisman Tら、J Thromb Haemost 2005; 3: 742~751頁)調製し、最終密度が1 µl当たりの血小板150000個となるまで、A型血友病血漿(George King Bio-Medical Inc)に添加した。血小板を含有する血漿80 µlを、マイクロ滴定ウェル内の脂質を再付加した組織因子(Innovin、Dade、最終希釈率1:50000に対応する約0.12pMの組織因子) 5 µlと混合し、Flouroskan Ascentプレートリーダー(Thermo Electron Corporation)により37 °Cで10分間にわたりあらかじめ加熱した。野生型FVIIIまたはバリエーション(最終濃度を2.7、0.9、0.3、0.1、0.33、0.11、0.0037、および0.0012nMとする)を、15 µl中に添加した。CaCl₂(最終濃度を16.7mMとする)と混合した蛍光原基質(Z-Gly-Gly-Arg-AMC、Bachem、最終濃度を417nMとする)を、1時間にわたり持続的に20 µl中に添加して

40

50

から、蛍光(励起波長を390nmとし、発光波長を460nmとする)を測定する。蛍光シグナルを、 α_2 マクログロブリンを結合させたトロンビンの活性について補正し、記載される通りに(Hemker HCら、Pathophysiol Haemost Thromb 2003; 33:4~15頁)、トロンビン濃度校正基準物質およびThrombinoscopeソフトウェア(Synapse BV)を用いることにより、トロンビン濃度へと変換した。安定化させたFVIII突然変異体は、野生型FVIIIより多くのトロンビンを生成させた。これは、解析された最も低いFVIII濃度において最も顕著であった。これは、Thrombinoscopeソフトウェアから得られるトロンビン活性の最大レベルが示されるときに見られる(図1)。0.011nMの野生型FVIIIおよび変異体により得られるトロンビン活性の最大レベルを、以下:トロンビンの最大生成率=トロンビン活性の最大レベル/(トロンビン活性がピークとなるまでの時間-遅延)の通りにThrombinoscopeソフトウェアから得られるパラメータから計算したトロンビンの最大生成率と共にTable 5(表5)に示す。

10

【0104】

【表5】

Table 5.0.011nM の野生型 FVIII および変異体により得られるトロンビン生成についてのパラメータ(5回にわたる個別の実験についての平均および平均の標準誤差(SEM))

	トロンビン生成率		トロンビン生成の最大レベル	
	nM/分	増大の倍数*	nM	増大の倍数*
野生型 FVIII	1.2 ± 0.4	1	29.7 ± 7.0	1
M662C-D1828C	5.4 ± 1.1	4.6	88.5 ± 4.2	3.0
S289L	0.5 ± 0.1	0.39	18.0 ± 4.7	0.61

20

*野生型 FVIII と比較した

【0105】

(実施例10)

FVIII欠損マウスおよびVWF欠損マウスにおけるrFVIIIの薬物動態

rFVIIIバリエーションの薬物動態を、FVIII欠損マウス(Taconic m&bで飼育された、c57bl/6のバックグラウンドを伴う、FVIIIエクソン16ノックアウト(KO)マウス)またはvWF欠損マウス(Charles River、Germanyで飼育された、c57bl/6のバックグラウンドを伴う、vWFエクソン4+5 KOマウス)において評価した。vWF-KOマウスが、13%の正常FVIII:Cを有する一方、FVIII-KOマウスは、検出可能なFVIII:Cを有さなかった。体重を約25グラムとし、週齢の範囲を16~28週齢とする、雄および雌の混合群(約1:1)を用いた。マウスの尾静脈に、rFVIIIの単回の静脈内注射(280iu/kg)を施した。血液は、投与の64時間後までの時点において、コーティング処理されていないガラス製の毛細管を用いて、眼窩神経叢から採取した。各マウスから3例ずつの試料を採取し、各時点において2~4例の試料を回収した。血液は、クエン酸ナトリウムで即座に安定化させ、4倍容量のFVIII Coatest SP緩衝液(実施例4を参照されたい)中で希釈してから、4000×gで5分間にわたり遠心分離した。希釈した血液から得られた血漿をドライアイス上で凍結させ、-80℃で保存した。実施例4において記載される比色アッセイにより、FVIII:Cを決定した。Winnonlin Pro version 4.1ソフトウェアを用いるノンコンパートメント法(NCA)により、薬物動態解析を実施した。

30

40

【0106】

Table 6(表6)は、薬物動態パラメータ:半減期($t_{1/2}$)、クリアランス(cl)、および平均貯留時間(MRT)の推定値を示す。データは、PEG化すると、クリアランスが減少し、半減期および平均貯留時間が延長されたことを示す。

【0107】

【表 6】

Table 6.FVIII 欠損マウスについての薬物動態パラメータ

化合物	用量 (IU/kg)	AUC (時間× IU/mL)	T1/2 (時間)	Cl (mL/時間/kg)	MRT (時間)
N8	280	26~43	7	6.5~11	10
F8-500-M662C-D1828C	280	30	7	9.3	8.2
40K-PEG-[O]-N8	280	73	12	3.0~4.4	17
40K-PEG-[O]-F8-500-M662C-D1828C	280	124	18	2.26	25.3

10

【0108】

数学的モデルは、安定性が、TAP-ヒルジンで安定化させた血友病血漿における血漿半減期に基づく半減期に対して影響を及ぼすことを予測しうる。

【0109】

(実施例11)

A型血友病マウスによるFeCl₃誘導傷害モデルにおいてPEG化とFVIIIの安定化とを組み合わせることによる止血効果の延長

40K-PEG-[O]-FVIII(M662C-D1828C)と対比した40K-PEG-[O]-N8の作用時間を、A型血友病(F8-KO)マウスによるFeCl₃誘導傷害モデルにおいて探索した。

【0110】

材料および方法

マウスに麻酔をかけ、これを温熱パッド(37℃)上に置いて体温を維持した。頸動脈を露出させ、超音波により血流を測定する流速プローブ(0.5PSB Nanoprobe)を、頸動脈の周囲に設置した。10%のFeCl₃溶液に短時間浸漬した濾紙(2×5mm)を、露出された頸動脈の周囲に適用することにより、傷害(鉄を介する化学的酸化)を誘導した。3分後に濾紙を除去した。次いで、頸動脈を、0.9%のNaClで3回にわたり洗浄し、最後に流速プローブ内の空気を抜き、血流測定の最適化を確保するためにSurgilube(音響カブラ)を適用した。FeCl₃で飽和させた濾紙を除去した後で、血流(ml/分)を、25分間にわたり記録し、FeCl₃で飽和させた濾紙を除去してから血流が0ml/分となるまでの時間(分単位)を測定することにより、閉塞までの時間を決定した。25分後に閉塞が起らなかった場合は、観察時間内に閉塞が起らなくとも、閉塞時間を25分間として報告した。F8-KOマウス(n=6~10)を、Advate(280IU/kg)、40K-PEG-[O]-N8(280IU/kg)、または媒体で処置した。FeCl₃誘導傷害は、投与の5分後(急性作用)、または24、48、60、および72時間後に生じさせた。血流(ml/分)は、FeCl₃を除去した25分後に報告し、その後閉塞までの時間を決定した。

30

【0111】

結果

FeCl₃誘導傷害は、280IU/kgの40K-PEG-[O]-N8、280IU/kgの40K-PEG-[O]-F8(M662C+D1828C)、または媒体を投与した5分後(急性作用)、72、および96時間後に生じさせた。血流(ml/分)は、FeCl₃を除去した25分後に報告し、その後閉塞までの時間を決定した(Table 4(表4)を参照されたい)。1群当たり5~8匹ずつのマウスの平均およびSEMを示す。媒体で処置されたF8-KOマウスでは閉塞が起らなかったのに対し、40K-PEG-[O]-N8および40K-PEG-[O]-F8(M662C+D1828C)で処置された全てのマウスでは投与の5分後(急性作用)に閉塞が起こり、平均の閉塞時間は、それぞれ、3.1±0.5分間および3.2±0.4であった。このモデルによる先行研究は、Advateで処置されたF8-KOマウスの閉塞時間が、24および48時間後においてそれぞれ13.0±3.4分間および15.9±2.9分間であるが、Advateを投与した60および72時間後には閉塞が観察されなかったことを明らかにしている。これに対し、40K-PEG-[O]-N8で処置したF8-KOマウスでは、72および96時間後のいずれにおいても、平均閉塞時間は長くなるが、閉塞が観察された(Table 5(表5))。興味深いことに、安定化させたグリコPEG化FVIIIバリエーションは、グリコPEG化野生型FVIIIと比較して、FeCl₃誘導血栓形成モデルにおける効果の持続時間のなお一層の延長を示している。したがって、ダンの事後検定を

40

50

包含するクルスカル-ワリス検定を用いて、異なる群間における閉塞までの時間を比較したところ、96時間後において統計学的有意差が明らかであった ($p < 0.05$) ことから、分子を安定化させる付加効果が確認された。

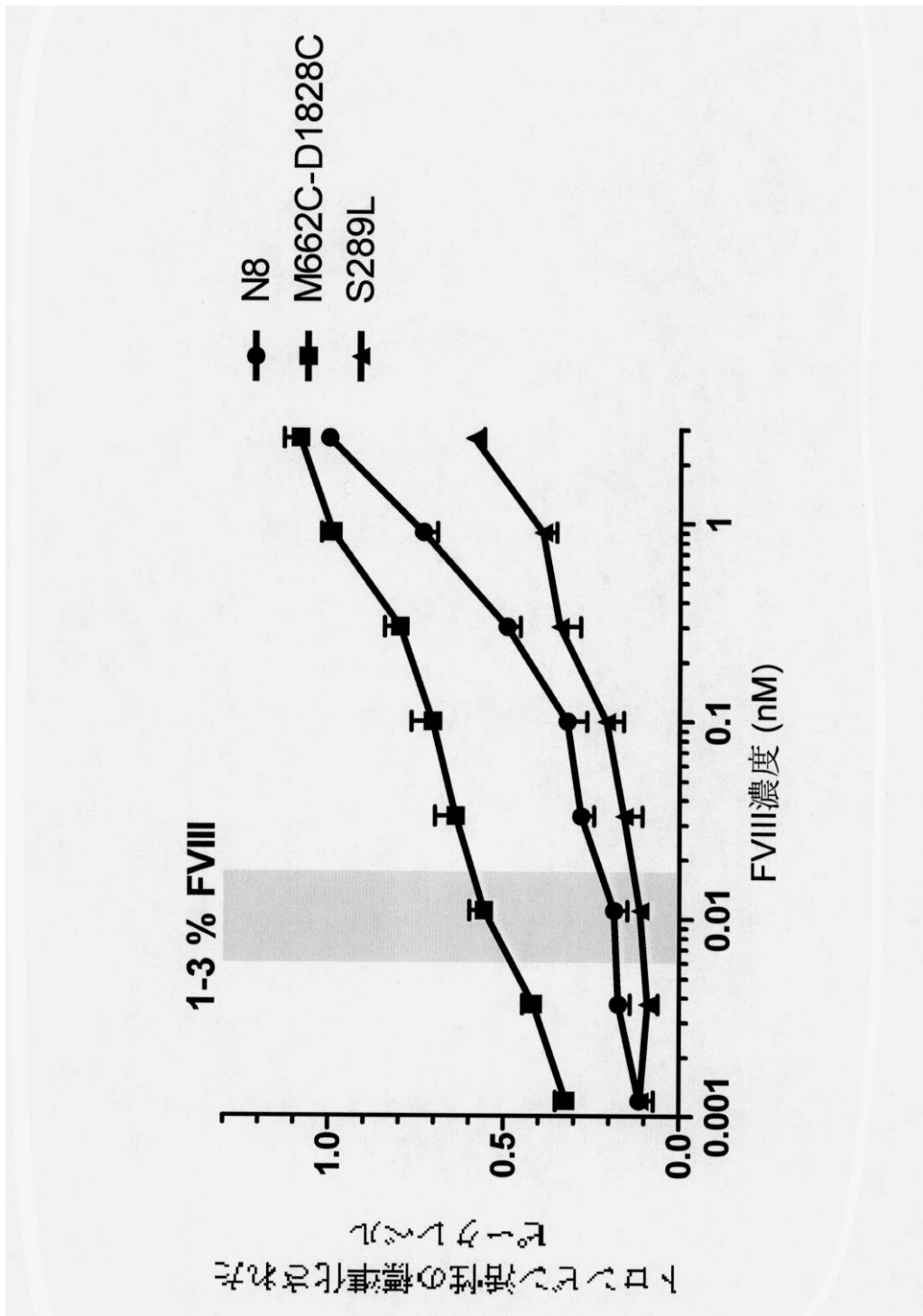
【 0 1 1 2 】

【 表 7 】

Table 7. FeCl₃ で飽和させた濾紙を除去した後における分単位の閉塞までの時間(平均±SEM)(n= 5~8)

注入後の時間 (時間)	40K-PEG-[O]-F8 (wt)	40K-PEG-[O]-F8 (M662C + D1828C)
0.08	3.1 ± 0.5	3.2 ± 0.4
72	11.2 ± 3.1	6.6 ± 1.0
96	15.9 ± 3.4	6.9 ± 1.3

【図 1】



【配列表】

[2013532176000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/061349

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/37 C07K14/755 A61K47/48
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

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

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

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/108806 A1 (NOVO NORDISK AS) 3 September 2009 (2009-09-03) claims 1,5,12 -----	1-4, 7-11,14, 15
Y	US 2003/125232 A1 (GRIFFIN J H) 3 July 2003 (2003-07-03) figure 5; example 2 -----	1-4, 7-11,14, 15
Y	US 2008/200651 A1 (OSTERGAARD H ET AL) 21 August 2008 (2008-08-21) claims 1,20,23 ----- -/-	1-4, 7-11,14, 15

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

* Special categories of cited documents :

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

E earlier document but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 October 2011

Date of mailing of the international search report

20/01/2012

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Gunster, Marco

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/061349

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 2003, GALE A J ET AL: "Functional characterization and proteolytic inactivation of novel engineered disulfide-bond-stabilized human factor VIIIa variants.", XP002604017, Database accession no. PREV200400147308 abstract & BLOOD, vol. 102, no. 11, 2003, pages 541A-542A, 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 06-09, 2003</p> <p>-----</p>	1-4, 7-11,14, 15
A	<p>US 2010/099616 A1 (TURECEK P ET AL) 22 April 2010 (2010-04-22)</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-4, 7-11,14, 15
A	<p>GALE A J ET AL: "Intrinsic stability and functional properties of disulfide bond-stabilized coagulation factor VIIIa variants.", JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 4, no. 6, 2006, pages 1315-1322, XP002604015, figure 1</p> <p>-----</p>	1-4, 7-11,14, 15
A	<p>RADTKE K-P ET AL: "Disulfide bond-stabilized factor VIII has prolonged factor VIIIa activity and improved potency in whole blood clotting assays.", JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 5, no. 1, 2007, pages 102-108, XP002604018, the whole document</p> <p>-----</p>	1-4, 7-11,14, 15
A	<p>GALE A J ET AL: "An engineered interdomain disulfide bond stabilizes human blood coagulation factor VIIIa", JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 1, no. 9, 2003, pages 1966-1971, XP002324436, figures 1,2</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-4, 7-11,14, 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/061349

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 2004, RADTKE KLAUS-PETER ET AL: "Whole blood thromboelastogram assays demonstrate prolonged factor VIIla potency for recombinant disulfide bond-stabilized factor VIII variants.", XP002604016, Database accession no. PREV200510270947 abstract & BLOOD, vol. 104, no. 11, Part 1, 2004, page 813A, 46TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 04 -07, 2004 -----</p>	<p>1-4, 7-11,14, 15</p>
A	<p>US 2007/244301 A1 (SIEKMANN J) 18 October 2007 (2007-10-18) the whole document -----</p>	<p>1-4, 7-11,14, 15</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2011/061349

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
11(completely); 1-4, 7-10, 14, 15(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2011/ 061349

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 11(completely); 1-4, 7-10, 14, 15(partially)

Recombinant FVIII variant conjugated with a half life extending moiety and amino acid alterations resulting in increased in vitro stability, wherein the amino acid alterations are M662C and D1828C (Seq ID No. 3) resulting in a disulfide bridge.

2. claims: 12(completely); 1-4, 7-10, 14, 15(partially)

Recombinant FVIII variant conjugated with a half life extending moiety and amino acid alterations resulting in increased in vitro stability, wherein the amino acid alterations are S149C and E1969C resulting in a disulfide bridge.

3. claims: 13(completely); 1-4, 7-10, 14, 15(partially)

Recombinant FVIII variant conjugated with a half life extending moiety and amino acid alterations resulting in increased in vitro stability, wherein the amino acid alterations are D666C and S1788C resulting in a disulfide bridge.

4. claims: 5(completely); 1, 7-10, 14, 15(partially)

Recombinant FVIII variant conjugated with a half life extending moiety and amino acid alterations resulting in increased in vitro stability, wherein the amino acid alterations are the introduction of hydrophobic amino acid residues that increase hydrophobic interactions and in vitro stability.

5. claims: 6(completely); 1, 7-10, 14, 15(partially)

Recombinant FVIII variant conjugated with a half life extending moiety and amino acid alterations resulting in increased in vitro stability, wherein the amino acid alterations are the introduction of positively and negatively charged amino acid residues that increase electrostatic interactions and in vitro stability.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/061349

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009108806 A1	03-09-2009	EP 2257311 A1 TW 200940096 A WO 2009108806 A1	08-12-2010 01-10-2009 03-09-2009
US 2003125232 A1	03-07-2003	AU 2002310438 B2 CA 2450732 A1 EP 1421539 A2 EP 2110385 A1 ES 2331909 T3 JP 4361786 B2 JP 2005500831 A JP 2008271975 A US 2003125232 A1 US 2007276128 A1 WO 02103024 A2	01-05-2008 27-12-2002 26-05-2004 21-10-2009 20-01-2010 11-11-2009 13-01-2005 13-11-2008 03-07-2003 29-11-2007 27-12-2002
US 2008200651 A1	21-08-2008	EP 1893632 A2 EP 2360170 A2 JP 2008546670 A US 2008200651 A1 WO 2006134173 A2	05-03-2008 24-08-2011 25-12-2008 21-08-2008 21-12-2006
US 2010099616 A1	22-04-2010	AU 2009305612 A1 CA 2738679 A1 EP 2349342 A1 KR 20110071012 A US 2010099616 A1 WO 2010045568 A1	22-04-2010 22-04-2010 03-08-2011 27-06-2011 22-04-2010 22-04-2010
US 2007244301 A1	18-10-2007	US 2007244301 A1 US 2010168391 A1	18-10-2007 01-07-2010

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/27 (2006.01) A 6 1 K 37/36

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

(72)発明者 マリアンネ・チャルク

デンマーク・DK - 3 6 0 0・フレデリクスン・エングリステヴァイ・7

(72)発明者 オレ・ヴィルステズ・オルセン

デンマーク・DK - 2 7 0 0・ブレンスホイ・バックスコウヴァイ・3 8・1

(72)発明者 ラーシュ・シム

デンマーク・DK - 2 8 2 0・ゲントフテ・スキフトヴァイ・2 2

(72)発明者 ヘニング・ラルフ・ステニック

デンマーク・DK - 2 9 8 0・コッケダル・ノードスクランテン・5 9

Fターム(参考) 4C076 AA94 EE23 EE59 FF31 FF65

4C084 AA02 AA03 BA37 BA50 CA53 DC15 NA12 ZA532

4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 BA53 BA55 BA57 BA62 CA40 DA66

DA75 EA20 FA74