

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5770161号
(P5770161)

(45) 発行日 平成27年8月26日(2015.8.26)

(24) 登録日 平成27年7月3日(2015.7.3)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 07 K 14/755	(2006.01)	C 07 K	14/755	
C 07 K 19/00	(2006.01)	C 07 K	19/00	
C 07 K 16/28	(2006.01)	C 07 K	16/28	
C 12 N 1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15	

請求項の数 15 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-503990 (P2012-503990)
(86) (22) 出願日	平成22年4月6日(2010.4.6)
(65) 公表番号	特表2012-522529 (P2012-522529A)
(43) 公表日	平成24年9月27日(2012.9.27)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2010/054495
(87) 國際公開番号	W02010/115866
(87) 國際公開日	平成22年10月14日(2010.10.14)
審査請求日	平成25年3月5日(2013.3.5)
(31) 優先権主張番号	61/212,004
(32) 優先日	平成21年4月6日(2009.4.6)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/186,075
(32) 優先日	平成21年6月11日(2009.6.11)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	509091848 ノヴォ ノルディスク アー/エス デンマーク、ハウスウェア ディーケー 2880, ノヴォ アレー
(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(72) 発明者	ヘンリク・ウスタゴー デンマーク・DK-3650・ウルストウ ゲ・ライナスヴァイ・4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板への第VIII因子タンパク質の標的送達

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号1および配列番号3からなるリストから選択されるアミノ酸配列の成熟部分と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含み、血小板に特異的な分子と共有結合しているFVIII分子であって、前記血小板に特異的な分子が、血小板凝集を阻害しないGPⅠb/Ⅲa抗体であるFVIII分子。

【請求項 2】

vWF結合能力が低下している、請求項1に記載のFVIII分子。

【請求項 3】

融合タンパク質である、請求項1または2に記載のFVIII分子。

10

【請求項 4】

GPⅠb/Ⅲa抗体がリンカーを介してFVIIIと共有結合している、請求項1または2に記載のFVIII分子。

【請求項 5】

リンカーがFVIII分子上のN-連結またはO-連結グリカンを含む、請求項4に記載のFVIII分子。

【請求項 6】

グリカンがBドメイン中に配置されている、請求項5に記載のFVIII分子。

【請求項 7】

GPⅠb/Ⅲa抗体が、Bドメインが切断された第VIII因子分子のBドメインと融合している

20

、請求項3に記載のFVIII分子。

【請求項8】

FVIII分子のa3ドメインがGPIIb/IIIa抗体で置き換えられている、請求項3に記載のFVIII分子。

【請求項9】

FVIII分子が、配列番号3に記載の配列を含み、リンカーが、Bドメイン中に配置されたO-連結グリカンを含む、請求項6に記載のFVIII分子。

【請求項10】

請求項7または8に記載のFVIII分子をコードしている核酸。

【請求項11】

請求項10に記載の核酸を含む宿主細胞。

10

【請求項12】

請求項10に記載の核酸を請求項11に記載の宿主細胞中で発現させることを含む、FVIII分子を生成する方法。

【請求項13】

FVIII分子とGPIIb/IIIa抗体とのコンジュゲーションを含む、請求項4、5、6、および9のいずれか一項に記載のFVIII分子を生成する方法。

【請求項14】

請求項1から9のいずれか一項に記載のFVIII分子を含む医薬組成物。

【請求項15】

20

血友病Aを処置するための、請求項14に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書中に記載の本発明は、ヒト第VIII因子と有意な同一性(相同性)を有する少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは生物活性のあるその一部分、関連分子(そのようなポリペプチドをコードしている核酸など)、そのようなポリペプチドを含む組成物(薬剤配合物など)、ならびにそのようなポリペプチドおよび関連生体分子を作製および使用する方法に関する。

【背景技術】

30

【0002】

凝固第VIII因子(「第VIII因子」または「FVIII」)は重要な凝固因子である。正常なFVIIIの欠如は、遺伝性の出血性障害である血友病Aを引き起こす。第VIII因子は血液凝固の内因経路に関与している。具体的には、第VIII因子は、(Ca²⁺およびリン脂質の存在下)第X因子を活性第Xa因子へと変換する第IXa因子の補因子である。

【0003】

第VIII因子の遺伝子は2つの選択的スプライシングされた転写物を生じる。転写変異体1は、血漿中で循環し、非共有的複合体中でフォンウィルブランド因子(「vWF」)と会合する、大きな糖タンパク質であるアイソフォームaをコードしている。このタンパク質は複数の切断事象を受ける。転写変異体2は、第VIIIc因子のリン脂質結合ドメインから主になる、推定上の小さなタンパク質であるアイソフォームbをコードしている。この結合ドメインは血液凝固活性に重要である。FVIIIの構造は周知である(たとえばThompson、Semin Thromb Hemost. 2003年2月;29(1):11~22頁を参照)。

40

【0004】

トロンビン(第IIa因子)によって活性化された際、第VIIIa因子(FVIIIa)はFVIII:vWFの複合体から解離して第IXa因子と相互作用し、さらなるトロンビンの產生をもたらす十分に特徴づけられた一連の事象を引き起こす。トロンビンはフィブリノーゲンをフィブリンへと切断し、これは、重合および架橋結合して血餅となる(第XIII因子を使用)。FVIIIaは、このプロセスにおいて活性タンパク質C(「aPC」)および第IXa因子によってタンパク質分解により失活し、血流から素早くクリアランスされる。

50

【0005】

止血を修復するために、献血液の血漿から濃縮したFVIIIまたは組換えFVIIIを血友病患者に与えることができる。したがって、FVIIIは抗血友病因子としても知られる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】WO2009140598号

【特許文献2】EP0319315号

【特許文献3】米国特許第5,932,462号

【特許文献4】米国特許第5,629,384号

10

【特許文献5】WO0331464号

【特許文献6】国際公開公報WO2006/013202 A2号

【特許文献7】国際特許出願WO206/015879 A1号

【特許文献8】米国特許公開第20030236190号

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Thompson、Semin Thromb Hemost. 2003年2月;29(1):11~22頁

【非特許文献2】Creighton(1984年)、PROTEINS:STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES (第2版、1993年)、W. H. Freeman and Company

20

【非特許文献3】Mikaelssonら、Semin Hematol.、2001年4月;38(2補遺4):13~23頁

【非特許文献4】D'Souzaら、Science、242:91~93頁、1988年

【非特許文献5】D'Souzaら、JBC、265:6;3440~46頁、1990年

【非特許文献6】Kamataら、JBC、271:18610~15頁、1996年

【非特許文献7】Tozerら、Blood、93:918~24頁、1999年

【非特許文献8】Basaniら、Blood、95:180~88頁、2000年

【非特許文献9】Kounsら、Blood、15:78(12):3215~23頁、1991年

【非特許文献10】Born、Nature、194:927~29頁、1962年

【非特許文献11】Wardら、(1989年)、Nature、341:544~546頁

【非特許文献12】Birdら(1988年)、Science、242:423~426頁

30

【非特許文献13】Hustonら(1988年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85:5879~5883頁

【非特許文献14】Holliger, P.、ら(1993年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444~6448頁

【非特許文献15】Poljak, R.J.、ら(1994年)、Structure、2:1121~1123頁

【非特許文献16】Zhangら、Protein Exp. Purif. (2004年)、36、292~299頁

【非特許文献17】Lavigne-Lissaldeら、THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS、第98巻、第1号、138~147頁、2007年

【非特許文献18】Thim L、Vandahl B、Karlsson J、Klausen NK、Pedersen J、Krogh T N、Kjalke M、Petersen JM、Johnsen LB、Bolt G、Norby PL、Steenstrup TD (2009年)、Purification and characterization of a new recombinant factor VIII (N8)、Haemophilia、16:349~59頁

40

【非特許文献19】Kurfurst, M.M.、Analytical Biochemistry、200、244~248頁、1992年

【非特許文献20】J. Am. Chem. Soc、2007年、129、8400~8401頁

【非特許文献21】Biotechnol. Appl. Biochem.、2005年、41、225~231頁

【非特許文献22】Collerら、JCI、72(1):325~38頁、1983年

【非特許文献23】G.Vergara、Theriogenology、1997年;47、1245~1252頁

【非特許文献24】Shiら(Blood、2008年;112、2713~2721頁)

【非特許文献25】Holmbergら、J Thromb Haemost、2009年;7:1517~22頁

【非特許文献26】MollerおよびTranholm、Haemophilia、2010年;16、e216~e222頁

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

FVIIIはin vivoで約10~12時間の循環半減期を有し、したがって、治療的/予防的な静脈内IV FVIII輸注の頻度を減らすために、延長された半減期を有するFVIII類似体を提供することが非常に望ましい。

【0009】

WO2009140598号は、FVIIIおよびGPIIb/IIIa特異的抗体を含むハイブリッド分子が含まれる概念を開示している。しかし、この概念はGPIIb/IIIa受容体がフィブリノーゲンと結合する能力の阻害をもたらす場合があり、したがって、そのようなハイブリッドFVIII分子を投与した際に、初期血餅を形成する能力が減少する。したがって、当分野では、高い親和性で血小板と結合する能力を有する、生物活性のある第VIII因子分子の必要性が存在する。さらに、当分野では、血小板が凝集することで初期血餅を形成する能力を本質的に保持したままで、血小板と結合する能力を有する、生物活性のある第VIII因子分子の必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、非阻害性GPIIb/IIIa特異的抗体を含む分子、たとえば第VIII因子(FVIII)分子の標的化、および関連分子、組成物、そのような分子を作製する方法、ならびにそのような分子や組成物を使用する方法(たとえば血友病Aの処置または調節において)を提供する。

【0011】

本発明のこれらおよび他の態様、特長、および利点を、本明細書中により完全に記載する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】修飾FVIII分子を得るために、scFvをFVIIIまたはFVIII類似体のアミノ酸配列に化学的に付着させ得る、またはそれと共にシスでポリペプチドの一部として発現させ得る潜在的な方法を例示する図である。そのような分子を生成するための糖コンジュゲーション、化学的コンジュゲーション、および融合タンパク質の手法を具体的に示す。適切な場合は、この方法を同様に使用して本発明の他のFVIII分子を作製することができる。

【図2】血小板の凝集を例示する図である。バーは、F8-500 AP3-LC-HC scFV- a3(AP3-N8)またはReoPro(登録商標)のどちらかで事前に処理した、SFLLRN(10 μM)で活性化した血小板における凝集を示す。データは、SFLLRN(10 μM)単独を100%として設定し、二つ組の決定の平均 ± semとして示す。

【図3】最終標的化ベクターを例示する図である。

【図4】用量依存的な様式のAP3-N8 2097(A)およびAP3-N8 MZ1(C)とヒト血小板との結合を例示する図である。どちらの化合物の結合も、過剰のAP3-LC-HC scFV-FLAG(配列番号22)でほぼ完全に競合させることができる。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明のコンテキストでは、第VIII因子タンパク質(またはFVIIIタンパク質)は、ヒト第VIII因子(配列番号1)もしくはその成熟部分(すなわちその残基20~2351)から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を示すアミノ酸配列を含むタンパク質、またはトロンビンで活性化されたその一部分、もしくは以下に示すそのBドメイン欠失/切断型である。

【0014】

第VIII因子(配列番号1)

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRD

10

20

30

40

50

AASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL I GCHRKSJVWHV I GMGTTPEVHS I FLEGHTFLVRNHRQASLE I SP I TFLTAQTLLM DLGQFLFCH I SSHQHDGMEAYVKVDCPPEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSF I Q I RSVAKKHPKT WWHY I AAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQR I GRKYKKVRFMAYTDETFKTREA I QHESG I LGPLLYGEVGDTL L I I FKNQASRPYN I YPHG I TDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFP I LPGE I FKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMER DLASGL I GPLLI I CYKESVDQRGNQ I MSDKRNV I LFSVFDENRSWYLTEN I QRFLPNPAGVQLEDPEFQASN I MHS I NGYV FDSLQLSVCLHEVAYWY I LS I GAQTDLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSENPGW I LGCHNSDFRNRG MTALLKVSCKNTGDYYEDSYED I SAYLLSKNNA I EPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATT I PEND I EKTDPWFAHRTPMPK I QNVSSDLLMQLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGA I DSNNSLSEMTHFRPQLHSGDMVFTPESGLQLRLNE KLGTTAATELKLDKVSSTSNNL I ST I PSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEE NNDSKLLESGLMNSQESSWGNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVS I SLLKTNKTSNNSATNRKTH I DGPSLL I ENSPSVWQNI I LESDTEFKKVTP I HDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQQKKEGP I PPDAQNPDMSSFKMLF LPESARW I QRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEQNLFSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSRNLFNTLNDN LHENNTHNQEKK I QEE I EKKETL I QENVVLPQ I HVTGKKNFMKNLFLSTRQNVEGSDAYAPVLQDFRSLNDSTNRT KKHTAHFSKKGEENLEGLGNQTKQ I VEKYACTTR I SPNTSQQNFTQRSKRALQFRLPLEETELEKR I I VDDTSTQWS KNMKHLTPSTLTQ I DYNEKEKGAI TQSPLSDCLTRSHS I PQANRSPLP I AKVSSFPS I RP I YLTRLFQDNSSHLPAASY RKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLA I LTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVH I Y QKDLFPTETSNGSPGHLVLEGSLLQGTEGA I KWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQ I PKEEKW SQEKSPEKTAFKKKDT I LSLNACESNHA I AA I NEGQNKP I EVTWAKQGRTERLCSQNPPVLRHQRE I TRTTLQSDQEE I DYDDT I SVEMKKEDFD I YDEDENQSPRSFQKKTRHYF I AAVERLWDYGMSSSPHVRNRAQSGSVPQFKVVFQEFTDG SFTQPLYRGELEHGLLGPY I RAEVEDN I MVTFRNQASRPYSFYSSL I SYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQH HMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSG I GPLLVCHTNLNAHGRQVTQEFALFFT I FDETKSWYFTENMERNCRPCN I QMEDPTFKENYRFHA I NGY I MDTLPGLVMAQDQR I RWYLLSMGSNEN I HS I HSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPG VFETVEMPLSKAG I WRVECL I GEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGH I RDFQ I TASGQYQGWAPKLRHLHSGS I NA WSTKEPFSW I KVDLLAPM I I HG I KTQGARQKFSSLY I SQF I I MSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSG I KHN I FN PP I I ARY I RLHPTHYS I RSTLRMELMGCDLNCSMPLGMESKA I SDAQ I TASSYFTNMFTWSPSKARLHLQGRSNAWRP QVNNPKEWLQDFQKTMKVTGVTQGVKSLLTSMYVKEFL I SSSQDGHQWTLLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPLPLTRYLR I HPQSWH 【 0 0 1 5 】

第VIII因子B- ドメイン欠失 (配列番号2)

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRYYLGAVELSDYMQSDLGELPVDFPFPVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFN I AKPRPPWMGLLGPT I QAEVYDTVV I TLKNMASHPVLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGSHTYVWQVL KENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGL I GALLVCREGSLAKEKTQTLHKF I LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRD AASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL I GCHRKSJVWHV I GMGTTPEVHS I FLEGHTFLVRNHRQASLE I SP I TFLTAQTLLM DLGQFLFCH I SSHQHDGMEAYVKVDCPPEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSF I Q I RSVAKKHPKT WWHY I AAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQR I GRKYKKVRFMAYTDETFKTREA I QHESG I LGPLLYGEVGDTL L I I FKNQASRPYN I YPHG I TDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFP I LPGE I FKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMER DLASGL I GPLLI I CYKESVDQRGNQ I MSDKRNV I LFSVFDENRSWYLTEN I QRFLPNPAGVQLEDPEFQASN I MHS I NGYV FDSLQLSVCLHEVAYWY I LS I GAQTDLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSENPGW I LGCHNSDFRNRG MTALLKVSCKNTGDYYEDSYED I SAYLLSKNNA I EPRSFSQNPVLRHQRE I TRTTLQSDQEE I DYDDT I SVEMKKEDFD I YDEDENQSPRSFQKKTRHYF I AAVERLWDYGMSSSPHVRNRAQSGSVPQFKVVFQEFTDG SFTQPLYRGELEHGLLGPY I RAEVEDN I MVTFRNQASRPYSFYSSL I SYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAW AYFSDVDLEKDVHSG I GPLLVCHTNLNAHGRQVTQEFALFFT I FDETKSWYFTENMERNCRAPCN I QMEDPTFKEN YRFHA I NGY I MDTLPGLVMAQDQR I RWYLLSMGSNEN I HS I HSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGFETVEMPLSKAG I WRVECL I GEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGH I RDFQ I TASGQYQGWAPKLRHLHSGS I NA WSTKEPFSW I KVDLLAPM I I HG I KTQGARQKFSSLY I SQF I I MSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSG I KHN I FNPP I I ARY I RLHPTHYS I RSTLRMELMGCDLNCSMPLGMESKA I SDAQ I TASSYFTNMFTWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQDFQ KTMKVTGVTQGVKSLLTSMYVKEFL I SSSQDGHQWTLLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPLLLTRYLR I HPQSWH Q I ALRMEVLGCEAQDLY 【 0 0 1 6 】

第VIII因子B- ドメイン切断 (「N8」) (配列番号3)

10

20

30

40

50

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLGPTIQADEVYDTVVITLKNMASHPVLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVL
 KENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLMDLGQFLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNPSFIQIRSVAKKHPKT
 WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGLGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGTDRVPLYSRRLPKGVKHLKDFPLPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMER
 DLASGLIGPLLI CYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYV
 FDSLQLSVCLHEVAYWYILS1GAQTDLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRM
 MTALLKVSSCDKNTGDDYEDSYEDISAYLLSKNNAIPEPRSFSQNSRHSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKVVFQEFTDGSFTQPLY
 RGELNEHLGLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEM
 LPSKAGIWRVECLIIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMAASGHIRDFQITASGQYQGWAPKALARLYSGSINAWSSTKEPFSWIKV DLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNFNPPIIARY
 IRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPLLLTRYLIRHQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

【0017】

10

より具体的な態様では、本発明は、配列番号1もしくは成熟部分に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%同一性を示す標的化FVIII誘導体、またはトロンビンで活性化されたその一部分、もしくはそのBドメイン欠失/切断型に関する。

【0018】

20

さらにより具体的な態様では、本発明は、配列番号1、配列番号2、または成熟部分に対して少なくとも約90%同一性(少なくとも約93%同一性など)を示す標的化FVIII誘導体、またはトロンビンで活性化されたその一部分、もしくはそのBドメイン欠失/切断型に関する。

【0019】

30

別の態様では、本発明は、配列番号1または成熟部分に対して少なくとも約95%同一性を示す標的化FVIII誘導体、またはトロンビンで活性化されたその一部分を提供する。より具体的な態様では、本発明は、配列番号1またはその成熟部分に対して少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約98.5%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または少なくとも約99.7%、少なくとも約99.8%、またはさらには少なくとも約99.9%同一性を示す標的化FVIII誘導体、またはトロンビンで活性化されたその一部分、もしくはそのBドメイン欠失/切断型を提供する。言い換えると、一態様では、本発明は、少なくとも1個、典型的には少なくとも2~3個、しばしば少なくとも1~5個、一般的には少なくとも1~20個(1~15、1~12、1~10、1~7、1~3、2~20、2~15、2~12、2~10、2~7、2~5、3~20、3~15、3~12、3~10、3~7、3~5、4~20、4~15、4~12、4~10、4~7、5~20、5~15、5~12、5~10、または5~7個など)のアミノ酸残基が、配列番号1または成熟部分に対して欠失、挿入、および/または置換されているアミノ酸配列、またはトロンビンで活性化されたその一部分、もしくはそのBドメイン欠失/切断部分を含むことによって特徴づけられた、標的化FVIII誘導体を提供する。

【0020】

40

一般的に、FVII「類似体」配列中の置換の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、たとえば約75%以上、約80%以上、約85%以上、約90%以上、またはさらには約95%以上(少なくとも約97%、98%、99%、99.3%、99.5%、99.7%、99.8%など)を「保存的置換」として特徴づけることができる。保存的置換は、以下の3つのアミノ酸分類表のうちの1つまたは複数において反映されているアミノ酸クラス内の置換によつ

50

て定義することができる。

【0021】

【表1】

Table 1・保存的置換のアミノ酸残基クラス

アミノ酸クラス	アミノ酸残基
酸性残基	ASP および GLU
塩基性残基	LYS, ARG, および HIS
親水性非荷電残基	SER, THR, ASN, および GLN
脂肪族非荷電残基	GLY, ALA, VAL, LEU, および ILE
非極性非荷電残基	CYS, MET, および PRO
芳香族残基	PHE, TYR, および TRP

10

【0022】

【表2】

Table 2・代替の保存的アミノ酸残基置換群

1	アラニン (A)	セリン (S)	スレオニン (T)
2	アスパラギン酸 (D)	グルタミン酸 (E)	
3	アスパラギン (N)	グルタミン (Q)	
4	アルギニン (R)	リシン (K)	
5	イソロイシン (I)	ロイシン (L)	メチオニン (M)
6	フェニルアラニン (F)	チロシン (Y)	トリプトファン (W)

20

【0023】

【表3】

Table 3・さらなる代替のアミノ酸残基の物理的および機能的分類

アルコール基含有残基	S および T
脂肪族残基	I, L, V, および M
シクロアルケニル会合残基	F, H, W, および Y
疎水性残基	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, および Y
負荷電残基	D および E
極性残基	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, および T
小残基	A, C, D, G, N, P, S, T, および V
極小残基	A, G, および S
ターン形成に関与する残基	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, および T
柔軟な残基	E, Q, T, K, S, G, P, D, E, および R

30

【0024】

40

さらなる保存的アミノ酸残基置換の分類には、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリン、およびアスパラギン-グルタミンが含まれる。また、さらなるアミノ酸の群を、たとえばCreighton(1984年)、PROTEINS:STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES (第2版、1993年)、W. H. Freeman and Companyに記載の原理を用いて形成することもできる。一部の例では、そのような特長のうちの2つ以上に基づいて置換をさらに特徴づけることが有用な場合がある(たとえば、Thr残基などの「小さな極性」残基での置換が、適切なコンテキストにおいて非常に保存的な置換を表す場合がある)。

【0025】

用語「標的とした」、「標的化」などとは、FVIII分子が、野生型FVIIIよりも高い親和

50

性および/もしくは結合力で1つもしくは複数の生体分子(典型的には他のタンパク質、しばしば細胞受容体)および/もしくは細胞と結合する(または典型的には野生型FVIIIによって結合されないものと結合する)ことを示すために使用する。既に言及したように、本発明によって提供される標的化分子は、対応する改変していないタンパク質(通常はアミノ酸配列(標的化ドメイン)または分子(標的化部分)であり、「標的化因子」を欠く以外は標的化FVIIIタンパク質と同一であるタンパク質)と比較して、増加した安定性を示すことができる。具体的な態様では、FVIII1つまたは複数の生物活性(たとえば第IX因子結合)が顕著に消失していない、これまたは他の望ましい/改変された特性を示す標的化分子を提供する。典型的には、そのような活性の阻害の量は、約40%以下、約30%以下、約25%以下、約20%以下、約15%以下、約10%以下、約7%以下、約5%以下、または約3%以下である。FVIII 10 の生物活性のアッセイは当分野で知られている(たとえばMikaelssonら、Semin Hematol.、2001年4月;38(2補遺4):13~23頁を参照)。

【0026】

本明細書中、用語「vWFの結合する能力の低下」には、vWFと結合する能力が少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは約100%減少している第VIII因子変異体が包含されることを意味する。FVIIIとvWFとの結合は、ELISA様アッセイによって、または表面プラズモン共鳴を用いて固定したvWFとの直接結合として測定し得る。EP031 9315号に開示されているように、vWFとの結合を司っている第VIII因子中の領域は、残基1 670~1684にまたがる領域である。この領域に関与する第VIII因子の点および/または欠失の変異が、vWFと結合する能力を改変することが想定される。本発明による特に好ましい点突然変異の例には、Y1680F、Y1680R、Y1680N、Y1680C、およびE1682Tの点突然変異を含む変異体が含まれる。 20

【0027】

側基:本発明による第VIII因子分子は、非阻害性GPⅪb/Ⅺa抗体ではない側基とコンジュゲートさせ得る。この文脈では、「側基」とは、第VIII因子分子の天然の一部ではない任意の部分の共有結合として理解されるべきである。好ましくは、前記側鎖は、延長された循環半減期を有する第VIII因子分子を提供する。側鎖のコンジュゲーションは、融合タンパク質、ならびに/または化学的コンジュゲーションおよび/もしくは酵素的コンジュゲーションのプロセスの形態であり得る。本発明による側鎖は、典型的には、親水性ポリマー、脂肪酸およびその誘導体(場合によっては「アルブミン結合剤」と呼ぶ)、アルブミン、トランスフェリン、エラスチン様ペプチド、単離したFcドメイン、vWFの断片、抗体および抗原結合配列を含むその断片からなるリストのうちの1つまたは複数から選択される。適切な抗体の例には、比較的長い循環半減期でたとえば赤血球、血小板、フィブリノゲンなどの血液構成成分と結合する、または血管壁、たとえばコラーゲンと結合する能力を有する、抗体またはその断片が含まれる。 30

【0028】

理論に束縛されずに、正常なvWF結合能力を有する第VIII因子分子に側基を付着させるよりも低下したvWF結合能力を有する第VIII因子分子に側基を付着させた方がより効率的に機能する理由は、側基の相対的な大きさが、大きな第VIII因子/vWFの複合体中で比較的小さいからであると想定される。比較的大きな側基が、遊離第VIII因子をクリアランスから遮蔽することにおいてより効率的に機能すると仮定されている。さらに、FVIIIの半減期はvWFのそれに関連すると仮定されている。vWFと結合する能力が低下したFVIII分子は、通常はvWFによって遮蔽されている、曝露されたクリアランスエピトープを有する可能性がとても高い。したがって、側基を付着させることによって、この「クリアランス遮蔽」を回復できると仮定されている。他の事例では、たとえば抗体断片などの側基の付着は、たとえば、分子を、比較的長い循環半減期を有するタンパク質、細胞、または血小板に付着させることによって機能し得る。本発明によるFVIII分子に関連して、そのような分子は、分子のFVIII部分がvWFと結合する能力が低下している場合に、より効率的な様式で血小板に対してさらに標的化し得る。 40 50

【0029】

親水性ポリマー: 本発明による修飾基/親水性ポリマーは、好ましくは天然に存在しない。一例では、「天然に存在しない修飾基」とは、少なくとも1つのポリマー部分が天然に存在しない、ポリマー修飾基である。別の例では、天然に存在しない修飾基は修飾炭水化物である。修飾基の官能化の位置は、「修飾糖」がポリペプチドに酵素的に付加されることを妨げないように選択する。また、「修飾糖」とは、修飾基で官能化されており、グルコシルトランスフェラーゼなどの天然または修飾された酵素の基質である、任意のグリコシル模倣部分もいう。

【0030】

ポリペプチドに付加されたポリマー修飾基は、そのようなポリペプチドの特性、たとえば、身体におけるその生体利用度、生物活性またはその半減期を変更することができる。本発明による例示的なポリマーには、直鎖状または分枝状であることができる水溶性ポリマーが含まれ、ポリ(アルキレングリコール)およびその誘導体などの、1つまたは複数の独立して選択されたポリマー部分が含まれることができる。本発明によるポリマー修飾基には、水溶性ポリマー、たとえばポリ(エチレングリコール)およびその誘導体(PEG、m-PEG)、ポリ(プロピレングリコール)およびその誘導体(PPG、m-PPG)などが含まれ得る。

【0031】

用語「水溶性」とは、ある程度の検出可能な水溶性を有する部分をいう。水溶性を検出および/または定量する方法は当分野で周知である。本発明による例示的な水溶性ポリマーには、ペプチド、糖類、ポリ(エーテル)、ポリ(アミン)、ポリ(カルボン酸)などが含まれる。ペプチドは混合配列を有することができ、単一のアミノ酸から構成されることができ、たとえばポリ(リシン)である。例示的な多糖はポリ(シアル酸)である。例示的なポリ(エーテル)は、ポリ(エチレングリコール)、たとえばm-PEGである。ポリ(エチレンイミン)が例示的なポリアミンであり、ポリ(アクリル)酸が代表的なポリ(カルボン酸)である。

【0032】

本発明による水溶性ポリマーのポリマー主鎖は、ポリ(エチレングリコール)(すなわちPEG)ができる。本発明に関連した用語PEGには、アルコキシPEG、二官能性PEG、複数アーム型PEG、フォーク型PEG、分枝状PEG、懸垂PEG(すなわち、1つもしくは複数の官能基がポリマー主鎖から懸垂しているPEGもしくは関連ポリマー)、またはそれ中に分解性の連結を有するPEGを含めた、その任意の形態のポリ(エチレングリコール)が含まれる。

【0033】

ポリマー主鎖は直鎖状または分枝状であることができる。分枝状ポリマー主鎖が一般に当分野で知られている。典型的には、分枝状ポリマーは、中心枝コア部分および中心枝コアに連結した複数の直鎖状ポリマー鎖を有する。PEGは、一般的に、酸化エチレンをグリセロール、ペニタエリスリトールおよびソルビトールなどの様々なポリオールに付加することによって調製することができる、分枝状形態で使用する。また、中心枝部分は、リシンまたはシスティンなどのいくつかのアミノ酸から誘導することもできる。一例では、分枝状ポリ(エチレングリコール)は、R(-PEG-OH)_m[式中、Rは、グリセロールまたはペニタエリスリトールなどのコア部分を表し、mは、アームの数を表す]の一般形態として表すことができる。また、複数アーム型PEG分子、たとえば、その全体が本明細書中に参考として組み込まれている米国特許第5,932,462号に記載されているものも、ポリマー主鎖として使用することができる。

【0034】

また、多くの他のポリマーも本発明に適している。非ペプチド性かつ水溶性であるポリマー主鎖が、本発明において特に有用である。適切なポリマーの例には、それだけには限定されないが、他のポリ(アルキレングリコール)、たとえば、ポリ(プロピレングリコール)('PPG')、エチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマーなど、ポリ(オキシエチル化ポリオール)、ポリ(オレフィンアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(ヒドロキシプロピルメタクリルアミド)、ポリ([アルファ]-ヒドロキシ酸)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリ(N-アクリロイルモルホリ

10

20

30

40

50

ン)、たとえば、その全体が本明細書中に参考として組み込まれている米国特許第5,629,384号に記載されているもの、ならびにそのコポリマー、ターポリマー、およびその混合物が含まれる。

【0035】

ポリマー主鎖のそれぞれの鎖の分子量は変動することができるが、典型的には、これは約100Da～約160,000Da、たとえば約5,000Da～約100,000Daなどの範囲である。より具体的には、本発明によるそれぞれのコンジュゲートした親水性ポリマーの大きさは、約500Da～約80,000Da、たとえば、約1000Da～約80,000Da、約2000Da～約70,000Da、約5000～約70,000Da、約5000～約60,000Da、約10,000～約70,000Da、約20,000～約60,000Da、約30,000～約60,000Da、約30,000～約50,000Da、または約30,000～約40,000Daなどで変動し得る。これらの大ささは、正確な測定値ではなく推定値を表すことを理解されたい。好ましい実施形態によれば、本発明による分子は、たとえば、たとえば10,000、40,000、または80,000Da+/-約5000、約4000、約3000、約2000、約1000Daの大きさのPEGなどの、親水性ポリマーの異種集団とコンジュゲートしている。

【0036】

アルブミン結合剤コンジュゲート/側基

そのようなタンパク質のin vivo特性は、アルブミン結合側鎖を使用することによって改善できることが知られている。そのような側鎖、またはアルブミン結合剤は、投与の前にタンパク質に付着させることができ、また、たとえば、in vivoでタンパク質を安定化させるか、またはタンパク質のin vivo半減期を改善もしくは延長させることができる。

【0037】

それにより、アルブミン結合剤は血流中の誘導体の循環を促進し得る。ペプチド誘導体とアルブミンとの複合体は、活性薬剤成分を放出するためにゆっくりとしか崩壊しないため、アルブミン結合剤は、それと結合しているタンパク質の作用時間を延長または遅延させる効果を有し得る。したがって、好ましい置換基、または側鎖を、全体としてアルブミン結合部分と呼び得る。

【0038】

アルブミン結合剤(アルブミン結合部分)は、アルブミン結合、それにより血流中の循環の遅延に特に関連がある部分を含む場合があり、したがって、この部分は遅延部分と呼ばれる得る。遅延部分は、好ましくは、ペプチドとのその付着点と比較して、アルブミン結合部分の反対の末端またはその付近に位置する。

【0039】

好ましい実施形態では、アルブミン結合剤は、アルブミンと非共有的複合体を形成することができる側鎖である、またはそれを含む。アルブミン結合剤は、非共有的および/または可逆的にアルブミンと結合し得る。アルブミン結合剤は、アルブミンと特異的に結合し得る。以下に記載の方法から明らかなように、アルブミン結合剤はシクロデキストリンと結合し得る。アルブミン結合剤は、非共有的および/または可逆的にシクロデキストリンと結合し得る。アルブミン結合剤は、シクロデキストリンと特異的に結合し得る。

【0040】

アルブミン結合部分の他の部分、すなわち遅延部分とペプチドとの付着点との間の部分は、リンカー部分、リンカー、スペーサーなどと呼ばれ得る。しかし、そのようなリンカーの存在は任意選択であり、したがって、アルブミン結合部分は遅延部分と同一であり得る。特定の実施形態では、アルブミン結合部分および/または遅延部分は、生理的pH(7.4)で親油性および/または負荷電である。

【0041】

アルブミン結合部分および/または遅延部分は、アルキル化、アシリ化、もしくはアミド形成などのコンジュゲーション化学によってペプチドのアミノ基と、または、エステル化、アルキル化、オキシム化などによってヒドロキシル基と共有結合し得る。好ましい実施形態では、アルブミン結合部分および/または遅延部分の活性エステルは、アミド結合の形成下でシアル酸残基またはシアル酸誘導体のアミノ基と共有結合する(このプロセス

10

20

30

40

50

はアシル化と呼ばれる)。別段に記述しない限りは、タンパク質のアシル化に言及する場合、これは、糖タンパク質上のシアル酸残基に連結したアミノ基であると理解される。

【0042】

本目的のために、用語「アルブミン結合部分」、「遅延部分」、および「リンカー」には、これらの分子の反応していないおよび反応した形態が含まれる。どちらの形態を意味するかは、その用語を使用するコンテキストから明らかである。アルブミン結合部分は、脂肪酸もしくは二価脂肪酸またはそのどちらかの誘導体であるか、またはそれを含み得る。用語「脂肪酸」とは、4~28個の炭素原子、たとえば16個の炭素原子を有する脂肪族モノカルボン酸をいう。これは、好ましくは非分枝状、および/またはさらには偶数であり、飽和または不飽和であり得る。用語「二価脂肪酸」とは、上記定義した脂肪酸であるが、オメガ位に追加のカルボン酸基を有するものである。したがって、二価脂肪酸はジカルボン酸である。命名法は当分野の通常どおりであり、たとえば、-COOHおよびHOOC-はカルボキシをいい、-C₆H₄-はフェニルをいい、-CO-および-OC-はカルボニル(O=C<)をいい、C₆H₅-O-はフェノキシをいう。好ましい実施形態では、リンカー部分は、存在する場合は、2~80個のC原子、好ましくは5~70個のC原子を有する。さらなる好ましい実施形態では、リンカー部分は、存在する場合は、4~20個のヘテロ原子、好ましくは2~40個のヘテロ原子、より好ましくは3~30個のヘテロ原子を有する。ヘテロ原子の特に好ましい例はNおよびO原子である。H原子はヘテロ原子ではない。

【0043】

別の実施形態では、リンカーは、少なくとも1つのOEG分子、および/もしくは少なくとも1つのグルタミン酸残基、またはむしろ対応する基を含む(OEGは、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸、すなわち、基:-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-を示す)。好ましい一実施形態では、リンカー部分は、アミド結合によってシアル酸残基と連結されたジカルボキシル残基を含む。好ましい例では、ジカルボキシル残基は、2~30個のC原子、好ましくは4~20個のC原子、より好ましくは4~10個のC原子を有する。さらなる好ましい例では、ジカルボキシル残基は、0~10個のヘテロ原子、好ましくは0~5個のヘテロ原子を有する。

【0044】

別の好ましい例では、リンカー部分は、アミノおよび遠位カルボキシル基をどちらも含み、その遠位カルボキシル基を介したアミド結合によってシアル酸残基と連結している基を含む。好ましい一実施形態では、この基はOEG基である。

【0045】

アミノ酸であるグルタミン酸(Glu)は、2つのカルボン酸基を含む。そのガンマ-カルボキシ基は、好ましくは、シアル酸残基もしくはシアル酸誘導体のアミノ基、または存在する場合はOEG分子のアミノ基、または存在する場合は別のGlu残基のアミノ基とアミド結合を形成するために使用する。たちかわって、Gluのアミノ基は、遅延部分のカルボキシ基、または存在する場合はOEG分子のカルボキシ基、または存在する場合は別のGluのガンマ-カルボキシ基とアミド結合を形成する。このようにしてGluを包含する方法は、しばしば手短に「ガンマ-Glu」と呼ばれる。

【0046】

N-およびO-連結オリゴ糖:N-グリカンおよびO-グリカンはどちらも、タンパク質を産生する細胞によってタンパク質に付着される。新生タンパク質がリボソームから小胞体へと移動される際に、細胞のN-グリコシル化機構は、アミノ酸鎖中のN-グリコシル化シグナル(N-X-S/Tモチーフ)を認識してグリコシル化する(Kielyら、1976年、Glabeら、1980年)。同様に、O-グリカンがアミノ酸鎖中の特異的O-グリコシル化部位に付着されるが、O-グリコシル化を始動するモチーフはN-グリコシル化シグナルよりもはるかに異種性が高く、アミノ酸配列中のO-グリコシル化部位を予測する我々の能力は未だ不十分である(Juleniusら、2004年)。ポリペプチドを様々なポリマー側基とコンジュゲートさせる方法は、たとえばWO0331464号に記載されている。

【0047】

「糖タンパク質IIb/IIIa」または「GPIIb/IIIa」とは、血小板上に見つかるインテグリ

10

20

30

40

50

ンである。これはフィブリノーゲンの受容体であり、血小板の活性化を援助する。複合体は、正常な血小板の凝集および内皮接着の必要なステップであるGPIIbとGPIIIaとのカルシウム依存性の会合を介して形成される。血小板の活性化は血小板GPIIb/IIIa受容体のコンホメーション変化をもたらし、これはフィブリノーゲンとの結合を誘導する。本発明による非阻害性GPIIb/IIIa抗体は、インテグリンの球状頭部中にリガンド結合ポケットを含むフィブリノーゲン認識部分に向けられているべきでない。GPIIb/IIIaのどの部分がRGD認識、したがってフィブリノーゲン結合に直接関与しているかは、完全には理解されていない。しかし、GPIIIaでは、アミノ酸109～171が相互作用に関与していることが記載しており(D'Souzaら、Science、242:91～93頁、1988年)、一方で、GPIIbでは、重要なアミノ酸はアミノ酸294～314(D'Souzaら、JBC、265:6;3440～46頁、1990年)またはアミノ酸145～224(Kamataら、JBC、271:18610～15頁、1996年、Tozerら、Blood、93:918～24頁、1999年、Basaniら、Blood、95:180～88頁、2000年)を含むと考えられている。本発明による非阻害性AP3抗体は、GPIIIaのアミノ酸348～421内に位置するエピトープと結合する能力を有し、その結果、フィブリノーゲン結合を妨害しないと考えられている(Kounsら、Blood、15:78(12):3215～23頁、1991年)。

【0048】

本明細書中で使用する用語「GPIIb/IIIa抗体」、「標的化因子」とは、GPIIb/IIIaインテグリンと特異的に結合する能力を有する免疫グロブリン分子およびその断片をいうことを意図する。前記GPIIb/IIIa抗体は、さらに、本質的に非阻害性の様式でGPIIb/IIIa受容体と結合し、これは、フィブリノーゲンと結合し、凝集して初期血餅を形成する血小板の能力が、GPIIb/IIIa抗体の結合の際に有意に減少しないことを意味する(たとえば、参照抗体の添加と比較して20%未満、15%、10%、5%、または1%の減少など)。血小板の凝集は、単離した血小板の懸濁液を通る光透過率の変化を監視することによって測定した。この方法は、最初に1960年代にGustav von Bornによって本質的に記載されており(Born、Nature、1962年)、今日では、血小板機能を評価するための最も使用されている方法の1つである。手短に述べると、この方法では、光が血小板の懸濁液を横断する能力を測定する。この血小板の懸濁液は、多血小板血漿または単離した血小板のどちらかであり得る。試料に光を当て、試料を通る光の量を測定する。活性化後、GPIIb/IIIaはそのコンホメーションをフィブリノーゲン高結合状態へと変化させ、フィブリノーゲンの存在下で血小板は凝集体を形成し始める。多くの単一の血小板よりも少数の大きな凝集体を有する試料の方が、より多くの光が通るため、これが光透過率の増加として記録される。

【0049】

完全長抗体は、ジスルフィド結合によって相互接続した4本のポリペプチド鎖、すなわち2本の重(H)鎖および2本の軽(L)鎖を含む。それぞれの重鎖は、重鎖可変領域(本明細書中でHCVRまたはVHと略記)および重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は3つのドメイン、すなわちCH1、CH2およびCH3からなる。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書中でLCVRまたはVLと略記)および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は1つのドメイン、すなわちCLからなる。VHおよびVL領域は、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変領域へとさらに分割することができ、これにはフレームワーク領域(FR)と呼ばれるより保存的な領域が散在している。それぞれのVHおよびVLは、3つのCDRおよび4つのFRから構成され、これらは、アミノ末端からカルボキシ末端にFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順に配置されている。したがって、抗体の定義内には、GPIIb/IIIaと特異的に結合する能力を保持する抗体の1つまたは複数の断片も存在する。

【0050】

抗体の抗原結合機能が完全長抗体の断片によって行われることができることが示されている。用語「抗体」内に包含される結合断片の例には、(i)Fab断片、すなわち、VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片、(ii)F(ab)2およびF(ab')2断片、すなわち、ヒンジ領域でジスルフィド橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片、(iii)VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iv)抗体の単一のアームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、(v)1つのVHドメインからなるdAb断片(Wardら、(1989年)、Nature、341:544～5

10

20

30

40

50

46頁)、ならびに(vi)単離した相補性決定領域(CDR)が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメイン、すなわちVLおよびVHは別々の遺伝子によってコードされているが、これらは、組換え方法を用いて、これらを单一のタンパク質鎖として作製し、VLおよびVH領域が対合して一価分子が形成されることを可能にする合成リンカーによって、結合させることができ(単鎖Fv(scFv)として知られ、たとえば、Birdら(1988年)、Science、242:423～426頁およびHustonら(1988年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85:5879～5883頁を参照)。そのような単鎖抗体も、用語「抗体」内に包含されることを意図する。

【0051】

二特異性抗体などの単鎖抗体の他の形態も包含される。二特異性抗体とは、VHおよびVLドメインが单一のポリペプチド鎖上で発現されるが、同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを用いることによって、それらのドメインは別の鎖の相補的ドメインと対合することが強要されて、2つの抗原結合部位が作製される、二価の二重特異性の抗体である(たとえば、Holliger, P.、ら(1993年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444～6448頁およびPoljak, R.J.、ら(1994年)、Structure、2:1121～1123頁を参照)。タンパク質Xは、(1)タンパク質X内の单一のペプチド鎖からなるペプチド抗原決定基、(2)それぞれのアミノ酸配列がタンパク質Xのポリペプチド配列に沿ってばらばらに位置する、複数の空間的に連続したペプチド鎖からなるコンホメーション抗原決定基、および(3)炭水化物基などの、翻訳後にタンパク質Xに共有結合される分子構造から全体的または部分的になる、翻訳後抗原決定基等を含む、1つまたは複数の抗原決定基を有し得ることが理解されよう。

10

【0052】

別の好ましい実施形態では、非阻害性GPIIb/IIIa抗体は、AP3、TabもしくはSZ22抗体またはその断片である。

【0053】

本明細書中で使用する用語「ヒト抗体」、「複数のヒト抗体」とは、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する抗体を意味する。本発明のヒト抗体には、たとえばCDR、特にCDR3中に、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基(たとえば、in vitroのランダムもしくは部位特異的突然変異誘発によってまたはin vivoの体細胞突然変異によって導入された突然変異)が含まれ得る。

30

【0054】

本明細書中で使用する用語「エピトープ」とは、抗体が結合する抗原上の任意の抗原決定基を意味する。エピトープ決定要因は、通常、アミノ酸または糖側鎖などの化学活性のある表面分子群からなり、通常、特異的な三次元構造特徴および特異的な荷電特徴を有する。

【0055】

一般に、GPIIb/IIIa抗体は、任意の様式でFVIIIまたはFVIII類似体のアミノ酸配列と結合することができる。したがって、たとえば、抗体は、FVIIIもしくはFVIII類似体のアミノ酸配列と共に「融合タンパク質」の一部として発現させるか、化学的および/もしくは酵素的方法を介して別々に付着させることができる。この後者の点において、抗体は、ソルターゼまたはカルボキシペプチダーゼ媒介性のアシル基転移によってFVIIIまたはFVIII類似体の配列と結合させることができる(関連する方法および原理の説明には、たとえば、Stennicke、国際公開公報WO2006/013202 A2号、Hoessら、国際特許出願WO206/015879 A1号、Zhangら、Protein Exp. Purif. (2004年)、36、292～299頁を参照)。

40

【0056】

一態様では、GPIIb/IIIa抗体は、たとえばBドメイン内への挿入によって、その下でFVIIまたはFVIII類似体の配列から切断できるように、FVIIIまたはFVIII類似体のアミノ酸配列と結合している(すなわち「操作されている」)。

【0057】

一態様では、本発明は、2つ以上のGPIIb/IIIa抗体を含む、または2つ以上の標的と特異

50

的に結合する単一の抗体を含む、FVIII分子を提供する。たとえば、一態様では、本発明は、二重特異性または多特異性の抗体または抗体断片を含むFVIII分子を提供する。一態様では、抗体は、抗体の1つの標的(二重特異性抗体の1つの「アーム」など)がFVIII分子内に含まれるBドメインの一部分と特異的に結合し、別の部分が血小板および/または巨核球と会合した標的と結合する、多特異性抗体分子(完全長抗体または抗体断片)である。Bドメインに特異的な抗体の例は当分野で知られている(たとえばLavigne-Lissaldeら、THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS、第98巻、第1号、138～147頁、2007年を参照)。

【0058】

前述の段落の態様から、非共有なタンパク質-タンパク質、タンパク質-部分、または部分-部分の相互作用を含めた、共有結合以外の他の適切な手段によって、GPIIb/IIIa抗体をFVIII分子のFVIIIまたはFVIII類似体のアミノ酸配列含有部分と会合させることができることが、明らかであろう。他の態様では、本明細書中の他の箇所に記載のように、GPIIb/IIIa抗体は、少なくとも1つの共有結合によってFVIIIまたはFVIII類似体のアミノ酸配列と結合している。一態様では、GPIIb/IIIa抗体は、アミド結合によってFVIIIまたはFVIII類似体のアミノ酸配列と結合している(たとえば、FVIIIアミノ酸配列とGPIIb/IIIa抗体との「融合タンパク質」の場合)。また、アミノ酸配列との結合は直接または間接であることができることも、明らかであろう。たとえば、結合は、化学的部分(その例は、たとえば米国特許公開第20030236190号に記載されている)または柔軟なGly(X)Ser(Y)リンカーなどのアミノ酸配列であり得る、適切なリンカーを含むことができる。別の態様では、連結は、アミノ酸配列のアミノ酸と会合しているグリカンを介したものである。たとえばグリカン自体を標的化分子と結合する要素で誘導体化する場合など、そのようなグリカン連結さえも追加の連結要素を含むことができる。

【0059】

本発明の様々な態様を任意の適切な様式で組み合わせることができることが、より一般的に理解されよう。したがって、たとえば、一面では、本発明は、FVIII分子のBドメインと結合する二重特異性GPIIb/IIIa抗体分子部分、およびBドメインがFVIII分子から切り取られ、標的化抗体分子部分を活性FVIII分子から放出することを可能にする切断部位(天然のトロンビン切断部位であり得る)を含む、FVIII分子を提供する。

【0060】

また、本発明のFVIII分子の生物学的活性も、日常的かつ既知の方法を用いて容易に試験することができる。たとえば、FVIII分子を休止血小板と共にインキュベートし、結合した血小板をたとえばゲル濾過または分画遠心分離によって精製し、FVIII分子をトロンビンで活性化することができ、その際、触媒効率および活性の実証は標準の発色アッセイ(たとえばCOATEST)または血餅アッセイによって可視化することができる。同様に、in vivo半減期の延長を標準の方法によって評価することができる。たとえば、血友病Aマウス(FVIIIヌル/ヌル)を、血餅アッセイ(FVIIIヌル/ヌルマウス)またはFX活性アッセイを含めたいくつかの異なる方法によって、特定のFVIII活性について監視することができる。本発明の方法は、ヒト第VIII因子を参照して記載したが、イヌ、マウスなどの他の哺乳動物からの第VIII因子タンパク質に適用できることに注目されたい。そのようなタンパク質は当分野で知られており、本発明の方法をそのようなFVIIIの相同体および他の種に適用することは、日常的な実験より多くのことを必要としない。

【0061】

本発明のFVIII分子は、関連する所望の生理的な効果のために対象または患者に典型的に投与するFVIIIの量と同様またはそれよりいくらか少ない用量で、提供することができる。一般に、当分野で知られているFVIII配合物も、本発明のFVIII分子を含む医薬組成物の調製に使用することができる。

【0062】

また、本発明は、本発明による融合タンパク質FVIII分子をコードしている核酸も提供する。核酸は、そのような分子をコードしている任意の適切な種類の核酸であることができる(たとえば、ホスホチオエート主鎖などの当業者に知られている様々な適切な修飾を

10

20

30

40

50

含み得るssDNA、dsDNA、またはRNA)。核酸には、プロモーター、エンハンサー、ポリA配列などの発現要素がさらに含まれ得る。また、そのような核酸は、任意の適切な種類のベクター(たとえば、アデノウイルス、ポックスウイルス、もしくはアデノ関連ウイルスベクターなどのウイルスベクターまたはプラスミドベクター)であり得る、耐性遺伝子などのさらなる要素を含む適切なベクター内に組み込むことができる。そのような核酸およびベクターは、典型的にはCOSまたはHEK細胞などの哺乳動物細胞である、発現および維持のための適切な宿主細胞内にさらに組み込むことができる。これおよび他の点において、本発明は、本発明のFVIII分子および本発明の潜在的なFVIII分子を生成する方法を提供する。

【0063】

10

好ましい実施形態では、本発明によるFVIII分子は、好ましくは位置1680にアミノ酸置換、たとえば以下の置換、すなわちY1680F、Y1680R、Y1680N、またはY1680Cのうちの1つを含むことによって、変調された、好ましくは低下したvWF結合能力をさらに有する。他の好ましい実施形態では、本発明によるFVIII分子は、たとえば、たとえばLPR、様々な受容体、他の凝固因子、細胞表面などとの結合の変調をもたらし得るアミノ酸突然変異を含む。

【0064】

さらに別の実施形態では、本発明による第VIII因子分子は、リンカーを介して非阻害性GPIIb/IIIa抗体と共有結合している。好ましくは、リンカーは、FVIII分子上のN-連結またはO-連結グリカンを含む。特に好ましい実施形態によれば、グリカンは、本発明による第VIII因子分子のBドメイン中に配置されている。Bドメインは、好ましくは切断されたBドメインである。

20

【0065】

特に好ましい実施形態では、非阻害性GPIIb/IIIa抗体およびFVIIIは、FVIIIのBドメインのO-連結グリカンと非阻害性GPIIb/IIIa抗体のN-連結グリカンとを接続するリンカーを介して連結されている。さらなる好ましい実施形態では、非阻害性GPIIb/IIIa抗体は完全長抗体である。好ましい実施形態では、この完全長抗体は、AP3-抗体、配列番号1および2、または配列番号1および3である。

【0066】

30

さらなる好ましい実施形態では、非阻害性GPIIb/IIIa抗体のN-連結グリカンは、抗体の定常領域の一部である。別の好ましい実施形態では、非阻害性GPIIb/IIIa抗体のN-連結グリカンは、抗体の軽鎖の一部である。リンカーはポリエチレングリコールポリマーを含み得る。

【0067】

さらなる好ましい実施形態では、非阻害性GPIIb/IIIa抗体およびFVIIIは、FVIIIのBドメインのインタクトなO-連結グリカンと非阻害性GPIIb/IIIa抗体のインタクトなN-連結グリカンとを接続するリンカーを介して連結されている。

【0068】

40

異なる好ましい実施形態では、非阻害性GPIIb/IIIa抗体およびFVIIIは、FVIIIのBドメインのO-連結グリカンと非阻害性GPIIb/IIIa抗体のN末端とを接続するリンカーを介して連結されている。好ましい実施形態では、非阻害性GPIIb/IIIa抗体はAP3 Fab断片である。

【0069】

別の好ましい実施形態では、非阻害性GPIIb/IIIa抗体およびFVIIIは、FVIIIのBドメインのO-連結グリカンと非阻害性GPIIb/IIIa抗体のCys残基とを接続するリンカーを介して連結されている。好ましい実施形態では、非阻害性GPIIb/IIIa抗体はAP3 ScFvである。

【0070】

さらに別の好ましい実施形態では、非阻害性GPIIb/IIIa抗体およびFVIIIは、FVIIIのBドメインのO-連結グリカンと非阻害性GPIIb/IIIa抗体の1つまたは複数のLys残基とを接続するリンカーを介して連結されている。好ましい実施形態では、非阻害性GPIIb/IIIa抗体

50

はAP3完全長抗体である(配列番号1および2または配列番号1および3)。

【0071】

さらに別の好ましい実施形態では、非阻害性GPIIb/IIIa抗体は、本発明によるBドメインが切断された第VIII因子分子のBドメインと融合している。したがって、本発明は、そのような分子をコードしている核酸およびベクター、ならびにそのような核酸および/またはベクターを含む宿主細胞も含む。

【0072】

さらに別の好ましい実施形態では、本発明によるVIII因子分子のA3ドメインを非阻害性GPIIb/IIIa抗体で置き換える。

【0073】

特に好ましい実施形態によれば、本発明によるVIII因子分子は、配列番号3に記載の配列を含み、リンカーは、Bドメイン中に配置されたO-連結グリカンを含む。

10

【0074】

本発明の別の態様は、本発明による核酸を発現させる方法を含む、本発明によるVIII因子分子を生成する方法に関する。あるいは、本発明による方法は、VIII因子分子とGPIIb/IIIa抗体とのコンジュゲーションを含む。

【0075】

さらに別の態様は、本発明によるVIII因子分子を含む医薬組成物に関する。

【0076】

さらに別の態様では、本発明は、血友病Aを処置するための医薬品を生成するための、本発明によるVIII因子分子の使用に関する。

20

【0077】

最終態様では、本発明は、治療有効量の、本発明による分子を宿主に投与することを含む、哺乳動物宿主において血友病Aを処置する方法に関する。

【0078】

構成

出版物、特許出願、および特許を含めた、本明細書中で言及するすべての参考文献は、本明細書中の他の箇所で行った特定の文書のすべての別々に提供した組み込みにかかわらず、その全体で、かつそれぞれの参考文献が個々にかつ具体的に参考として組み込まれていると示されてその全体が本明細書中に記載されている場合と同程度まで(法律によって許可される最大の程度まで)、本明細書中に参考として組み込まれている。

30

【0079】

本発明の説明のコンテキストにおける用語「a」および「an」および「the」ならびに類似の指示対象の使用は、本明細書中で別段に指定しない限り、またはコンテキストにより明らかに矛盾していない限りは、単数形および複数形をどちらもカバーすると解釈されるべきである。別段に記述しない限りは、本明細書中に提供するすべての正確な値は、対応する近似の値の代表例である(たとえば、特定の要因または測定値に関して提供したすべての正確な例示的な値は、必要に応じて「約」によって修飾して、対応する近似の測定値も提供するとみなすことができる)。

【0080】

40

別段に記述しない限り、またはコンテキストにより明らかに矛盾していない限りは、要素または複数の要素を参照して、「含む」、「有する」、「含める」、または「含有する」などの用語を用いた、本明細書中での本発明の任意の態様または実施形態の説明は、その特定の要素または複数の要素「からなる」、「から本質的になる」、または「実質的に含む」本発明の類似の態様または実施形態の支援を提供することを意図する(たとえば、別段に記述しない限り、またはコンテキストにより明らかに矛盾していない限りは、特定の要素を含むとして本明細書中に記載した組成物は、その要素からなる組成物を記載するものとしても理解されるべきである)。

【0081】

すべての表題および副題は本明細書中で利便上でのみ使用し、いかなる様式でも本発明

50

を制限すると解釈されるべきでない。本明細書中で提供する任意かつすべての例、または例示的な言葉(たとえば「など」)の使用は、本発明をより明確にすることのみを意図し、他の様式で主張しない限りは本発明の範囲の制限を提示しない。本明細書中のどの言葉も、特許請求していない任意の要素を本発明の実施に必須であると示すと解釈されるべきでない。

【0082】

本明細書中の特許文献の引用および組み込みは、利便上でのみ行い、そのような特許文献の有効性、特許性、および/または施行可能性のどのような観点も反映しない。本発明には、適用される法律によって許可される、本明細書中に含まれる特許請求の範囲および/または態様中に列挙した主題のすべての変形および均等物が含まれる。

10

【0083】

(実施例)

(実施例1)

FVIIIフレームワークおよび融合パートナー

本発明の融合タンパク質は、別のタンパク質からのポリペプチド(融合パートナー)と結合したFVIIIタンパク質(FVIII部分)からなる。

【0084】

融合タンパク質のFVIII部分は、FVIII活性を有する任意のタンパク質であることができる。FVIII部分は、FVIII Bドメインの部分がタンパク質から除去されている、Bドメイン欠失/切断(BDD)FVIIIタンパク質であることができる。F8-500はBDDヒトFVIIIタンパク質である。N末端から開始して、F8-500は、FVIIIシグナルペプチド(アミノ酸-19~-1)、次いでBドメインを有さないFVIII HC(アミノ酸1~740)、21個のアミノ酸のリンカー(SFSQNS RHPSQNPPVLKRHQR)(配列番号4)、およびFVIII LC(野生型ヒトFVIIIのアミノ酸1649~2332)からなる。21個のアミノ酸のリンカーの配列はFVIIIのBドメインに由来し、完全長野生型ヒトFVIIIのアミノ酸741~750および1638~1648からなる。

20

【0085】

F8-500-a3は、a3領域を有さないF8-500からなる。F8-500-a3では、野生型ヒトFVIIIのアミノ酸1647~1687がF8-500から排除されている。それにより、アミノ酸1645~1648のフューリン部位が破壊されている。しかし、合わせたフューリンおよびトロンビン部位がF8-500-a3中のR1645-H1646-P1688-R1689のアミノ酸ストレッチによって作製されている。a3領域はFVIIIとvWFとの結合に重要であり、したがって、vWFに対するF8-500-a3の親和性は野生型FVIIIと比較して低下している。

30

【0086】

F8-500-Hisは、HisタグがF8-500のリンカー内に挿入されたF8-500からなる。したがって、F8-500-Hisのリンカー配列はSFSQNSRHPSSHHSQNSQNLKRHQR(配列番号5)である。

【0087】

F8-500-a3-Hisは、a3領域を有さないが、HisタグがF8-500のリンカー内に挿入されたF8-500からなる。したがって、F8-500-a3-Hisでは、野生型ヒトFVIIIのアミノ酸1647~1687がF8-500から排除されており、リンカー配列はSFSQNSRHPSSHHSQNSQNLKRHQR(配列番号6)である。

40

【0088】

F8-500-Y1680FおよびF8-500-Y1680Cは、完全長野生型ヒトFVIIIのアミノ酸1680がチロシンからそれぞれフェニルアラニンおよびシステインへと変化したF8-500からなる。これらのアミノ酸の置き換えはどちらも、vWF因子に対するFVIIIの親和性を低下させる。さらに、Y1680Cのアミノ酸の置き換えは、遅延部分を融合タンパク質とコンジュゲートさせるためのハンドルとして使用することができる遊離システインを導入する。

【0089】

融合パートナーは、融合タンパク質のFVIII部分上のいくつかの位置と結合させることができる。融合パートナーを結合させるためのFVIII上の位置の非限定的な例は、FVIII HCとLCとの間のBドメインまたはBドメイン由来のリンカー中、a3の位置、およびFVIII LC

50

のC末端である。

【0090】

(実施例2)

FVIIIフレームワークおよび融合タンパク質をコードしている発現ベクターの構築

FVIIIと融合パートナーとの間の融合はすべて、融合パートナーを増幅するためのPCRを含む。制限部位を使用するPCRプライマーの末端に付加する。制限酵素は、融合パートナーのcDNAまたは合成DNAをFVIIIのcDNA内にクローニングするために使用する。

【0091】

F8-500のBドメイン中の融合は、aa750とaa1638との間で起こる。Bドメイン内またはそれに隣接する制限部位AvrII、Nrwl、AgeIおよびMluIを使用して、融合パートナーをコードしているDNAを挿入する。

10

【0092】

FVIII軽鎖のカルボキシ末端での融合には、F8-500をコードしている構築体を改変する。内部BamHI部位(aa604～606)を部位特異的突然変異誘発によって排除し、柔軟な(GGGS)₆リンクをコードしているDNAをコード領域の3'側に挿入する。BamHIおよびNotI部位の間へのC末端融合パートナーのクローニングを容易にするために、新しいBamHI部位を、リンクをコードしているDNAの3'末端に導入する。続いて、融合パートナーのDNAを挿入する。

【0093】

融合パートナーをコードしているDNAをa3位置に挿入し、したがってコードされるタンパク質中においてa3を融合パートナーで置き換えるために、SacII制限部位をa3のコード領域の3'側に導入する。したがって、融合パートナーをコードしているDNAは、AgeIおよびSacII部位の間またはAvrIIおよびSacII部位の間に挿入することによって、導入することができる。

20

【0094】

(実施例3)

完全長AP3 mIgG1 ab

抗GPIIa/IIIB抗体の重鎖および軽鎖の可変領域、AP3を、AP3抗体を発現するハイブリドーマ細胞から単離したRNAから、SMART(商標)RACE cDNA増幅キット(Clontech、米国カリフォルニア州)を使用して増幅した。2本のAP3鎖の可変領域の増幅に使用したプライマーは以下のとおりである。

30

【0095】

重鎖：

ユニバーサルプライマーミックスA(Clontech、カリフォルニア州)：

長(0.4 μM)：

5' -ctaatacgactcactatagggcAAGCAGTGGTATCACGCAGAGT-3' (配列番号7)

短(2 μM)：

5' -ctaatacgactcactatagggc-3' (配列番号8)

プライマ-69(10 μM)

5' -gctctagactaacactcattcctgttgaagctcttg-3' (配列番号9)

40

【0096】

軽鎖

ユニバーサルプライマーミックスA(Clontech)：

長(0.4 μM)：

5' -ctaatacgactcactatagggcAAGCAGTGGTATCACGCAGAGT-3' (配列番号10)

短(2 μM)：

5' -ctaatacgactcactatagggc-3' (配列番号11)

プライマ-312(10 μM)

5' -gtctaccacaacacacgtgac-3' (配列番号12)

【0097】

50

可変領域を、Zero Blunt(登録商標)TOPO(登録商標)配列決定用PCRクローニングキット(カタログ番号K287520、Invitrogen、米国カリフォルニア州)を用いてpCR4ベクター内にクローニングした。続いて、重鎖可変領域を、ネズミIgG1フレームワークを含有するpTT5系発現ベクターのEcoRI/BamHI部位内にサブクローニングして、AP3 mIgG1重鎖を作製した。AP3 mIgG1重鎖のアミノ酸配列を以下に示す。AP3 IgK軽鎖を、pCR4ベクターから、プライマー-AP-3 LC KI1センス(5'-GACTTTTGATGAATTCCCTACCATGAGGTGC-3'、配列番号13)およびM13逆プライマーを用いて増幅した。PCR断片を空のpTT5系発現ベクターのEcoRI部位内にサブクローニングした。AP3 mIgK軽鎖タンパク質のアミノ酸配列を以下に示す。完全長AP3 abをコードしている2つのベクターをHek293 6E細胞中で過渡的に発現させた。形質移入は、293fectinを形質移入剤として使用して(カタログ番号12347-019、Invitrogen、米国カリフォルニア州)、製造者によって供給された指示書に従って実施した。形質移入体は、5日間静置した後に収集した。

【0098】

位置39(カバット付番系に従って位置34)の潜在的に問題のあるシステインがAP3抗体の軽鎖中で同定された。システイン残基は、QuikChange部位特異的突然変異誘発キット(カタログ番号200518、Stratagene、米国カリフォルニア州)および以下の2つのプライマーを用いた部位特異的突然変異誘発によって、セリンへの突然変異が成功した。

AP3 LC C39S S

5'-caacacttacttgtcctgggttcctgcag-3' (配列番号14)

AP3 LC C39S AS

5'-ctgcaggaaccaggacaagtaagtgttg-3' (配列番号15)

【0099】

生じたタンパク質の配列を以下に示す。C39S突然変異を含有する完全長AP3 mIgG1 abは、配列番号17および配列番号19を発現する2つのベクター構築体を合わせることによって発現させることができる。

【0100】

(実施例4)

AP3 FL mIgG1 wtおよびAP3 FL mIgG1 wt HC LC C39Sの精製。

AP3 FL mIgG1 wtおよびAP3 FL mIgG1 wt HC LC C39Sタンパク質(実施例3)の精製は、タンパク質A MabSelect SuRe樹脂(GE Healthcare、カタログ番号17-5438-01)を用いたアフュニティークロマトグラフィーから構成される1ステッププロセスによって実施した。精製はAktaExplorerクロマトグラフィーシステム(GE Healthcare、カタログ番号18-1112-41)を用いて実施した。精製ステップに用いた緩衝系は、トリス、3MのNaCl、pH8.5から構成される平衡化緩衝液および10mMのギ酸、pH3.5から構成される溶出緩衝液であった。MabSelect SuReカラムに施用する前に上清を3MのNaClおよびpH8.5に調節した。カラムを15倍カラム体積の平衡化緩衝液で洗浄し、タンパク質を約1倍カラム体積の溶出緩衝液中で、均一濃度で溶出させた。AP3 FL mIgG1 wt HC LC C39Sを、SDS-PAGE/クマシーおよびSEC-HPLCを用いて分析し、精製から、約150kDa(約50kDaの重鎖構成成分および約25kDaの軽鎖構成成分)の純粋かつ均質なタンパク質が、SEC-HPLCによって測定して>98%の純度で得られたことが示された。最終タンパク質濃度を測定するために、NanoDrop分光光度計(Thermo Scientific)を1.56の消光係数と一緒に使用した。

【0101】

抗体の特徴づけは、還元型のインタクトなmAbのLC-MS分析によって行った。重鎖はGOFおよびG1Fグリカンを含有することが示された。軽鎖は、1個のシアル酸(G2FS)を主要な構造として有する二分岐グリカンでグリコシル化されていることが示された。シアリダーゼを用いた処理により、291amuの予想された質量値のシフトが得られ、シアル酸の存在が確認された。

【0102】

完全長AP3 FL mIgG1 wt抗体と休止血小板との結合は、FACS分析によって確認された。

【0103】

10

20

30

40

50

配列番号17: AP3 mIgG1 HC

QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGVVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYNKYNENFKGKATLTADTSSSTAY
MQLSSLTSEDSAVYFCAREYGNYDYAMDSWGGQGTSVTSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMSVTLGCLVKGYFPEPVTVT
WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVIF
PPPKDVLTI TLTPKVCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPREEQFNSTFRSVEELPIMHQDWLNGKEFKCRV
NSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMTDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGS
YFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

【0104】

配列番号18: AP3 mIgK LC

DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSRSLLHSNGNTYLCWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDFSGSGSGTAFTLRI
SRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKWIDGSER
QNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTKEYERHNNYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

【0105】

配列番号19: AP3 IgK LC C39S

DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSRSLLHSNGNTYLSWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDFSGSGSGTAFTLRI
SRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKWIDGSER
QNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTKEYERHNNYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

【0106】

(実施例5)

AP3 scFV構築体

20

AP3抗体の軽鎖および重鎖の可変領域をコードしているDNA配列に基づいて、AP3 abの2つの单鎖抗体の形態(AP3 LC-HC scFVおよびAP3 HC-LC scFV)をMWG biotech、ドイツから注文した。2つのscFVタンパク質のアミノ酸配列を配列番号22および配列番号23に示す。構築体には、V_HおよびV_L断片の正しい対合を可能にするために、2つの可変領域の間に導入された15個のaa(G₄S)₃)リンカー領域が含まれていた。精製目的のためにFlagタグがどちらのタンパク質のC末端にも含まれる。

【0107】

続いて、AP3 abの2つの单鎖の形態をコードしている遺伝子を、pTT5系発現ベクターの HindIII部位内にサブクローニングした。2つの单鎖のAP3抗体をコードしている2つの構築体を、293fectinを形質移入剤として使用して(カタログ番号12347-019、Invitrogen、米国カリフォルニア州)、製造者によって供給された指示書に従って、Hek293 6E細胞中で過渡的に発現させた。形質移入体は、5日間静置した後に収集した。

30

【0108】

2つの单鎖のAP3抗体AP3-LC-HC scFV-FLAG、AP3-HC-LC scFV-FLAGと休止血小板のGPIIa/IIIBとの結合は、FACS分析によって確認された。

【0109】

位置39(カバット付番系に従って位置34)の潜在的に問題のあるシステインがAP3抗体の軽鎖中で同定され、AP3 LC-HC scFV構築体中でセリンへと突然変異させた。これは、Quik Change部位特異的突然変異誘発キット(カタログ番号200518、Stratagene、米国カリフォルニア州)を使用して、製造者によって供給された指示書に従って、以下の2つのプライマーを用いて行った。

40

AP3 LC C39S S

5'-caacacttacttgtcctggttcctgcag-3' (配列番号20)

AP3 LC C39S AS

5'-ctgcaggaaccaggacaagtaagtgttg-3' (配列番号21)

【0110】

生じたAP3 LC-HC scFV-FLAG C39Sタンパク質の配列を配列番号24に示す。

【0111】

配列番号22: AP3-LC-HC scFV-FLAG

DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSRSLLHSNGNTYLCWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDFSGSGSGTAFTLRI

50

【0119】

すべてのAP3 scFV構築体をHek293 6E細胞中で過渡的に発現させた。形質移入は、293fectinを形質移入剤として使用して(カタログ番号12347-019、Invitrogen、米国カリフォルニア州)、製造者によって供給された指示書に従って実施した。形質移入体は、5日間静置した後に収集した。

【0120】

すべてのscFV断片は以下の手順に従って精製した。

【0121】

(実施例7)

AP3 LC-HC scFVタンパク質の精製および特徴づけ。

10

AP3 LC-HC scFVタンパク質(実施例5および6)の精製は、抗FLAG M2親和性ゲル(Sigma、カタログ番号A2220)を用いたアフィニティクロマトグラフィー、次いで、凝集体および観察される場合は他の高分子量の汚染物質を除去するためのSuperdex75pgゲル濾過カラム(GE Healthcare、カタログ番号17-1068-01)から構成される、2ステッププロセスを用いて実施した。精製はAktaExplorerクロマトグラフィーシステム(GE Healthcare、カタログ番号18-1112-41)を用いて実施した。第1の精製ステップに使用した緩衝系は、20mMのHepes、150mMのNaCl、0.01%のTween-80(v/v)、pH7.5から構成される平衡化緩衝液および100mMのグリシン、pH3.5/NaOHから構成される溶出緩衝液であった。上清を最初に0.5MのHepes、pH10.5でpH6.7に調節したか、または事前に平衡化した抗FLAG M2親和性カラム上に直接施用した。カラムを10倍カラム体積の平衡化緩衝液で洗浄し、タンパク質を約2倍カラム体積の溶出緩衝液中で、均一濃度で溶出させた。溶出されたタンパク質を100mMのHepes、150mMのNaCl、pH7.5で1:1に希釈し、SDS-PAGE/クマシーよりSEC-HPLCを用いて分析した。約28kDaの純粋(>75%)かつ均質なタンパク質が第1の精製ステップから得られた場合は、さらなる精製は実施しなかった。そうでなければ、20mMのトリス、1MのNaCl、pH7.5を用いて第2のゲル濾過ステップを行った。2~3.5%の積載を施用し、溶出されたタンパク質を含有する画分を、SDS-PAGE/クマシーよりSEC-HPLCを用いて分析した。分析に基づいて、純粋(>80%)かつ均質なタンパク質を含有するプールを調製した。最終タンパク質濃度を測定するために、NanoDrop分光光度計(Thermo Scientific)を1.79の消光係数と一緒に使用した。

20

【0122】

30

配列番号31: AP3 LC-HC scFV INS257C FLAG

DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSRSLLHSNGNTYLCWFLQRPGQSPQLIYRMSNLASGVPDFSGSGSGTAFTRLISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIKRGGGGSGGGSGGGGSQVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDYPGGGYNKYNENFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREYGNYDYAMDSWGQGTSVTVSSDYKDDDDKC

【0123】

配列番号32: AP3 LC-HC scFV C39S S248C FLAG

DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSRSLLHSNGNTYLSWFLQRPGQSPQLIYRMSNLASGVPDFSGSGSGTAFTRLISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIKRGGGGSGGGSGGGGSQVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDYPGGGYNKYNENFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREYGNYDYAMDSWGQGTSVTVSCDYKDDDDK

40

【0124】

(実施例8)

AP3 Fab構築体

QuikChange部位特異的突然変異誘発キット(カタログ番号200518、Stratagene、米国カリフォルニア州)および以下の2つのプライマーを用いて、配列番号17をコードしている構築体中にストップコドンを導入することによって、AP3重鎖の切断型を作製した。

JP433 AP3 HC Fab S

Caggattgtggttgaaaggcttgcataatg(配列番号33)

JP434 AP3 HC Fab S

50

Catatgcaaggcttcaaccacaatccctg(配列番号34)

【0125】

生じたタンパク質の配列を配列番号22に示す。

【0126】

配列番号19および配列番号35を発現する2つの構築体を合わせることによって、AP3抗体の機能的Fab断片を発現させた。2本の鎖をHek293 6E細胞中で過渡的に発現させた。形質移入は、293fectinを形質移入剤として使用して(カタログ番号12347-019、Invitrogen、米国カリフォルニア州)、製造者によって供給された指示書に従って実施した。形質移入体は、5日間静置した後に収集した。

【0127】

AP3 Fab LC C39Sタンパク質の精製および特徴づけ。

AP3 Fab LC C39Sタンパク質の精製は、Source 30S(GE Healthcare、カタログ番号17-1273-01)を用いた陽イオン交換、次いでSuperdex75pgゲル濾過カラム(GE Healthcare、カタログ番号17-1068-01)から構成される2ステッププロセスを用いて実施した。精製はAktaExplorerクロマトグラフィーシステム(GE Healthcare、カタログ番号17-1068-01)を用いて実施した。第1の精製ステップに使用した緩衝系は、10mMの酢酸Na、pH5.0から構成される平衡化緩衝液および10mMの酢酸Na、1MのNaCl、pH5.0から構成される溶出緩衝液であった。0.5MのHClでpH5.0までpH調節する前にmilliQを加えることで収集物を<3mS/cmまで調節し、事前に平衡化したSource 30Sカラムに施用した。カラムを15倍カラム体積の平衡化緩衝液で洗浄した。20倍カラム体積にわたる平衡化緩衝液および溶出緩衝液の直線勾配によってタンパク質を溶出させた。タンパク質は約8倍カラム体積で溶出された。第2のゲル濾過精製ステップは、20mMのリン酸Na、150mMのNaCl、pH7.2を用いて行った。2~3.5%の積載を施用し、タンパク質はカラム体積の5~7%で収集された。AP3 Fab LC C39Sタンパク質を、SDS-PAGE/クマシーおよびSEC-HPLCを用いて分析し、精製から、約50kDaの純粋かつ均質なタンパク質が、SEC-HPLCによって測定して約91.9%の純度で得られたことが示された。最終タンパク質濃度を測定するために、NanoDrop分光光度計(Thermo Scientific)を1.67の消光係数と一緒に使用した。

【0128】

配列番号35: AP3 Fab HC

QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGVVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYNKYNENFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREYGNYDYAMDSWGGQGTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNNSGLSSGVHTFPALQSDLYTLSSSVTPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCG

【0129】

(実施例9)

FVIII-AP3 scFVの融合体

AgeIおよびSacII制限酵素を用いて、AP3 LC-HC scFVまたはAP3 HC-LC scFVをBドメイン欠失およびa3ドメイン欠失のFVIII変異体と融合させた。Bドメイン欠失およびa3ドメイン欠失のFVIIIはaa751~1637およびaa1649~1685を欠く。AP3 LC-HC scFVまたはAP3 HC-LC scFVをaaR1648およびQ1686の間に挿入した。AP3コード配列は、それぞれの制限酵素、AgeIおよびSacIIで認識可能な部位を保有するプライマーを用いたPCRによって増幅した。DNAは内在性のAgeI部位を有するため、PCR産物の部分的制限消化を行った。

【0130】

フューリン部位(RHQR)はAP3 scFVのN末端に位置するため、AP3 scFVは、プロセッシング後にFVIII軽鎖のN末端を構成する。トロンビン部位R1688~R1689も保存されており、これらのFVIII変異体のトロンビン活性化の際、AP3 scFVがFVIIIから遊離(deliberated)される。

【0131】

プライマー

AP3-HC-LC-Da3-AgeI

Aaccacccggcttggaaacgccatcaacggcaggccagctgcagcagcagc(配列番号36)

10

20

30

40

50

AP3-HC-LC-Da3-SacII

Gaaagctccgcgggctctggccgttgatttcagcttgg(配列番号37)

AP3-LC-HC-Da3-AgeI

Aacccaccggcttggaaacggccatcaacggacatcgatgacccaggct(配列番号38)

APS-LC-HC-Da3-SacII

Gaaagctccgcgggctctggctgctcacggcacggagg(配列番号39)

【0132】

(実施例10)

FVIIIフレームワークおよび融合タンパク質の一過性発現

0.9~1.1×10⁶の密度のHKB11細胞を、0.7mg/lのプラスミドと1.4ml/lの形質移入剤、293fectin(Invitrogen)との複合体で形質移入した。形質移入複合体は、プラスミドおよび形質移入をOPTIMEM(Invitrogen)で別々に希釈し、2つの溶液を混合し、混合物を室温で20分間インキュベートすることによって調製した。複合体混合物を細胞懸濁液に加え、懸濁液を振盪インキュベーターで5日間、36.5℃、5%のCO₂でインキュベートした。細胞培養収集物を0.22μmの膜フィルターで濾過した。

【0133】

(実施例11)

FVIIIフレームワークおよび融合タンパク質を精製するための一般手順

直径1.6cmおよび床高さ4cmの寸法で8mLとなるカラムに樹脂VIIISelect(GE Healthcare)を詰め、20mMのイミダゾール+10mMのCaCl₂+0.01%のTween80+250mMのNaCl、pH7.3を用いて、500cm³/時で平衡化した。実施例3に記載のように調製した培養濾液をカラムに施用し、続いてカラムを第1の平衡化緩衝液で洗浄し、その後、20mMのイミダゾール+10mMのCaCl₂+0.01%のTween80+1.5MのNaCl、pH7.3で洗浄した。結合したFVIIIを、均一濃度、90cm³/時で、20mMのイミダゾール+10mMのCaCl₂+0.01%のTween80+2.5MのNaCl+6.5Mのプロピレングリコール、pH7.3を用いて溶出させた。FVIIIを含有する画分をプールし、20mMのイミダゾール+10mMのCaCl₂+0.01%のTween80、pH7.3で1:10に希釈し、F25-セファロースを詰めたカラムに施用した(Thimら、Haemophilia、2009年)。カラム寸法は直径1.6cmおよび床高さ2cmであり、カラム体積が4mLとなった。施用前に、カラムを180cm³/時で、20mMのイミダゾール+10mMのCaCl₂+0.01%のTween80+150mMのNaCl+1Mのグリセロール、pH7.3を用いて平衡化した。施用後、カラムを最初に平衡化緩衝液で洗浄し、その後、20mMのイミダゾール+10mMのCaCl₂+0.01%のTween80+650mMのNaCl、pH7.3で洗浄した。結合したFVIIIを、均一濃度で、20mMのイミダゾール+10mMのCaCl₂+0.01%のTween80+2.5MのNaCl+50%(v/v)のエチレングリコール、pH7.3を用いて、30cm³/時で溶出させた。FVIIIを含有する画分をプールし、20mMのイミダゾール+10mMのCaCl₂+0.01%のTween80、pH7.3で1:15に希釈したが、ただし、a3ドメインの欠失を有するFVIII変異体は同じ緩衝液で1:45に希釈した。希釈したプールを、Poros 50HQ(PerSeptive Biosystem)を詰めた、直径0.5cmおよび床高さ5cmのカラム寸法で1mLのカラム体積となるカラムに施用した。施用前にカラムを300cm³/時で、20mMのイミダゾール+10mMのCaCl₂+0.01%のTween80+50mMのNaCl+1Mのグリセロール、pH7.3を用いて平衡化した。カラムを平衡化緩衝液で洗浄した後、5倍カラム体積にわたる平衡化緩衝液から20mMのイミダゾール+10mMのCaCl₂+0.01%のTween80+1MのNaCl+1Mのグリセロール、pH7.3までの直線勾配を用いて溶出させた。FVIIIを含有する画分をプールし、プールを使用時まで-80℃で保管した。

【0134】

HIS-タグを有するFVIII-変異体を本質的に上述のように精製したが、ただし、第2の精製ステップ(F25-セファロース)を2倍カラム体積の1MのNiSO₄を充填したキレート化セファロースFF(GE Healthcare)に交換した。カラム寸法は直径0.5cmおよび床高さ5cmであり、1mLのカラム体積となった。施用前に、カラムを、30mMのイミダゾール+10mMのCaCl₂+0.01%のTween80+1.5MのNaCl、pH7.3を用いて、180cm³/時で平衡化した。施用後、カラムを30倍カラム体積の平衡化緩衝液で洗浄した後、5倍カラム体積にわたる250mMのイミダゾール+10mMのCaCl₂+0.01%のTween80+1.5MのNaCl、pH7.3までの直線勾配を用いて溶出させた。FVI

10

20

30

40

50

IIを含有する画分をプールし、20mMのイミダゾール+10mMのCaCl₂+0.01%のTween80、pH7.3で1:30に希釈した。最終精製ステップ(Poros 50HQ)を上述のように行った。

【0135】

(実施例12)

FVIII-AP3 scFV融合体の精製および特徴づけ

前記AP3 F8融合タンパク質(実施例9)の精製は、VIIIISelect樹脂(GE Healthcare、カタログ番号17-5455-02)に基づくイムノアフィニティークロマトグラフィーステップ、次いで、CNBr-セファロースFFとカップリングした抗体F25に基づく第2のイムノアフィニティークロマトグラフィーステップ(Thim L、Vandahl B、Karlsson J、Klausen NK、Pedersen J、Krogh TN、Kjalke M、Petersen JM、Johnsen LB、Bolt G、Norby PL、Steenstrup TD (2009年)、Purification and characterization of a new recombinant factor VIII (N 8)、Haemophilia、16:349～59頁)、および樹脂Poros 50HQ(Applied Biosystemsカタログ番号1-2559-07)に基づく最後に陰イオン交換クロマトグラフィーステップから構成される、3ステッププロセスを用いて実施した。精製はAktaExplorerクロマトグラフィーシステム(GE Healthcare、カタログ番号17-1068-01)を用いて実施した。第1の精製ステップに使用した緩衝系は、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、250mMのNaCl、pH 7.3から構成される平衡化緩衝液、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1.5MのNaCl、pH7.3から構成される洗浄緩衝液および20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mの酢酸アンモニウム、6.5Mの1,2-プロパンジオール、pH7.3から構成される溶出緩衝液であった。収集物を、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、pH7.3から構成される希釈緩衝液で2×に希釈し、事前に平衡化したVIIIISelectカラムに施用した。カラムを6倍カラム体積の平衡化緩衝液および6倍カラム体積の洗浄バッファーで洗浄した。タンパク質を約3倍カラム体積中で、均一濃度で溶出させた。第2の免疫親和性精製ステップの前に、第1の精製ステップからの溶出プールを、上述の希釈緩衝液を用いて10×に希釈した。第2の精製ステップに使用した緩衝系は、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、150mMのNaCl、pH7.3から構成される平衡化緩衝液、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%Tween80、1.5MのNaCl、pH7.3から構成される洗浄緩衝液および0.5Mのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、150mMのNaCl、pH7.3から構成される溶出緩衝液であった。試料を事前に平衡化したF25-セファロースFFカラムに施用した後、カラムを6倍カラム体積の平衡化緩衝液および6倍カラム体積の洗浄バッファーで洗浄した。タンパク質を約1.5倍カラム体積中で、均一濃度で溶出させた。第3の陰イオン交換精製ステップの前に、第2の精製ステップからの溶出プールを、上述の希釈緩衝液を用いて15×に希釈した。第3の精製ステップに使用した緩衝系は、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、50mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.2から構成される平衡化緩衝液および20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%Tween80、1MのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3から構成される溶出緩衝液であった。試料を事前に平衡化したPoros HQ50カラムに施用した後、カラムを8倍カラム体積の平衡化緩衝液で洗浄した。5倍カラム体積にわたる0～100%の直線勾配、次いで10倍カラム体積の100%の溶出緩衝液を用いて、タンパク質をカラムから溶出させた。タンパク質は勾配の初期、典型的には10～30%の溶出緩衝液で溶出された。収率は、発色FVIIIアッセイCOATEST(登録商標)第VIII因子(Chromogenix、COATEST SP FVIIIカラログ番号82 4086 63)およびSpectraMax分光光度計(Molecular Devices、カタログ番号M3)を用いて追跡した。タンパク質の品質はSDS-PAGE/銀染色およびRP-HPLCを用いて分析し、純粋かつ均質なタンパク質調製物が軽鎖、重鎖および単鎖から構成されることが示された。最終タンパク質濃度はRP-HPLC分析に基づいて決定した。

【0136】

配列番号40: F8-500 AP3-LC-HC scFV - a3

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLGPTIQAEV
YDTVVITLKNMASHPVSLLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPFGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLS
HVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARA
WPKMHTVNGYVNR

10

20

30

40

50

SLPGL | GCHRKS VYWHV | GMGTTPEVHS | FLEGHTFLVRNHRQASLE | SP | TFLTAQTLLMDLGQFLFCH | SSHQHDGM
 EAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSF | Q | RSVAKHPKTVWHY | AAEEEWDYAPLVL
 APDRSYKSQYLNNGPQR | GRKYKKVRFMAYTDETFKTREA | QHESG | LGPLLYGEVGD TLL | FKNQASRPYN | YPHG
 TDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFP | LPGE | FKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGL | GPL | CYKESVD
 QRGNQ | MSDKRNV | LFSVFDENRSWYLTEN | QRFNPAGVQLEDPEFQASN | MHS | NGYVFDLQLSVCVCLHEVAYWY | L
 SIGAQTDLSVFFSGYTFKHKMVYEDTTLFPFSGETVFMSENPGW | LGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYE
 DSYED | SAYLLSKNNA | EPRSFQSNSRHPSPNPPVLRHQRD | VMTQAAPSVPVTPGESVS | SCRSSRSLLHSNGNTYLC
 WFLQRPGQSPQLL | YRMSNLASGVPDFSGSGSTAFTLR | SRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKE | KRGGGSG
 GGGSGGGGSQVQLQQSGAELVRPGTSVK | SCKASGYTFTNYWLGVWKQRPGHGLEW | GD | YPGGGYNKYNENFKGKATLT
 ADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREYGNYDYAMDSWGQGTSVTVSSQSPRSFQKKTRHYF | AAVERLWDYGMSSSPH 10
 VLRNRAQSGSPQFKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLLGPY | RAEVEDN | MVTFRNQASRPYSFYSSL | SYEEDQ
 RQGAERPKNFVCPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCAWAYFSDVDLEKDVHSG | GPL | VCHTNTLNPAHGRQVTQEF
 ALFFT | FDET KSWYFTENMERNCRAPCN | QMEDPTFKENYRFHA | NGY | MDTLPGVMAQDQR | RWYLLSMGSNEN | HS
 HFSGHVFTVRKKEEYKMALYLNLYPGFETVEMPSKAG | WRVECL | GEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMSGH | RDQF
 | T ASGQYQGWAPKLARLHSGS | NAWSTKEPFSW | KVDLLAPMI | HG | KTQGARQKFSSLY | SQF | MSLDGKKWQTYR
 GNSTGTLMVFFGNVDSSG | KHN | FNPP | ARY | RLHPTHYS | RSTLRMELMGCDLNCSMPLGMESKA | SDAQ | TASSYF
 TNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLLTSMYVKEFL | SSSQDGHQWTLFFQ
 NGKVKVFGNQDSFTPVVNSLDPLLLTRYLR | HPQSWVHQ | ALRMEVLGCEAQDLY

【 0 1 3 7 】

配列番号41: F8-500 AP3-HC-LC scFV - a3 20
 ATTRYYLGA VELS DYM QSDLGEL PVDARFPPRVPKSFPNTS VVYK KTLFVEFTDHLFN | AKPRPPWMGLGPT | QAEV
 YDTVV | TLKNMASHPVS LHAVGVS YWKASEGA EYDDQTSQREKEDDKVFP GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLS
 HVDLVKDLNSGL | GALLVCREGSLAKEKTQTLHKF | LLFAVFD EGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNR
 SLPGL | GCHRKS VYWHV | GMGTTPEVHS | FLEGHTFLVRNHRQASLE | SP | TFLTAQTLLMDLGQFLFCH | SSHQHDGM
 EAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSF | Q | RSVAKHPKTVWHY | AAEEEWDYAPLVL
 APDRSYKSQYLNNGPQR | GRKYKKVRFMAYTDETFKTREA | QHESG | LGPLLYGEVGD TLL | FKNQASRPYN | YPHG
 TDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFP | LPGE | FKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGL | GPL | CYKESVD
 QRGNQ | MSDKRNV | LFSVFDENRSWYLTEN | QRFNPAGVQLEDPEFQASN | MHS | NGYVFDLQLSVCVCLHEVAYWY | L
 SIGAQTDLSVFFSGYTFKHKMVYEDTTLFPFSGETVFMSENPGW | LGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYE
 DSYED | SAYLLSKNNA | EPRSFQSNSRHPSPNPPVLRHQRD | VMTQAAPSVPVTPGESVS | SCRSSRSLLHSNGNTYLC
 WFLQRPGQSPQLL | YRMSNLASGVPDFSGSGSTAFTLR | SRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKE | KRGGGSG
 GGGSGGGGSQVQLQQSGAELVRPGTSVK | SCKASGYTFTNYWLGVWKQRPGHGLEW | GD | YPGGGYNKYNENFKGKATLT
 ADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREYGNYDYAMDSWGQGTSVTVSSQSPRSFQKKTRHYF | AAVERLWDYGMSSSPH 30
 VLRNRAQSGSPQFKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLLGPY | RAEVEDN | MVTFRNQASRPYSFYSSL | SYEEDQ
 RQGAERPKNFVCPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCAWAYFSDVDLEKDVHSG | GPL | VCHTNTLNPAHGRQVTQEF
 ALFFT | FDET KSWYFTENMERNCRAPCN | QMEDPTFKENYRFHA | NGY | MDTLPGVMAQDQR | RWYLLSMGSNEN | HS
 HFSGHVFTVRKKEEYKMALYLNLYPGFETVEMPSKAG | WRVECL | GEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMSGH | RDQF
 | T ASGQYQGWAPKLARLHSGS | NAWSTKEPFSW | KVDLLAPMI | HG | KTQGARQKFSSLY | SQF | MSLDGKKWQTYR
 GNSTGTLMVFFGNVDSSG | KHN | FNPP | ARY | RLHPTHYS | RSTLRMELMGCDLNCSMPLGMESKA | SDAQ | TASSYF
 TNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLLTSMYVKEFL | SSSQDGHQWTLFFQ
 NGKVKVFGNQDSFTPVVNSLDPLLLTRYLR | HPQSWVHQ | ALRMEVLGCEAQDLY

【 0 1 3 8 】

配列番号42: F8-500 AP3-HC-LC scFV
 ATTRYYLGA VELS DYM QSDLGEL PVDARFPPRVPKSFPNTS VVYK KTLFVEFTDHLFN | AKPRPPWMGLGPT | QAEV
 YDTVV | TLKNMASHPVS LHAVGVS YWKASEGA EYDDQTSQREKEDDKVFP GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLS
 HVDLVKDLNSGL | GALLVCREGSLAKEKTQTLHKF | LLFAVFD EGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNR
 SLPGL | GCHRKS VYWHV | GMGTTPEVHS | FLEGHTFLVRNHRQASLE | SP | TFLTAQTLLMDLGQFLFCH | SSHQHDGM
 EAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSF | Q | RSVAKHPKTVWHY | AAEEEWDYAPLVL
 APDRSYKSQYLNNGPQR | GRKYKKVRFMAYTDETFKTREA | QHESG | LGPLLYGEVGD TLL | FKNQASRPYN | YPHG
 TDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFP | LPGE | FKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGL | GPL | CYKESVD 50

QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDQLQLSCLHEVAYWYIL
 SIGAQTDLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLFPFSGETVFMSENPGWLILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYE
 DSYEDISAYLLSKNNAIPERSFSQNSRHPSQVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGVVKQRPGHGLEWIGD
 IYPGGGYNKYNENFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREYGNYDYAMDSWGQGTSVTVSSGGGSGGGGS
 GGGGSDIVMTQAAPSPVTPGESVSISCRSSRSLLHSNGNTYLCWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDFSGSGSGTA
 FTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIKRSQNPPVLRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFD
 IYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSPQFKVVFQEFQFTDGSFTQPLYRGELNEHLGL
 LGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEQRQGAEPRKNFKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCWAYF
 SDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQTVQEFALFFTIFDETKSWEFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRF
 HAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRV
 ECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDQITASGQYGQWAPKLRHLHSGSINAWSTKEPFSWIKV DLLAP
 MIIHGIKTQGARQKFSSLISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSI
 RSTLRMELMGCDLNCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFTWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTM
 KVTGTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIA
 LRMEVLGCEAQDLY

【0139】

配列番号43: F8-500 AP3-LC-HC scFv

ATRRYYLGAVELSDYMQSDLGELPVDFPFPVPKSFPFNTSVVYKKTFLVEFTDHLNIAKPRPPWMGLGPTIQAEV
 YDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLS
 HVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHFKILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNR
 SLPGLIGCHRKSJVWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLFCISSHQHDGM
 EAYVKVDSCEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVL
 APDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGLGPLLYGEVDTLLIFKNQASRPYNIYPHG
 TDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPLPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD
 QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDQLQLSCLHEVAYWYIL
 SIGAQTDLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLFPFSGETVFMSENPGWLILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYE
 DSYEDISAYLLSKNNAIPERSFSQNSRHPSDIVMTQAAPSPVTPGESVSISCRSSRSLLHSNGNTYLCWFLQRPGQSPQ
 LLIYRMSNLASGVPDFSGSGSGTAFTRLISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQV
 QLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGVVKQRPGHGLEWIGD IYPGGGYNKYNENFKGKATLTADTSSSTAYMQ
 LSSLTSEDSAVYFCAREYGNYDYAMDSWGQGTSVTVSSSQNPPVLRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFD
 IYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSPQFKVVFQEFQFTDGSFTQPLYRGELNEHLGL
 LGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEQRQGAEPRKNFKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCWAYF
 SDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQTVQEFALFFTIFDETKSWEFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRF
 HAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRV
 ECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDQITASGQYGQWAPKLRHLHSGSINAWSTKEPFSWIKV DLLAP
 MIIHGIKTQGARQKFSSLISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSI
 RSTLRMELMGCDLNCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFTWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTM
 KVTGTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIA
 LRMEVLGCEAQDLY

【0140】

(実施例13)

ステップ1:

一般式:

【0141】

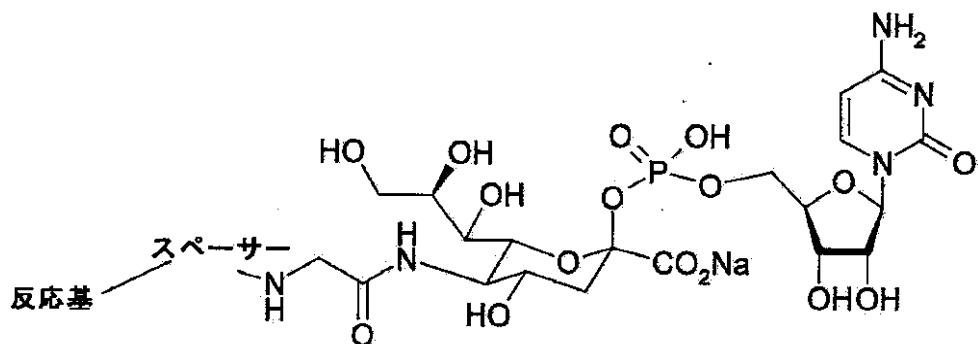
10

20

30

40

【化1】



10

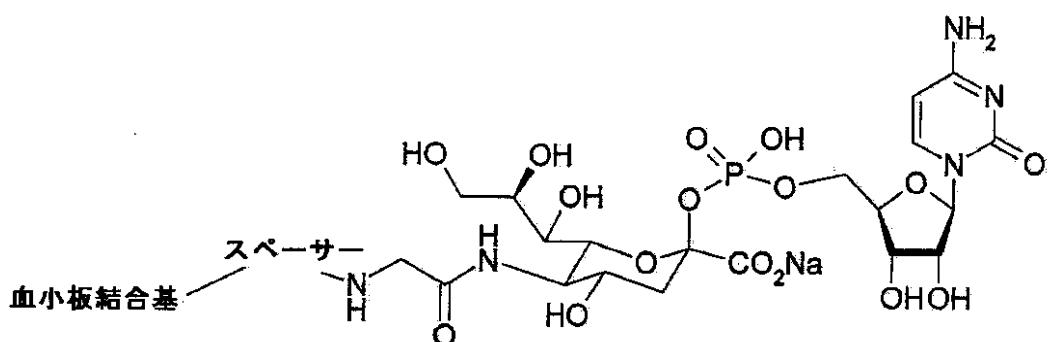
【0142】

の試薬[式中、反応基の非排他的な例は、マレイミド、アジド、アルキン、アルデヒドを含む基であり、Spacerの非排他的な例は、たとえば3、kDa、5kDa、10kDa、または20kDaの平均分子量を有するPEG部分である]を、たとえばアブシキシマブもしくはAP3、または、排他的ではないが、たとえば単鎖変異体もしくはFAB断片などのアブシキシマブもしくはAP3に由来するタンパク質等の血小板結合タンパク質と反応させて、中間体B1の一般式を有する化合物がもたらされ得る。

【0143】

【化2】

20



30

【0144】

(中間体B1)

血小板結合タンパク質でのSpacerの付着点は、中間体B1の一般式の化合物をアセンブルするために使用した反応基の種類に依存し得る。たとえば、反応基がアルデヒドであった場合、1つの可能性は、Spacerが、 NaCNBH_3 の存在下における還元性アルキル化によって、血小板結合タンパク質のN末端のうちの1つに付着していることである場合がある。たとえば、反応基がマレイミドであった場合は、1つの可能性は、Spacerが、血小板結合タンパク質中の遊離システインに付着していることである場合がある。システインは、排他的ではないが、たとえば酵素またはトリス(カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩などの適切な試薬で処理することによる、以前の反応で遊離されていてもよい。

40

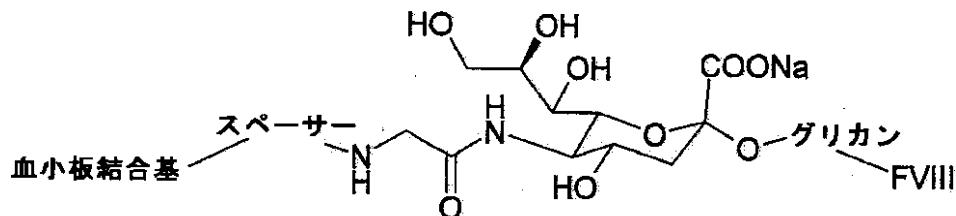
【0145】

ステップ2:

シアル酸は、シアリダーゼを用いた反応によってFVIIIのグリカンから除去し得る。中間体B1の一般式を有する化合物を、たとえばST3-Gal-I(FVIIIのO-グリカンと反応させる場合)またはST3-GA1111(FVIIIのN-グリカンと反応させた場合)などの適切な酵素の存在下で反応させて、以下の一般構造の化合物の生成物が得られ得る。

【0146】

【化3】



【0147】

(中間体)

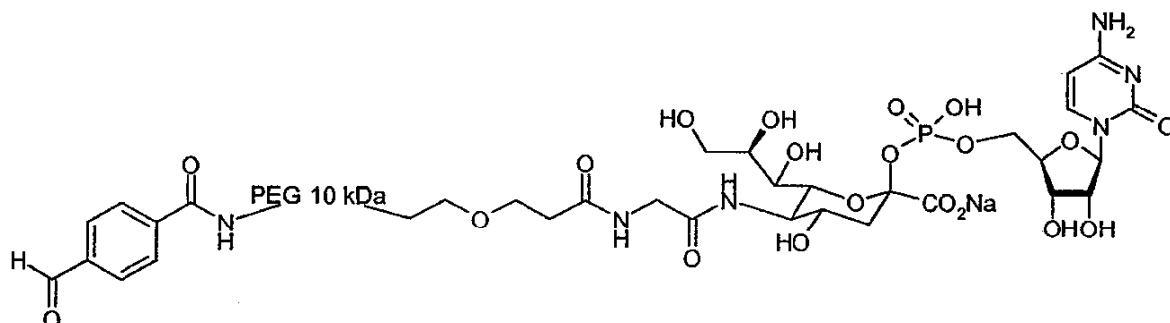
10

(中間体実施例1)

N-((3-(-(4-ホルミルベンゾイルアミノ)10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-O²-[5']シチジリル- -ノイラミン酸:

【0148】

【化4】



20

【0149】

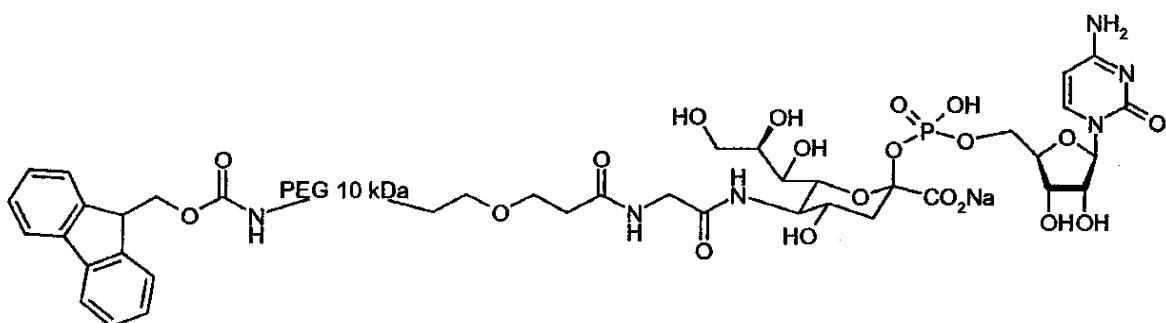
ステップ1:

N-((3-(-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-O²-[5']シチジリル- -ノイラミン酸:

【0150】

30

【化5】



40

【0151】

N-(アミノアセチル)-O²-[5']シチジリル- -ノイラミン酸(18mg、0.029mmol)を、pH8.9に調節した50mMのトリスからなる緩衝液(4ml)に溶かした。現在のpHを確認し、0.1Nの塩酸を加えることによってpH8.9に調節した。THF(16ml)を加えた。3-(-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)10kDa PEGイル)プロピオニ酸N-ヒドロキシスルシンイミジルエステルの最終量の約半分を加えた(たとえばRapp Polymere GmbHが販売、合計200mg、0.019mmol)。反応混合物を室温で攪拌した。1時間後、3-(-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)10kDa PEGイル)プロピオニ酸N-ヒドロキシスルシンイミジルエステルの残りの半分を加えた。反応混合物を16時間、室温で攪拌した。25 の浴温でTHF

50

を真空下で除去した。残りの混合物を濾過し、直径26mmおよび長さ10cmの床サイズを有するG25ゲル、流速7ml/分を使用した、25mMの炭酸水素アンモニウムの緩衝液を利用した、サイズ排除クロマトグラフィーに供した。所望の化合物を含有する画分をプールし、凍結乾燥して、453mgの、N-((3-(-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-O²-[5']シチジリル- -ノイラミン酸を含有する物質が得られた。DMSO_d₆中で行った¹H-NMR-スペクトルにより、シチジリル部分およびフルオレニル-9-イルメトキシカルボニル部分の存在が示された。この物質は冷凍庫で保管した。

【0152】

この反応を、1gの3-(-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)10kDa PEG 10 イル)プロピオン酸N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよび90mgのO²-[5']シチジリル- -ノイラミン酸で繰り返した。精製は、2cmの直径を有するHPLC C4-カラム上で、水中の50mMの炭酸水素アンモニウムの溶液中の、アセトニトリル中の5mMの炭酸水素アンモニウム水溶液からなる混合物の、30~50%の勾配を用いて行った。所望の化合物を含有する画分を収集し、凍結乾燥して、288mgの所望の化合物が得られた。¹H-NMRスペクトルは、上述の実験で判明した¹H-NMRスペクトルに対応していた。

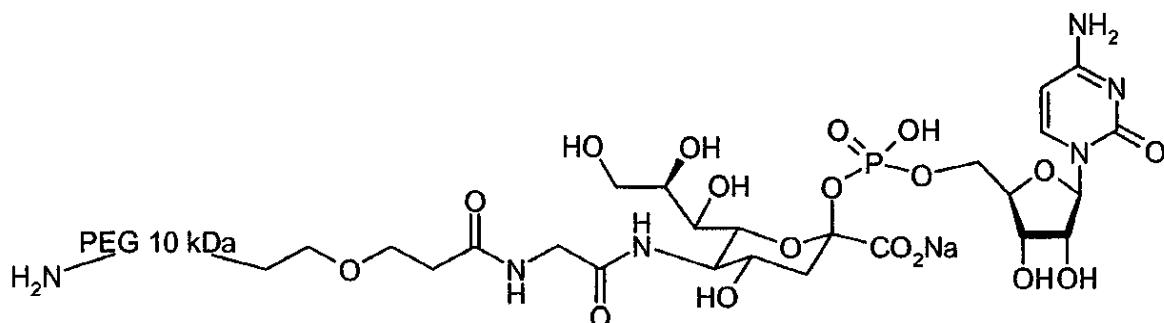
【0153】

ステップ2:

N-((3-(-(アミノ)10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-O²-[5']シチジリル- -ノイラミン酸 20

【0154】

【化6】



10

20

30

【0155】

N-((3-(-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-O²-[5']シチジリル- -ノイラミン酸(453mg)をN,N-ジメチルホルムアミド(12ml)に溶かした。ピペリジン(1.25ml)を加えた。透明な溶液を20分間室温で攪拌した。エーテル(200ml)を加えた。形成された沈殿物を成長させるために、混合物を室温で1.5時間静置した。沈殿物をニトロ化によって単離した。これをジクロロメタン(4ml)に溶かした。エチルジイソプロピルアミン(1ml)を加えた。エーテル(250ml)を加えた。形成された沈殿物を成長させるために、混合物を室温で16時間静置した。沈殿物を濾過によって単離し、真空下で乾燥させた。DMSO_d₆中での¹H-NMRスペクトルにより、9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニル基のシグナルは示されず、一方で、シチジリル部分に割り当てられたシグナルは見つけることができる。この物質は冷凍庫で保管した。 40

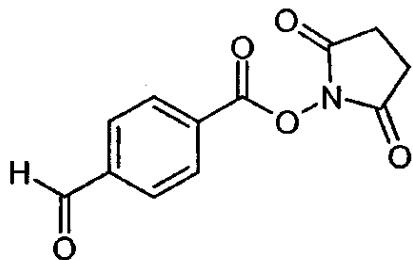
【0156】

ステップ3:

4-ホルミル安息香酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル

【0157】

【化7】



【 0 1 5 8 】

トリエチルアミン(2.04ml、14.65mmol)および2-スクシンイミド-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート(TSTU、4.44g、14.65mmol)を、N,N-ジメチルホルムアミド(30ml)中の4-ホルミル安息香酸(2.0g、13.3mmol)の溶液に次々に加えた。反応混合物を室温で16時間攪拌した。これを酢酸エチル(150ml)で希釈し、10%の硫酸水素ナトリウム水溶液(100ml)で洗浄した。水相を酢酸エチル(2×30ml)で抽出した。合わせた有機層をブライン(50ml)および水(50ml)の混合物で洗浄した。合わせた有機層を硫酸マグネシウム上で乾燥させた。溶媒を真空中で除去した。粗生成物を酢酸エチルから再結晶化させて、1.89gの4-ホルミル安息香酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステルが得られた。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 2.95 (s, 4H); 8.04 (d, 2H); 8.32 (d, 2H); 10.15 (s, 1H).

[0 1 5 9]

ステップ4:

N-((3-(*α*-アミノ10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-O²-[5']シチジリル-ノイラミン酸(42mg、0.004mmol)をジクロロメタン(2ml)に溶かした。エチルジイソプロピルアミン(0.002ml、0.012mmol)を溶液に加えた。ジクロロメタン(0.5ml)中の4-ホルミル安息香酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル(19.32mg、0.078mmol)の溶液を加えた。反応混合物を16時間、室温で攪拌した。25 °C の浴温で溶媒を真空下で除去した。残渣を25mMの炭酸水素アンモニウム水溶液(15ml)に懸濁させた。不溶性物質を濾過によって除去した。これを5つの部分に分割した。これらのそれぞれを、直径26mmおよび長さ10cmを有するカラム上のG25、流速7ml/分を用いた、25mMの炭酸水素アンモニウムの緩衝液を利用した、サイズ排除クロマトグラフィーに供した。所望の物質を含有するすべての画分を合わせ、凍結乾燥した。DMSO-d₆中での¹H-NMRスペクトルにより、アルデヒド部分およびシチジリル部分のどちらの存在も示された。得られた物質は冷凍庫で保管した。

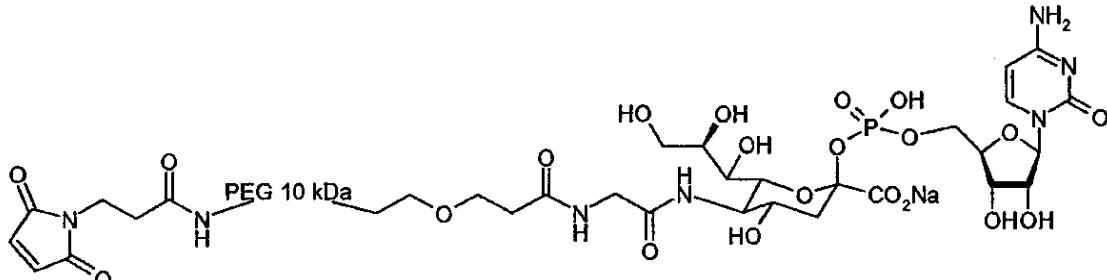
【 0 1 6 0 】

(中間体実施例2):

N-((3-(-(3-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロピロール-1-イル)プロピオニルアミノ)10kDaPEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-0²-[5']シチジリル- -ノイラミン酸

【 0 1 6 1 】

【化 8 】



〔 0 1 6 2 〕

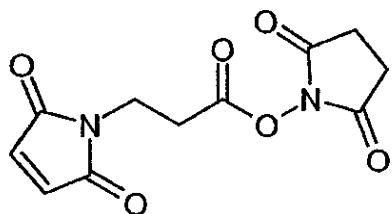
ステップ1:

3-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロピロール-1-イル)プロピオニン酸2,5-ジオキソピロリジニル

-1-イルエステル

【0163】

【化9】



10

【0164】

3-マレイミドプロピオン酸(1.0g、5.9mmol)をテトラヒドロフラン(20ml)に溶かした。続いて2-スクシンイミド-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート(TSTU、2.14g、7.1mmol)およびエチルジイソプロピルアミン(1.24ml、7.1mmol)を加えた。N,N-ジメチルホルムアミド(5ml)を加えた。反応混合物を室温で攪拌している間に、これがスラグ状となった。混合物を2分間攪拌した。N,N-ジメチルホルムアミド(5ml)を加えた。混合物を2.5時間、室温で攪拌した。これをジクロロメタン(150ml)で希釈し、続いて10%の硫酸水素ナトリウム水溶液(150ml)、炭酸水素ナトリウムの飽和水溶液(150ml)および水(150ml)で洗浄した。これを硫酸マグネシウム上で乾燥させた。溶媒を真空下で除去した。粗生成物を酢酸エチルから再結晶化させて、1.20gの3-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロピロール-1-イル)プロピオン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステルが得られた。

20

MS:m/z=289、[M+Na]⁺に必要:289

¹H-NMR (CDCl₃) 2.82 (m, 4H); 3.02 (t, 2H); 3.94 (t, 2H)、6.73 (s, 2H)。

【0165】

ステップ2:

N-((3-(-アミノ10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-0²-[5']シチジリル-ノイラミン酸(100mg、0.009mmol)を、テトラヒドロフラン(2ml)およびジクロロメタン(10ml)の混合物に溶かした。ジクロロメタン(3ml)中の3-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロピロール-1-イル)プロピオン酸2,5-ジオキソピロリジニル-1-イルエステル(50mg、0.18mmol)の溶液を加えた。エチルジイソプロピルアミン(0.005ml、0.028mmol)を加えた。反応混合物を室温で16時間攪拌した。ジクロロメタン(2ml)およびエチルジイソプロピルアミン(0.5ml)を加えた。アミノメチル化ポリスチレン樹脂(たとえばNovabiochemが販売、0.85mmol/g、438mg、0.372mmolを載せる)を加えた。混合物をゆっくりと室温で1時間攪拌した。樹脂を濾過によって除去した。25℃の浴温で溶媒を真空下で除去した。残渣をジクロロメタン(4ml)に溶かした。エーテル(200ml)を加えた。形成された沈殿物を成長させるために、混合物を室温で2時間静置した。沈殿物を濾過によって単離し、真空下で乾燥させて、38mgの表題化合物が得られた。DMSO_d₆中の¹H-NMRスペクトルにより、マレイミド基の存在が示された。

30

【0166】

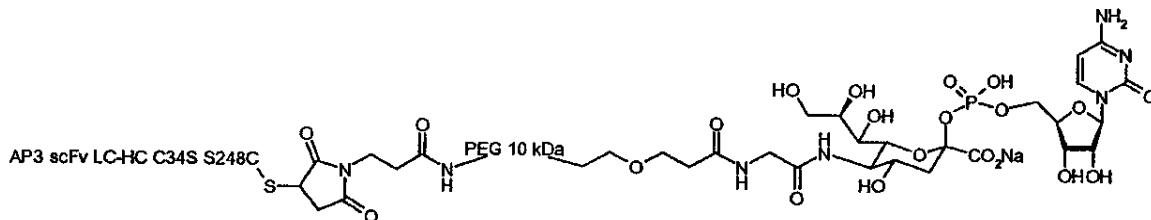
(中間体実施例3)

40

N-((3-(-(3-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロピロール-1-イル)プロピオニルアミノ)10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-0²-[5']シチジリル-ノイラミン酸の、AP3 s cFV C34S S248CのCys248への付着

【0167】

【化10】



【0168】

pH7.35に調節した、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロールからなる緩衝液(0.40ml)中の、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(0.40mg)の溶液を、pH7.5に調節した100mMのHEPESおよび150mMのNaClの溶液(4ml、2.12mg、76nmol)中の、0.53mg/mlの濃度の、そのC末端にFlagタグを有し、位置248のシステインにS-S橋を介して余分なCysが付着したAP3 scFv LC-HC C34S S248Cの溶液に加えた。反応混合物を20 で穏やかに振盪した。これを2つの部分に分割した。pH7.0に調節した25mMのHEPESの緩衝液を用いて、そのそれぞれをPD-10カラム(GE-Healthcare)に加えた。カラムの溶出液(そのそれぞれは3.5ml)を合わせた。

【0169】

pH7.0に調節した25mMのHEPESの緩衝液(0.43ml)中のN-((3-(-(3-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロピロール-1-イル)プロピオニルアミノ)10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-O²-[5']シチジリル-ノイラミン酸(3.3mg、305nmol)の溶液をタンパク質の溶液に加えた。反応混合物を20 で4時間、穏やかに振盪した。これを10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に入れた。これを4000rpm、10 で10分間の超遠心に供した。混合物を精製時まで冷凍庫で保管した。

【0170】

精製には、混合物を解凍した。これを、直径16mmおよび長さ60cmの床サイズを有するSuperdex200ゲル上の、流速1ml/分、およびpH8.0に調節した25mMのトリスおよび150mMのNaClの緩衝液を利用した、サイズ排除クロマトグラフィーに供した。所望の生成物を含有する画分をプールして、1.61mgの所望のタンパク質が得られた。SDS-PAGEゲルは予想と一致していた。物質が多く凝集タンパク質を含有していたことが見出された。

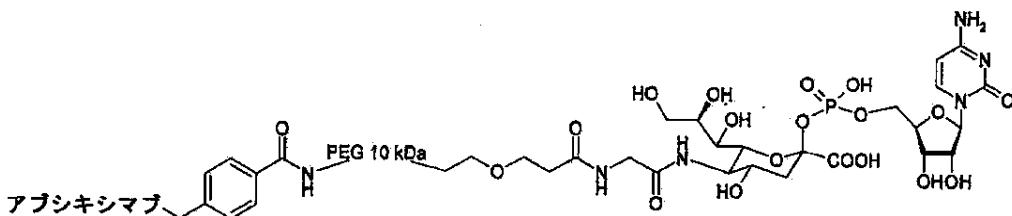
【0171】

(中間体実施例4)

N-((3-(-(4-ホルミルベンゾイルアミノ)10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-O²-[5']シチジリル-ノイラミン酸とアブシキシマブの1つのN末端とのコンジュゲーション

【0172】

【化11】



【0173】

市販のアブシキシマブの溶液(ReoPro、10mg、215nmol、市販の緩衝液中に2mg/mlの溶液)を、10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に入れた。pH7.4に調節した25mMのHEPESからなる緩衝液(5ml)を加えた。超遠心を4000rpm、10 で10分間行った。pH7.4に調節した25mMのHEPESからなる緩衝液(10ml)を加えた。超遠心を4000rpm、10 で10分間行った。pH7.4に調節した25mMのHEPESからなる緩衝液(10ml)を加えた。超遠心を4000rpm、10

で10分間行った。0.65mlの残りの溶液をプラスチック反応器内に入れた。pH7.4に調節した25mMのHEPESからなる緩衝液(3.85ml)を加えた。pH7.0に調節した25mMのHEPESからなる緩衝液(1.5ml)中のN-((3-(-(4-ホルミルベンゾイルアミノ)10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-O²-[5']シチジリル- -ノイラミン酸(14mg、1290nmol)の溶液を加えた。反応混合物を300rpmで3分間、20°で穏やかに振盪した。新しく調製した水中に1.0Mのシアノボロ水素化ナトリウムの溶液(0.025ml)を加えた。反応混合物を300rpm、20°で穏やかに振盪した。1時間後、別の部分のシアノボロ水素化ナトリウムの溶液(0.025ml)を加えた。1時間後、別の部分のシアノボロ水素化ナトリウムの溶液(0.025ml)を加えた。1時間後、別の部分のシアノボロ水素化ナトリウムの溶液を加えた。溶液を300rpm、20°で16時間、穏やかに振盪した。反応混合物を10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に入れた。これを4000rpmで10分間、18°の超遠心に供した。0.360mlの残りの溶液を濾過し、直径16mm×60cmの床サイズを有するSuperdex200ゲル上の、流速1ml/分、pH8.0に調節した25mMのトリス、150mMのNaClの緩衝液を溶出液として利用した、サイズ排除クロマトグラフィーに供した。所望の生成物を含有する画分を2つのバッチで合わせた。これらのバッチのそれぞれを、10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に入れた。これらを4000rpm、10°で10分間の超遠心に供し、それぞれ2.67mgおよび3.27mgが得られた。定量には、10.94のモル吸光度をNanodrop(登録商標)分光光度計で用いた。SDS-PAGEによる生成物の分析は、N-((3-(-(4-ホルミルベンゾイルアミノ)10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-O²-[5']シチジリル- -ノイラミン酸とアブシキシマブの1つのN末端とのコンジュゲートについて予想と一致していた。

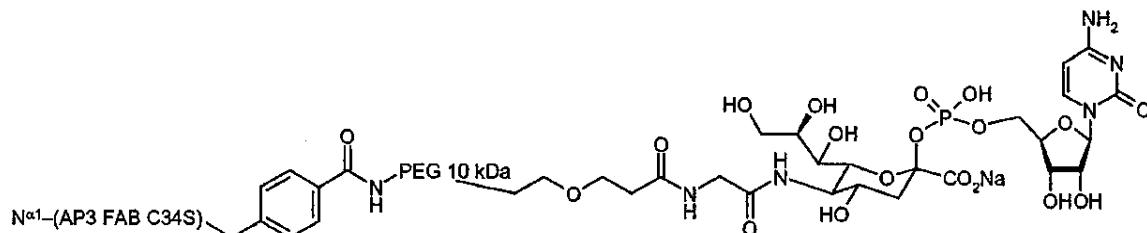
【 0 1 7 4 】

(中間体実施例5)

N-((3-(-(4-ホルミルベンゾイルアミノ)10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-O²-[5']シチジリル- -ノイラミン酸とAP3-FAB断片との、そのN末端のうちの1つでの反応

[0 1 7 5]

【化 1 2】



【 0 1 7 6 】

MのNaCl、pH8.00からなる緩衝液(2.2ml)を加えた。混合物を4000rpm、20 で22分間の超遠心に供した。25mMのトリス、25mMのNaCl、pH8.00からなる緩衝液(3.2ml)を加えた。混合物を4000rpm、20 で12分間の超遠心に供した。25mMのトリス、25mMのNaCl、pH8.00からなる緩衝液(2.2ml)を約0.120mlの混合物に加えた。この混合物を2つの等しい部分に分割した。このそれを、25mMのトリス、25mMのNaCl、pH8.00からなる緩衝液で平衡化したスピンQカラム(VIVAPURE Q MINI M、Sartorius、製品番号VS-1X01QM24)に加えた。それぞれのカラムを2000rpm、室温で5分間の超遠心に供した。25mMのトリス、25mMのNaCl、pH 8.00からなる緩衝液(0.400ml)をそれぞれのスピンカラムに加えた。それぞれのカラムを2000rpm、室温で5分間の超遠心に供した。25mMのトリス、500mMのNaCl、pH8.00からなる緩衝液(0.400ml)をそれぞれのスpinカラムに加えた。それぞれのカラムを2000rpm、室温で5分間の超遠心に供した。濾液を合わせ、10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に入れた。これらを4000rpm、18 で8分間の超遠心に供した。得られた溶液を精製時まで-80 で保管した。

【0177】

溶液を解凍し、直径16mm×600mmの床サイズを有するSuperdex75カラム上の、流速0.80ml/分、25mMのトリス、150mMのNaCl、pH8.00の緩衝液を利用した、サイズ排除クロマトグラフィーに供した。SDS-PAGEによって判断して所望の生成物を含有する画分をプールし、10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に入れた。これらを4000rpm、18 で18分間の超遠心に供した。可能な限り早く、0.280mlの溶液を-80 で凍結した。13.05のモル吸光度を用いたNanodrop(登録商標)装置での定量により、0.23mg/mlの濃度が示された。生成物は、SDS-PAGEにおいて銀染色によって予想されたバンドを示した。Kurfurst, M.M.、Analytical Biochemistry、200、244～248頁、1992年に記載の染色手順を用いて、未反応のPEGはSDS-PAGE上で同定されなかった。

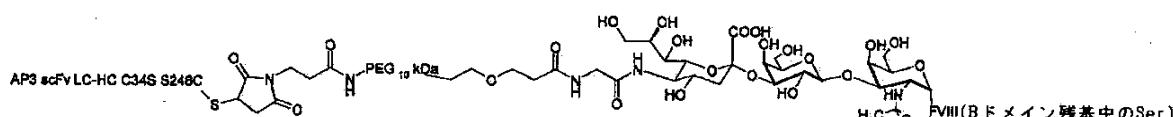
【0178】

(実施例14)

AP3 scFv LC-HC C34S S248CとFVIIIとのコンジュゲーション

【0179】

【化13】



【0180】

pH7.35に調節した、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、150mMのNaCl、0.02%のTween80および1Mのグリセロールからなる緩衝液(0.018ml)中の、重鎖のC末端にSFSQNSRHPSENPPVLRKRHQR(配列番号4)の残留Bドメイン配列を有するBドメイン欠失のFVIII(1mg、5.64mmol)の溶液を、10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に入れた。pH8.0に調節した25mMのトリスおよび150mMのNaClの溶液(0.680ml)中の、N-((3-((3-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロピロール-1-イル)プロピオニルアミノ)10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-O²-[5']シチジリル-ノイラミン酸をAP3 scFv C34S S248CのCys248に付着させた生成物(中間体実施例3/実施例13、1.29mg、34nmol)の溶液を加え、続いて、pH6.07に調節した、20mMのヒスチジン、10mMのCaCl₂、10%のグリセロール、0.02%のTween80、500mMのNaClからなる緩衝液(3ml)を加えた。混合物を4000rpm、10 で20分間の超遠心に供した。残りの体積は、0.800mlまたはFVIIIが1.25mg/mlであった。続いて、A. ureafaciensからのシアリダーゼの溶液(0.43mg/ml、302U/mg、0.0049ml、0.645U)およびST3-Gal-Iの溶液(2.5mg/ml、0.105mg、0.042ml)を加えた。反応混合物を32 で1分間、穏やかに振盪し、その後、32 で18時間静置した。これを精製時まで冷凍庫で保管した。

【0181】

反応混合物を解凍した。これを2つの部分に分割し、そのそれを、直径10mmおよび

10

20

30

40

50

長さ300mmの床サイズを有するSuperose6ゲル、流速0.30ml/分、pH7.35に調節した、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、150mMのNaCl、および1Mのグリセロールからなる緩衝液を溶出液として用いた、サイズ排除クロマトグラフィーに供した。所望の生成物を含有する、両方の実行のすべての画分をプールした。これらを10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に入れ、4000rpm、10で18分間の超遠心に供した。

【0182】

続いて、pH7.35に調節した、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、150mMのNaCl、および1Mのグリセロールからなる緩衝液(0.100ml)中のCMP-N-アセチルノイタミン酸(CMP NeuNac、1.5mg、2597nmol)の溶液および0.33mg/mlのST3Gal-IIIの溶液(0.10ml、0.033mg)を加えた。反応混合物を300rpmで穏やかに振盪し、その後、精製時まで冷凍庫で保管した。

【0183】

反応混合物を2つの部分に分割した。これらのそれぞれを、0.00045mmのフィルターを通して濾過した。これらを、CNBrで活性化させた後にF25抗体を付着させた、直径5mmおよび長さ5cmの床サイズを有するセファロースカラムに施用した。F25は、FVIIIに対する既知の抗体である。施用後、pH7.35に調節した、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、150mMのNaCl、および1Mのグリセロールからなる緩衝液、流速0.6ml/分を用いて、カラムを3倍カラム体積洗浄した。その後、これを、pH7.35に調節した、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、および650mMのNaClからなる緩衝液、流速0.6ml/分を用いて、3倍カラム体積洗浄した。最後に、化合物を、pH7.35に調節した、50%v/vのエチレングリコール/水の溶液中の20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、2.5MのNaClからなる緩衝液、流速0.1ml/分を用いて、6倍カラム体積以内で溶出させた。所望の生成物を含有する、両方の実行の画分をプールした。これらを10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に入れた。これらを4000rpm、10で14分間の超遠心に供した。残りの溶液を、直径10mmおよび長さ30cmの床サイズを有するSuperose6物質上の、流速0.50ml/分、pH7に調節した、10mMのヒスチジン、1.7mMのCaCl₂、0.01%のTween80、0.3MのNaCl、8.8mMのスクロースからなる緩衝液を利用した、サイズ排除クロマトグラフィーに供した。適切な純度の所望の化合物を含有する画分をプールし、10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に入れた。これらを4000rpm、9で12分間の超遠心に供した。14.46のモル吸光度を用いて、収量は0.0176mgのAP3 scFv LC-HC C39S S248CとFVIIIとのコンjugateであることが判明した。非還元条件下でのSDS-PAGEゲルによる分析は予想と一致していた。クロマトグラフィー中のピークの形状から、物質が多く凝集タンパク質を含有していたことが結論づけられた。

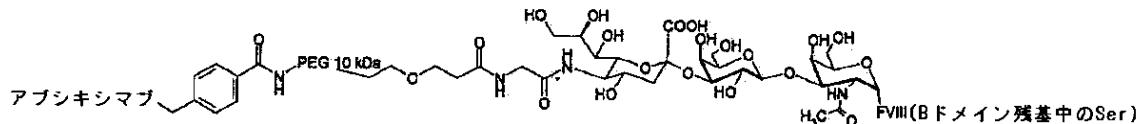
【0184】

(実施例15)

アブシキシマブとFVIIIとのO-グリカンでのコンジュゲーション

【0185】

【化14】



【0186】

pH7.35に調節した、20mMのヒスチジン、10mMのCaCl₂、150mMのNaCl、0.02%のTween80および1Mのグリセロールからなる緩衝液(2.5ml)を、pH7.35に調節した、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、150mMのNaCl、0.02%のTween80および1Mのグリセロールからなる緩衝液中の、重鎖のC末端にSFSQNSRHPSPNPPVLKRHQR(配列番号4)の残留Bドメイン配列を有するBドメイン欠失のFVIII(5.7mg/ml、1mg、5.6nmol)の溶液に加えた。pH8.0に調節した25mMのトリス、150mMのNaClからなる緩衝液(0.323ml)中の、N-((3-(-(4-ホルミルベンゾイル

10

20

30

40

50

アミノ)10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-O²-[5']シチジリル- -ノイラミン酸とアブシキシマブの1つのN末端とのコンジュゲート(中間体実施例4、実施例13、2.3mg、39.5nmol)の溶液を加えた。溶液を10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に入れた。これを4000rpm、10 で20分間の超遠心に供した。pH7.35に調節した、20mMのヒスチジン、10mMのCaCl₂、150mMのNaCl、0.02%のTween80および1Mのグリセロールからなる緩衝液(2ml)を加えた。溶液を4000rpm、10 で30分間の超遠心に供し、溶液は1.4mlの体積が残った。続いて、A. ureafaciensのシアリダーゼの溶液(0.4mg/ml、242U/mg、0.0066ml)およびST3Gal-Iの溶液(2.5mg/ml、0.042ml)を加えた。

【0187】

反応混合物を32 で15分間、穏やかに振盪した。その後、反応混合物を32 で20.5時間 10 、静置した。反応混合物を10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に入れた。これを4000rpm、10 で15分間の超遠心に供した。0.300mlの残りの溶液を、直径10mm×300mm の床サイズを有するSuperose6物質、流速0.5ml/分を用いた、pH7に調節した、10mMのヒスチジン、1.7mMのCaCl₂、0.01%のTween80、0.3MのNaCl、8.8mMのスクロースからなる緩衝液を溶出液として使用した、サイズ排除クロマトグラフィーに供した。所望の生成物を含有する画分をプールし、10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に入れた。pH6.07 に調節した、20mMのヒスチジン、10mMのCaCl₂、10%のグリセロール、0.02%のTween80、50 0mMのNaClからなる緩衝液(2.5ml)を加えた。溶液を4000rpm、10 で15分間の超遠心に供した。pH6.07に調節した、20mMのヒスチジン、10mMのCaCl₂、10%のグリセロール、0.02% 20 のTween80、500mMのNaClからなる緩衝液(1.5ml)を加えた。溶液を4000rpm、10 で15分間 の超遠心に供した。0.220mlの残りの溶液をプラスチック反応器内に入れた。pH6.07に調節した、20mMのヒスチジン、10mMのCaCl₂、10%のグリセロール、0.02%のTween80、500mM のNaClからなる緩衝液(0.173ml)中の市販のCMP NeuNAc(1.73mg、2800nmol)の溶液を加えた。反応混合物を300rpm、32 で1時間、穏やかに振盪した。これを、直径10mm×300mmの床サイズを有するSuperose6物質、流速0.5ml/分を用いた、pH7に調節した、10mMのヒスチジン、1.7mMのCaCl₂、0.01%のTween80、0.3MのNaCl、8.8mMのスクロースからなる緩衝液を溶出液として使用した、サイズ排除クロマトグラフィーに供した。所望の生成物を含有する画分をプールし、10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に入れた。プールを4 000rpm、10 で5分間の超遠心に供して、0.275mlの0.0358mgの、アブシキシマブとFVIII 30 とのO-グリカンでのコンジュゲーション生成物の溶液が得られた。定量には、13.15のモル吸光度をNanodrop(登録商標)分光光度計で用いた。SDS-PAGE分析は、アブシキシマブとFVIIIとのO-グリカンでのコンジュゲーション生成物のSDS-PAGEについて予想と一致していた。

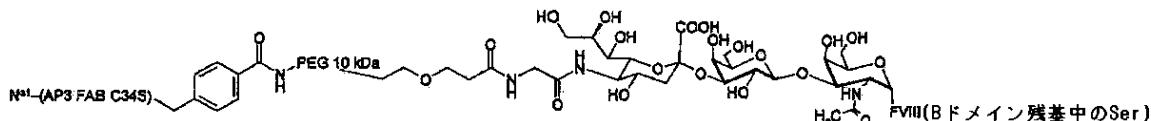
【0188】

(実施例16)

AP3-FAB断片とBDD-FVIIIとのコンジュゲーション

【0189】

【化15】



【0190】

中間体実施例5の反応の生成物を、10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に入れた。20mMのヒスチジン、10mMのCaCl₂、10%のグリセロール、0.02%のTween80、500mMのNaClからなる緩衝液、pH6.07(4ml)を加えた。溶液を4000rpm、20 で12分間の超遠心に供した。pH7.35に調節した、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、150mMのNaCl、0.02%のTween 80および1Mのグリセロールからなる緩衝液(0.088ml)中の、重鎖のC末端にSFSQNSRHPSPQNPP VLKRHQR(配列番号4)の残留Bドメイン配列を有するBドメイン欠失のFVIII(0.5mg、2.8nmol 50)

)の溶液を、残りの0.600mlに加えた。溶液を4000rpm、20°で30分間の超遠心に供した。残りの0.125mlをエッペンドルフバイアル中に入れた。続いて、His6 TAGを有するA. urea faciensのシアリダーゼの溶液(0.4mg/ml、0.0033ml)およびST3Gal-Iの溶液(2.5mg/ml、0.021ml)を加えた。反応混合物を300rpm、32°で穏やかに振盪した。20分後、振盪を停止し、反応混合物を32°で19時間静置した。これを濾過し、直径10mm×300mmの床サイズを有するSuperose6物質を用いた、pH7に調節した、10mMのヒスチジン、1.7mMのCaCl₂、0.01%のTween80、0.3MのNaCl、8.8mMのスクロースからなる緩衝液を溶出液として流速0.500ml/分で使用した、サイズ排除クロマトグラフィーに供した。SDS-PAGEによって判断して所望の化合物を含有する画分をプールした。プールを10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心装置に移した。これを4000rpm、20°での超遠心に供した。残りの0.270ml中の所望の生成物の濃度は、13.61のモル吸収を用いて、Nanodrop装置で0.29mg/mlであることが決定された。単離した生成物の還元および非還元条件の両方の下におけるSDS-PAGEの結果は、AP3のFAB断片とFVIIIとのコンジュゲートの存在と一致していた。
10

【0191】

(実施例17)

N8-(O)-PEG10kD-CHOとAP3-ONH₂とのカップリングで得られるAP3-N8コンジュゲート、化合物MZ1

(中間体実施例A):AP3抗体のN-グリカン上へのヒドロキシルアミンハンドルの導入

第1ステップ:AP3抗体N-グリカンのガラクトシド化:

AP3 FL IgGのN-グリカンは、ほとんどが複雑な二分岐の型である。二分岐のN-グリカンの大多数は、2つのN-アセチルグルコサミン部分、すなわち1つのN-アセチルグルコサミン部分および1つのガラクトース部分を最終単糖部分(G0F、G1F)として保有する。軽鎖は、1つのシアル酸および1つのガラクトース部分を有する二分岐グリカンを最終単糖として有する。G0FおよびG1Fグリカンを、(ウシ) 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼに触媒される、ガラクトース-UDPからのガラクトースの移動によって、G2F型へと変換し。手短に述べると、50mMのMES緩衝液、pH6.4中のAP3 FL IgG抗体の溶液(3mg、800μl)に、50mMのMES緩衝液、pH6.4(500μl)、ガラクトース-UDP(500μl)の、140mMのNaCl、3mMのKClを含有する10mMのリン酸緩衝液、pH7.4中の12.2mg/mlの溶液)および塩化マンガン(100μlの水中の12.6mg/mlの溶液)を加えた。反応は、1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ(100μlの、100mMのHEPES、pH7.5緩衝液中の10U/ml酵素溶液)を加えることによって開始させた。反応混合物を終夜25°でインキュベートした。
20
30

【0192】

第2ステップ:AP3抗体のN-グリカン上へのヒドロキシルアミンハンドルの導入

第1のステップで得られたガラクトシル化した抗体(3mg、2ml)に、GSC-ONH₂(190μlの10mMのリン酸緩衝液(140mMのNaCl、3mMのKClを含有)、pH7.4中に5.8mg)を加えた。反応は、ST3Gal III(80μl、0.4mg、480mU)を加えることによって開始させた。

【0193】

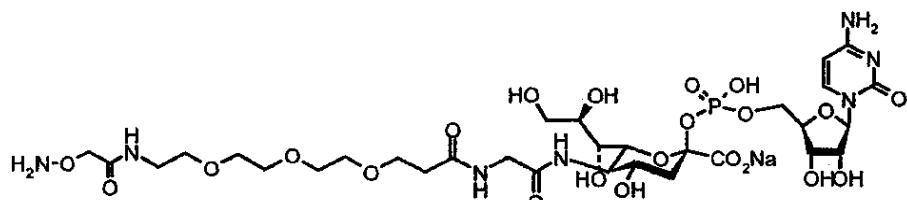
反応混合物を32°で21時間インキュベートした。

【0194】

GSC-ONH₂:5'--(2-(12-((アミノキシメチルカルボニル)アミノ)-4-7-10-トリオキサドデカノイル)-アミノエタノイル)-ノイラミン酸シチジン-リン酸
40

【0195】

【化16】



【0196】

続いて、すべての修飾されていないガラクトース部分を、PBS緩衝液中のNAN-CMPの溶液(4.5mg、100μl)を加えることによってキャップした。反応混合物を1時間25分でインキュベートした。

【0197】

その後、反応混合物を濾過し(0.45μmのフィルター、Gelman GHP)、150mMのNaClを含有する20mMのリン酸緩衝液、pH7.2に変えた(限外濾過による、Millipore遠心フィルターユニットAmicon Ultra、0.5ml装置、10kDのカットオフ)。

【0198】

精製は、Akta Purifier10システム(GE Healthcare)を用いてHiTrapタンパク質A HPカラム(1ml)上で実行した。ローディングおよび洗浄緩衝液は150mMのNaClを含有する20mMのリン酸緩衝液、pH7.2であり、溶出緩衝液は10Mの水酸化ナトリウムでpH3.5に調節した10mMのギ酸であった。流速は0.5ml/分であり、画分体積は0.5mlであった(ディープウェルマイクロタイタープレート中の分画)。分画の前に、生成物が酸性pHに保たれることを回避するために、0.1Mのトリス緩衝液、pH9(15μl)をマイクロタイタープレートのウェルに加えた。関連する画分をプールし、濃縮し、緩衝液を緩衝液Aに変えて(限外濾過による、Millipore遠心フィルターユニットAmicon Ultra、0.5ml装置、10kDのカットオフ)、生成物(「AP3-ONH2」)が50%(1.5mg、0.91mg/ml)の全体的なタンパク質回収率で得られた。

【0199】

ヒドロキシルアミン部分の導入が成功したかどうかを確認するために、PEG20kD-CHO(緩衝液A中の60モル当量のPEG20kD-CHOの溶液)を用いて生成物のアリコートをpeg化した。還元条件下でNuPage4~12%のビス-トリスゲル(Invitrogen)を用いたSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動分析(200V、40分間)を行った。SimplyBlue SafeStain(Invitrogen)を用いてゲルをクマシーブルー染色した。標準タンパク質はInvitrogenからのものであった(Novex Sharp未染色標準(3.5~260kD))。ゲルにより軽鎖の消失が示され(peg化されていないN-グリカンで修飾されたAP3の軽鎖は約32kDに現れる)、約55kDで残りの重鎖に対応するかすかなバンドのみが存在していた。4つの新しいバンドが約70、100、130、170kDで現れ、これらはそれぞれpeg化LCグリカン、モノpeg化Fcグリカン、ジpeg化Fcグリカンおよび未定義の生成物に対応すると仮定された。

【0200】

このようにして、ヒドロキシルアミン部分がAP3上に導入された。

【0201】

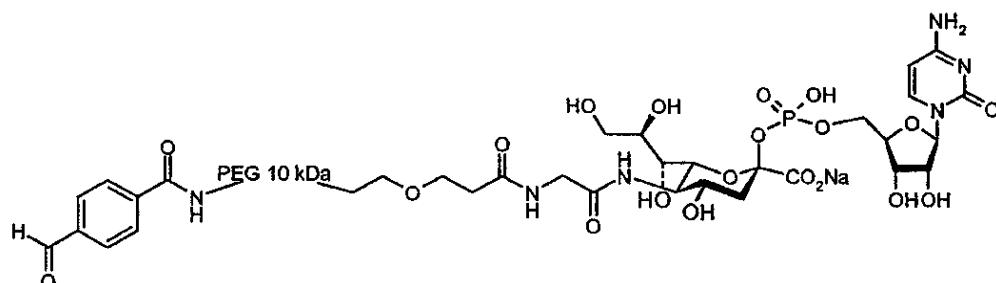
(中間体実施例B):N8-O-グリカン上へのアルデヒドハンドルの導入:

第1ステップ:N8の脱シアリル化およびO-グリカン上のGSC-PEG10kD-CHOの、ST3Gal1に触媒される移動(1ポット):

GSC-PEG10kD-CHO:N-((3-(-(4-ホルミルベンゾイルアミノ)10kDa PEGイル)プロピオニルアミノ)アセチル)-O²-[5']シチジリル- -ノイラミン酸。

【0202】

【化17】



【0203】

20mMのイミダゾール緩衝液、pH7.3、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、0.5MのNaCl中のN8の溶液(263μl、1.5mg)に、シアリダーゼの溶液(Arthrobacter ureafaciensからのシアリダーゼ)(7μl、680mU)を加え、次いでPBS緩衝液中のGSC-PEG10kD-CHO

10

20

30

40

50

の溶液(68 μ l、1.85mg)および50mMのトリス、100mMのNaCl、pH8中のHis-ST3Gal Iの溶液(108 μ l、0.27mg)を加えた。反応混合物を23 ℃で24時間インキュベートした。

【0204】

イオン濃度を下げるために20mMのイミダゾール緩衝液、pH7.3、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロールで希釈した後、混合物を、Akta purifier10システム(GE Healthcare)を用いた陰イオン交換(MonoQ5/50GLカラム、GE Healthcare)によって精製した。混合物を、20mMのイミダゾール、pH7.3、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロールで平衡化したMonoQ5/50GLカラムに載せた。溶出緩衝液Bは、20mMのイミダゾール、pH7.3、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1.5MのNaCl、1Mのグリセロールであった。溶出プログラムは、0~20%のB、5倍カラム体積、20%のB、10倍カラム体積、100%のB、10倍カラム体積、流速0.5ml/分であった。生成物は100%の溶出緩衝液で溶出された。関連する画分をプールした。収量は1.2mg、80%のタンパク質回収率であった。

【0205】

第2ステップ:キャッピング:

濃縮した第1のステップで得られた生成物の溶液(1.13mgのタンパク質、400 μ l)に、PBS緩衝液中のNAN-CMPの溶液(40 μ l、1.05mg)を加えた。反応はST3Gal III(110 μ l、110 μ g、0.13U)を加えることによって開始させた。反応混合物を32 ℃で1時間インキュベートした。

【0206】

その後、わずかに改変した溶出プログラム(ステップ1の精製方法と比較して)を用いて、反応混合物をMonoQ上で精製した。溶出プログラムは、0~13%のB、5倍カラム体積、13%のB、10倍カラム体積、100%のB、10倍カラム体積、流速0.5ml/分であった。生成物(「N8-(0)-PEG10kD-CHO」(N8:この生成物はデス-O-グリカンおよび(0)-PEG-CHO-N8の混合物である)は100%の溶出緩衝液で溶出された。関連する画分をプールした。収量は0.96mg、80%のタンパク質回収率、すなわちN8からの全体的なタンパク質回収率は64%であった。

【0207】

還元条件下でNuPage7%のトリスアセテートゲル(Invitrogen)を用いたSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動分析(150V、70分間)を実行した。SimplyBlue SafeStain(Invitrogen)を用いてゲルをクマシーブルー染色した。

【0208】

標準タンパク質はInvitrogenからのものであった(HiMark未染色高分子量)。得られたパターンは予想どおり、すなわち、それぞれ軽鎖、重鎖、およびpeg化重鎖に対応している可能性がある、分子量約84kD、93kDおよび120kDの3つのバンドであった。93および120kDでのバンドはほぼ同じ強度である。N8の約50%のみがそのBドメイン上にO-グリカンを保有するため、これは予想されていた。

【0209】

このようにして、N8上へのアルデヒドハンドルの導入が成功した。

【0210】

N8-(0)-PEG10kD-CHOとAP3-ONH₂とのカップリング

中間体実施例Bに従って調製したN8-(0)-PEG10kD-CHOの緩衝液を10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、0.5MのNaClを含有する50mMのイミダゾール緩衝液、pH6.2に変え、限外濾過(Millipore遠心フィルターユニットAmicon Ultra、0.5ml装置、50kDのカットオフ)によって約1.6mg/mlの濃度まで濃縮した。同様に、中間体実施例Aに従って調製したAP3-ONH₂の緩衝液を10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、0.5MのNaClを含有する50mMのイミダゾール緩衝液、pH6.2に変え、限外濾過(Millipore遠心フィルターユニットAmicon Ultra、0.5ml装置、10kDのカットオフ)によって約34.7mg/mlの濃度まで濃縮した。

【0211】

上記の濃縮したAP3-ONH₂溶液(45 μ l、1.56mg)に濃縮したN8-(0)-PEG10kD-CHOの溶液(21.5 μ l、244 μ g)を加え、次いでアニリンの水溶液(5 μ l、180 μ g)を加えた。混合物を25 ℃で終夜インキュベートした。アセトン(1.8 μ l、1.4mg、約600モル当量)を加えることによ

つて未反応のヒドロキシルアミン部分を反応停止させた。反応混合物を30分間、25℃でインキュベートした。

【0212】

反応混合物を20mMのイミダゾール緩衝液、pH7.3、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、25mMのNaClで3mlまで希釈し、濾過し(0.45μのGelman GHPフィルター)、MonoQカラム5/50GL(GE Healthcare)上のイオン交換によって精製した。ローディングおよび洗い流し緩衝液(緩衝液A)は20mMのイミダゾール緩衝液、pH7.3、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、25mMのNaClであり、溶出緩衝液(緩衝液B)は20mMのイミダゾール緩衝液、pH7.3、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、1MのNaClであった。溶出プログラムは4つのステップ、すなわち、0~20%のB、4倍カラム体積、20%のB、10倍カラム体積、20~100%のB、16倍カラム体積、100%のB、5倍カラム体積からなっていた。流速は0.5ml/分であり、温度は15℃であった。1ml画分が最初の2つのステップで回収され、0.5ml画分が最後の2つのステップで回収された。

【0213】

AP3-ONH₂は最初にほぼ20%のBで溶出され、残りの物質は、30~65%のBで、1つの主ピークおよびいくつかの完全に分解されていない副ピークとして溶出された。濃度後(限外濾過による、50kDのカットオフ)、画分をNuPage7%のトリスアセテートゲル(Invitrogen)を用いたゲル電気泳動(150V、70分間)によって分析した。SimplyBlue SafeStain(Invitrogen)を用いてゲルをクマシーブルーカラム染色した。標準タンパク質はInvitrogenからのものであった(HiMark未染色高分子量)。30~65%のBに溶出される物質の主ピーク(ピークのトップは52%のBで溶出される)は、コンジュゲートした物質に対応する。

【0214】

非還元のコンジュゲートした物質は、分子量84kD、285kD、および>500kD(非常にかすかなバンド)でゲル上に3つのバンドを示す。これらは、それぞれN8-(0)-PEG10kD-AP3の(N8)軽鎖、N8-(0)-PEG10kD-AP3の(N8)重鎖(非還元のN8-(0)-PEG10kD-CHOの対照試料では、重鎖は約110kDに現れ、非還元のAP3-ONH₂の対照試料は約176kDに現れる)、および未同定の化合物に対応すると仮定される。

【0215】

還元のコンジュゲートした物質は、それぞれN8-(0)-PEG10kD-AP3の(N8)軽鎖、AP3の軽鎖とコンジュゲートしたN8-peg化重鎖、およびAP3の重鎖とコンジュゲートしたN8-peg化重鎖に対応すると仮定される、分子量84kD、145kDおよび170kDでゲル上に3つのバンドを示す。回収されたコンジュゲートした物質の量は、N8-PEG10kD-CHOから129μg、53%の収率であった。

【0216】

(実施例18)

(5R,6R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ-ピリミジン-1-イル)-3,4-ジヒドロキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]メトキシ-オキシド-ホスホリル]オキシ-4-ヒドロキシ-5-[[2-[3-(2-ピリジルジスルファニル)プロパノイルアミノ]アセチル]アミノ]-6-[(2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル]テトラヒドロピラン-2-カルボン酸二ナトリウム、化合物1M

【0217】

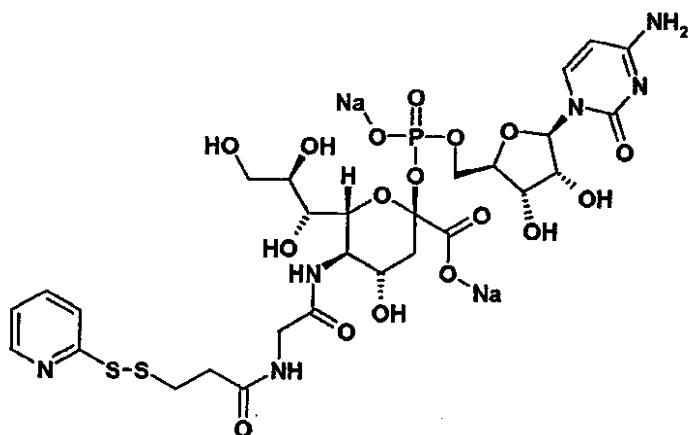
10

20

30

40

【化18】



10

【0218】

S,S'-2,2'-ジチオジピリジン(1.59mmol、350mg)および3-メルカプトプロピオン酸(0.477mmol、50.1mg、41.5マイクロリットル)をテトラヒドロフラン(2ml)中で混合した。

【0219】

混合物を45分間攪拌した。N-ヒドロキシスクシンイミド(0.477mmol、54.9mg)およびN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(0.954mmol、148マイクロリットル)を混合物に加え、
続いてこれを3時間攪拌した。

20

【0220】

(5R,6R)-2-[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ-ピリミジン-1-イル)-3,4-ジヒドロキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]メトキシ-オキシド-ホスホリル]オキシ-4-ヒドロキシ-5-[2-アミノアセチルアミノ]-6-[(2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル]テトラヒドロピラノ-2-カルボン酸二ナトリウム(0.159mmol、100mg)を水(500マイクロリットル)に溶かした。500mMのNa₂HPO₄水溶液/NaH₂PO₄(飽和水溶液)を加えることによってpHを8.5に調節した。水を加えることによって最終体積を2mlに調節した。

【0221】

2つの溶液(テトラヒドロフラン中のNHSエステルおよび水中のヌクレオチド)を混合した。生じた混合物を3時間穩やかに動搖した。水を加えることによって体積を20mlに調節した。逆相HPLC(水中の0~30体積%のアセトニトリル、10%の500mMのNH₄HCO₃水溶液、C₁₈カラム)を用いて粗化合物を精製した。選択された画分をプールした。水酸化ナトリウム(1M、156マイクロリットル)を加えた。生じた混合物を凍結乾燥した。純度および同一性を分析用HPLCおよびLCMSによって決定した([M+H]⁺:827.4)

30

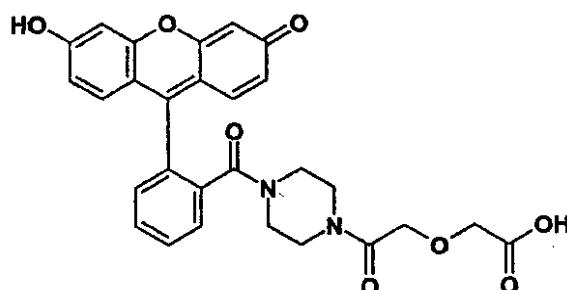
【0222】

(実施例19)

2-[2-[4-[2-(3-ヒドロキシ-6-オキソ-キサンテン-9-イル)ベンゾイル]ピペラジン-1-イル]-2-オキソ-エトキシ]酢酸、化合物2M

【0223】

【化19】



40

【0224】

50

6-ヒドロキシ-9-[2-(ピペラジン-1-カルボニル)フェニル]キサンテン-3-オン塩酸塩(5.72mmol、2.5g)(J. Am. Chem. Soc、2007年、129、8400～8401頁に記載のように調製)を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(50ml)およびテトラヒドロフラン(50ml)の混合物に懸濁させた。混合物を10分間攪拌した。ジグリコール酸無水物(8.58mmol、1.0g)を加えた。3時間後、さらなるジグリコール酸無水物(500mg)を加えた。混合物を20時間攪拌した。発煙塩酸を用いて混合物をpH1まで酸性化した。ジクロロメタン(100ml)および塩酸(1M、100ml)を加えた。ブライン(100ml)および固体塩化ナトリウムを加えた。2つの相の間に固体物が観察された。相を分離した。水相をDCM(3×100ml)で抽出した。合わせた有機相を乾燥させ(Na_2SO_4)、濾過し、真空下で濃縮した。相の間に形成された固体物を濾過によって単離した。固体物をフィルター上で塩酸(1M)に懸濁させた。固体物を塩酸(1M)で連続的に抽出した。濾過した抽出物を水性抽出物と合わせ、生じた溶液を、逆相HPLC(C_{18} カラム、水中の10～35体積%のアセトニトリル、0.1%のトリフルオロ酢酸)を用いて精製した。選択された画分をプールし、凍結乾燥した。LCMS:517.2776[M+H]⁺

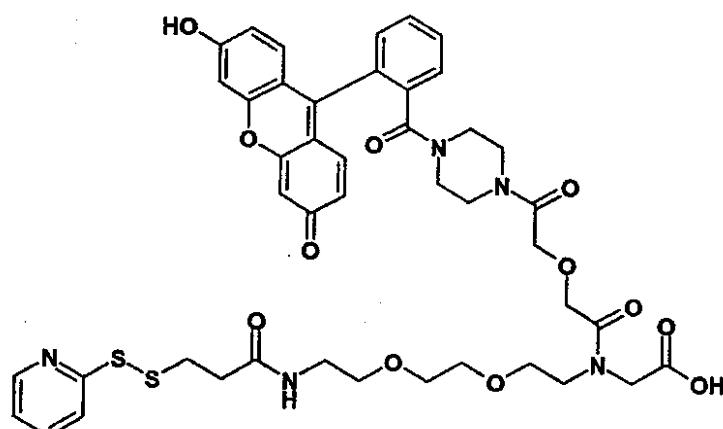
[0 2 2 5]

(実施例20)

2-[[2-[4-[2-(3-ヒドロキシ-6-オキソ-キサンテン-9-イル)ベンゾイル]ピペラジン-1-イル]-2-オキソ-エトキシ]アセチル]-[2-[2-[2-[3-(2-ピリジルジスルファニル)プロパン-1-オキソ]エトキシ]エトキシ]エチル]アミノ]酢酸、化合物3M

[0 2 2 6]

【化 20】



【 0 2 2 7 】

トリチルポリスチレン樹脂(200mg、1.5mmol/g、Pepchem)をフリットシリンジに入れた。塩化チオニル/ジクロロメタン(1:1、5ml)を加えた。混合物を1/2時間振盪した。樹脂をジクロロメタンで洗浄した。

〔 0 2 2 8 〕

ジクロロメタン(3ml)中のプロモ酢酸(0.9mmol、125mg)およびN,N'-ジイソプロピル-エチルアミン(0.9mmol、156マイクロリットル)の混合物を加えた。5分後、さらなるN,N'-ジイソプロピル-エチルアミン(0.9mmol、156マイクロリットル)を加えた。混合物を1/2時間振盪した。樹脂を排液し、ジクロロメタン中のプロモ酢酸およびN,N'-ジイソプロピル-エチルアミンの同じ混合物を樹脂に加えた。混合物を1 1/2時間振盪した。樹脂をジクロロメタン(5×)、メタノール、およびN-メチルピロリドンで洗浄した。メタノール洗浄中、塊の形成をすべて抑制するために激しい振盪を行った。

【 0 2 2 9 】

N-メチルピロリドン(3.75ml)中の1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオクタン(7.5mmol、1100マイクロリットル)の溶液を加えた。混合物を3時間振盪した。樹脂を洗浄した。N-メチルピロリドン(3ml)中の2-アセチルジメドン(3.0mmol、546mg)の溶液を樹脂に加えた。混合物を終夜振盪した。樹脂をN-メチルピロリドンで洗浄した。N-メチルピロリドン(1.8ml)中の2-[2-[4-[2-(3-ヒドロキシ-6-オキソ-キサンテン-9-イル)ベンゾイル]ピペラジン-1-

イル]-2-オキソ-エトキシ]酢酸、化合物2M(155mg、0.3mmol)、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール(0.9mmol)およびN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(0.9mmol、140マイクロリットル)の混合物を樹脂に加えた。混合物を終夜振盪した。樹脂をN-メチルピロリドン(3~4回)で洗浄した。樹脂をヒドラジンおよびN-メチルピロリドン(5体積%のヒドラジン-水和物)の混合物中で2×5分間振盪した。シリングを排液した。樹脂をN-メチルピロリドンで洗浄した。

【0230】

N-メチルピロリドン(3ml)中のS,S'-2,2'-ジチオジピリジン(7.5mmol、1650mg)および3-メルカプトプロピオン酸(3.0mmol、261マイクロリットル)の混合物を1/2時間インキュベートした。N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(1.5mmol、233マイクロリットル)を加えた。生じた混合物を樹脂に加えた。混合物を1 1/2時間振盪した。樹脂をN-メチルピロリドンおよびジクロロメタンで洗浄した。 10

【0231】

樹脂をトリフルオロ酢酸および水の混合物(95:5)で15分間処理した。濾液をジエチルエーテル/n-ヘプタン中で粉末にした。粗化合物を酢酸(2 1/2ml)に溶かした。水(15ml)および少量のアセトニトリルを加えた。混合物を濾過し、逆相HPLC(C₁₈カラム、水中の20~50%のアセトニトリル、0.1%のTFA)を用いて精製した。LCMS:902.2807[M+H]⁺

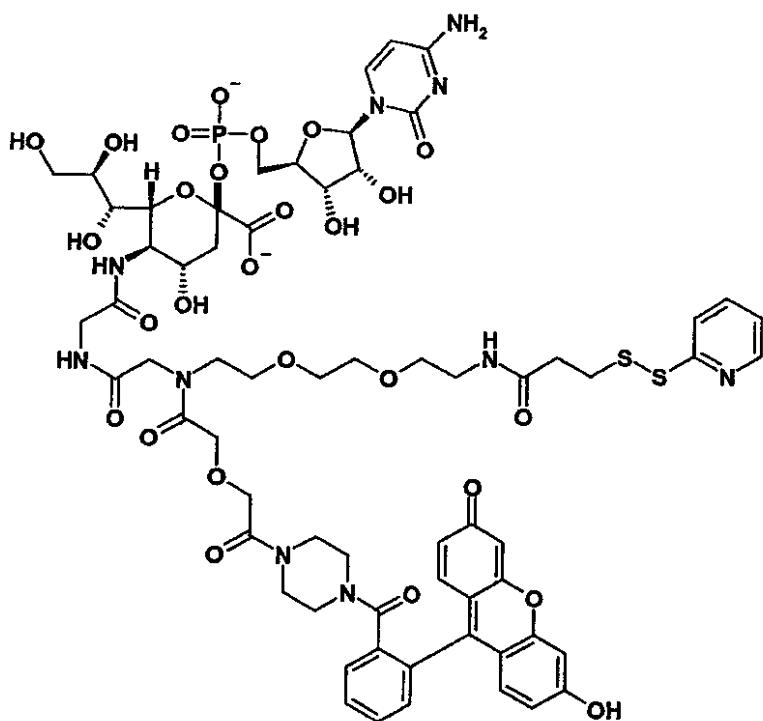
【0232】

(実施例21)

(4S,5R,6R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ-ピリミジン-1-イル)-3,4-ジヒドロキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]メトキシ-オキシド-ホスホリル]オキシ-4-ヒドロキシ-5-[[2-[[2-[[2-[[4-[[2-[[3-ヒドロキシ-6-オキソ-キサンテン-9-イル)ベンゾイル]ピペラジン-1-イル]-2-オキソ-エトキシ]アセチル]-[2-[[2-[[3-(2-ピリジルジスルファニル)プロパノイルアミノ]エトキシ]エトキシ]エチル]アミノ]アセチル]アミノ]アセチル]アミノ]-6-[(1R,2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル]テトラヒドロピラン-2-カルボン酸ジアンモニウム、化合物4M 20

【0233】

【化21】



【0234】

2-[[2-[[4-[[2-[[3-ヒドロキシ-6-オキソ-キサンテン-9-イル)ベンゾイル]ピペラジン- 50

1-イル]-2-オキソ-エトキシ]アセチル]-[2-[2-[3-(2-ピリジルジスルファニル)プロパノイルアミノ]エトキシ]エトキシ]エチル]アミノ]酢酸、化合物3M(0.3mmol、270mg)をテトラヒドロフラン(2ml)に溶かした。N-ヒドロキシスクシンイミド(0.9mmol、104mg)およびN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(1.5mmol、233マイクロリットル)を混合物に加え、続いてこれを1 1/2時間攪拌した。

【0235】

(5R,6R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ-ピリミジン-1-イル)-3,4-ジヒドロキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]メトキシ-オキシド-ホスホリル]オキシ-4-ヒドロキシ-5-[2-アミノアセチルアミノ]-6-[(2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル]テトラヒドロピラン-2-カルボン酸二ナトリウム(0.45mmol、303mg)を水(500マイクロリットル)に溶かした。500mMのNa₂HP₄水溶液/NaH₂PO₄(飽和水溶液)を加えることによってpHを8.5に調節した。水を加えることによって最終体積を2mlに調節した。

10

【0236】

2つの溶液を混合した。生じたpHは7.5~8.0であった。生じた混合物を20時間攪拌した。混合物を水で15mlまで希釈し、濾過し、逆相HPLC(水中の0~35%のアセトニトリル、10%の500mMのNH₄HCO₃水溶液)を用いて精製した。選択された画分をプールし、凍結乾燥した。LCMS:1513.9[M+H]⁺、757.5[M+H]²⁺

【0237】

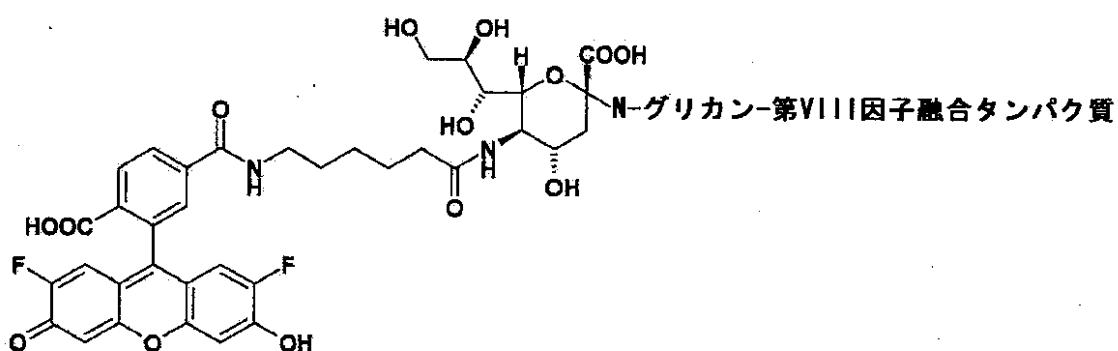
(実施例22)

N-グリカンを介したF8-500 AP3-LC-HC scFv- a3のオレゴングリーン488標識、化合物5M

20

【0238】

【化22】



30

【0239】

水性緩衝液(20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、500mMのNaCl、pH7.3;1.2ml)中の融合タンパク質(F8-500 AP3-LC-HC scFv- a3(配列番号40)、11マイクログラム)をウェルシュ菌からの組換えシアリダーゼ(0.1U)と混合した。最終体積は1.2mlであった。混合物を摂氏25度で30分間静置した。混合物を緩衝液(20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、pH7.3)で10mlまで希釈した。混合物を事前に調整した(緩衝液Aで)MonoQ5/50GLカラム(GE Healthcare)上に載せ、以下のプログラムで溶出させた:10倍カラム体積eq 0%の緩衝液B、2倍カラム体積の未結合の試料の洗い流し(0%の緩衝液B)、10倍カラム体積の0~100%(緩衝液B)、5倍カラム体積の100%の緩衝液B。イミダゾール緩衝液A:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、25mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3。イミダゾール緩衝液B:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1MのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3。

40

【0240】

選択された画分をプールし、(2R,5R,6R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ-ピリミジン-1-イル)-3,4-ジヒドロキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]メトキシ-オキシド-ホスホリル]オキシ-5-[6-[[4-カルボキシ-3-(2,7-ジフルオロ-3-ヒドロキシ-6-オキソ-キサンテン-9-イル)ベンゾイル]アミノ]ヘキサノイルアミノ]-4-ヒドロキシ-6-[(2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル]テトラヒドロピラン-2-カルボン酸二ナトリウムおよびシアリル

50

トランスフェラーゼ(rat rec. ST3Gal1111)と混合した。最終濃度は、第VIII因子:0.026マイクロモーラー、蛍光標識試薬:39マイクロモーラー、ST3Gal1111:177U/Iであった。最終体積:2.1mlであった。混合物を摂氏32度で4時間インキュベートした。(2R,5R,6R)-5-アセトアミド-2-[[2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ-ピリミジン-1-イル)-3,4-ジヒドロキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]メトキシ-オキシド-ホスホリル]オキシ-4-ヒドロキシ-6-[(2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル]テトラヒドロピラン-2-カルボン酸ニナトリウムを混合物に加えた(最終濃度:54マイクロモーラー)。混合物を摂氏32度で3時間インキュベートした。混合物を緩衝液(20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、NaClなし、pH7.3)で25mlまで希釈した。混合物を事前に調整した(緩衝液Aで)MonoQ5/50GLカラム(GE Healthcare)上に載せ、以下のプログラムを用いて溶出させた:10倍カラム体積eq、5倍カラム体積の未結合の試料の洗い流し、10倍カラム体積の0~25%の緩衝液B、10倍カラム体積の25~28%(緩衝液B)、25倍カラム体積の28~100%の緩衝液B、および10倍カラム体積の100%の緩衝液B。イミダゾール緩衝液A:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、pH7.3。イミダゾール緩衝液B:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1MのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3。

【0241】

SDS-PAGE分析(還元、7%のNuPAGEトリスアセテート、1.0mm、Invitrogen、150V、70分間)により、タンパク質中のフルオロフォアの組み込みが確認された。

【0242】

(実施例23)

N,O-グリカン-アシアロ-BDD第VIII因子、化合物6M

水性緩衝液(20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、500mMのNaCl、pH7.3)中のBDD第VIII因子(1mg)をArthrobacter Ureafaciensからの組換えシアリダーゼと混合した(Biotechnol. Appl. Biochem.、2005年、41、225~231頁)。最終濃度は、第VIII因子:5.7mg/mlおよびシアリダーゼ:1.5U/mlであった。混合物を摂氏25度で30分間静置した。混合物を緩衝液(20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、25mMのNaCl、pH7.3)で20mlまで希釈した。混合物を事前に調整した(緩衝液Aで)MonoQ5/50GLカラム(GE Healthcare)上に載せ、以下のプログラムを用いて溶出させた:0.1倍カラム体積eq 5%の緩衝液B、2倍カラム体積の未結合の試料の洗い流し(5%の緩衝液B)、10倍カラム体積の5~100%(緩衝液B)、5倍カラム体積の100%の緩衝液B。イミダゾール緩衝液A:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、25mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3。イミダゾール緩衝液B:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1MのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3。

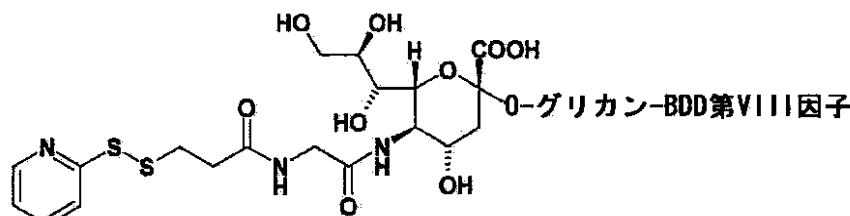
【0243】

(実施例24)

O-グリカンを介してBDD FVIIIとコンジュゲートした3-(2-ピリジルジスルファニル)プロパノイルアミノハンドル、化合物7M

【0244】

【化23】



【0245】

緩衝液(20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、500mMのNaCl、pH7.3)中のアシアロBDD第VIII因子、化合物6(3.95mg)を(5R,6R)-2-[[2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ-ピリミジン-1-イル)-3,4-ジヒドロキシ-テトラヒドロフラン

10

20

30

40

50

-2-イル]メトキシ-オキシド-ホスホリル]オキシ-4-ヒドロキシ-5-[[2-[3-(2-ピリジルジスルファニル)プロパノイルアミノ]アセチル]アミノ]-6-[(2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル]テトラヒドロピラン-2-カルボン酸二ナトリウムおよびシアリルトランスフェラーゼ(ST3GalI)と混合した。最終濃度は、第VIII因子:1.16mg/ml、シアリルトランスフェラーゼ:0.22mg/ml、ヌクレオチド:250マイクロモーラーであった。最終体積:3.4mlであった。混合物を摂氏32度で20時間静置した。(2R,5R,6R)-5-アセトアミド-2-[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ-ピリミジン-1-イル)-3,4-ジヒドロキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]メトキシ-オキシド-ホスホリル]オキシ-4-ヒドロキシ-6-[(2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル]テトラヒドロピラン-2-カルボン酸二ナトリウムを混合物に加えた(最終濃度:54mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、25mMのNaCl、pH7.3)で25mlまで希釈した。

【0246】

混合物を事前に調整した(緩衝液Aで)MonoQ5/50GLカラム(GE Healthcare)上に載せ、以下のプログラムを用いて溶出させた:1倍カラム体積eq 0%の緩衝液B、2倍カラム体積の未結合の試料の洗い流し(0%の緩衝液B)、10倍カラム体積の0~20%の緩衝液B、10倍カラム体積の20%の緩衝液B、10倍カラム体積の100%の緩衝液B。イミダゾール緩衝液A:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、25mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3。イミダゾール緩衝液B:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1MのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3。

【0247】

単離したタンパク質をシアリルトランスフェラーゼ(ST3GalIII)および(2R,5R,6R)-5-アセトアミド-2-[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ-ピリミジン-1-イル)-3,4-ジヒドロキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]メトキシ-オキシド-ホスホリル]オキシ-4-ヒドロキシ-6-[(2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル]テトラヒドロピラン-2-カルボン酸二ナトリウムと混合した。最終濃度は、第VIII因子:1.12mg/ml、シアリルトランスフェラーゼ:0.13mg/ml、ヌクレオチド:54マイクロモーラーであった。最終体積:3.2mlであった。混合物を摂氏32度で1時間静置した。

【0248】

混合物を緩衝液(20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、25mMのNaCl、pH7.3)で40mlまで希釈した。混合物を事前に調整した(緩衝液Aで)MonoQ5/50GLカラム(GE Healthcare)上に載せ、以下のプログラムを用いて溶出させた:5倍カラム体積の未結合の試料の洗い流し(0%の緩衝液B)、5倍カラム体積の0~20%の緩衝液B、15倍カラム体積の20%の緩衝液B、10倍カラム体積の100%の緩衝液B。イミダゾール緩衝液A:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、25mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3。イミダゾール緩衝液B:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1MのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3。

【0249】

SDS-PAGE分析の前に生成物をPEG 30kDaのチオールと共にインキュベートすることで、非還元条件下ではFVIIIよりも高い分子量を有するバンドの存在がもたらされたが、還元条件下ではそうではなかった。

【0250】

(実施例25)

N-グリカンを介してAP3完全長抗体とコンジュゲートした蛍光2-ピリジルジスルファニルハンドル、化合物8M

【0251】

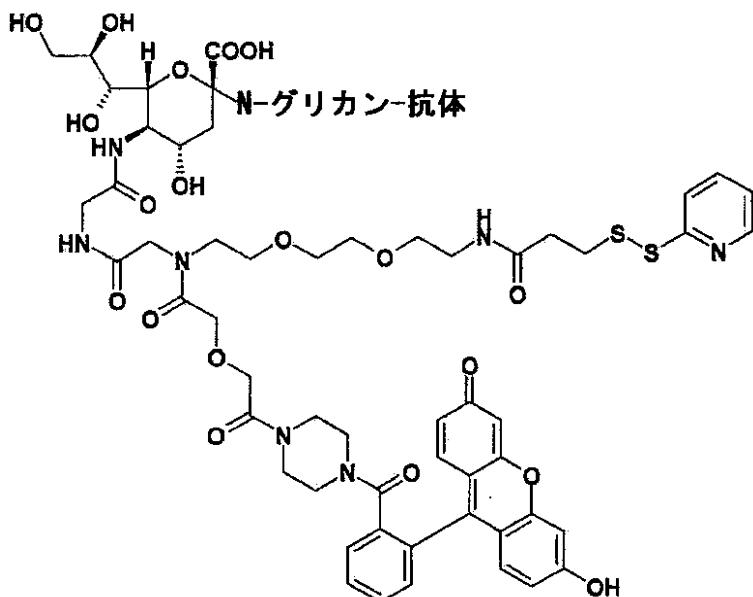
10

20

30

40

【化24】



10

【0252】

水性緩衝液(50%の100mMのHEPES.HCl、150mMのNaCl、pH7.5、33%の100mMのグリシン.HCl、pH3.5、17%の20mMのHEPES.HCl、150mMのNaCl、0.01%のTween80、pH7.5から最終pH7.2)中のAP3 mIgG1 wt HC LC C39S完全長抗体(1.5mg)を、(4S,5R,6R)-2-[[2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ-ピリミジン-1-イル)-3,4-ジヒドロキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]メトキシ-オキシド-ホスホリル]オキシ-4-ヒドロキシ-5-[[2-[[2-[[2-[[2-[[4-[[2-(3-ヒドロキシ-6-オキソ-キサンテン-9-イル)ベンゾイル]ピペラジン-1-イル]-2-オキソ-エトキシ]アセチル]-[2-[[2-[[3-(2-ピリジルジスルファニル)プロパノイルアミノ]エトキシ]エトキシ]エチル]アミノ]アセチル]アミノ]アセチル]アミノ]-6-[(1R,2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル]テトラヒドロピラン-2-カルボン酸ジアンモニウム、化合物4Mおよびシアリルトランスフェラーゼ(ST3GalIII)と混合した。最終濃度は、抗体:1.4mg/ml、シアリルトランスフェラーゼ:0.12mg/ml、ヌクレオチド:190マイクロモーラーであった。最終体積:650マイクロリットルであった。混合物を摂氏32度で19時間静置した。

20

【0253】

試料をMillipore Amicon Ultra遠心装置、分子量カットオフ10,000Daに移した。タンパク質を緩衝液(ヒスチジン、1.5mg/ml、CaCl₂、0.25mg/ml、Tween80、0.1mg/ml、NaCl、18mg/ml、スクロース、3mg/ml、pH7.0)で数回洗浄した。溶液を前記緩衝液中に100マイクロリットルまで濃縮した。SDS-PAGE分析(還元および非還元、7%のNuPAGEトリスアセテート、1.0mm、Invitrogen、150V、70分間)であると決定された280nmおよび500nmでの吸光度により、抗体軽鎖中のフルオロフォアの組み込みが確認された。

30

【0254】

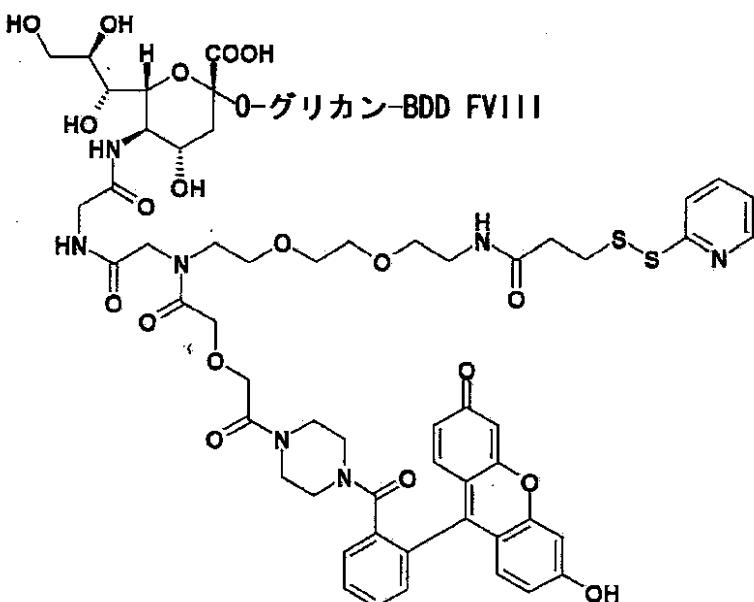
(実施例26)

O-グリカンを介してBDD FVIIIとコンジュゲートした蛍光2-ピリジルジスルファニルハンドル、化合物9M

40

【0255】

【化25】



10

【0256】

緩衝液(20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、500mMのNaCl、pH7.3)中のアシアロBDD第VIII因子、化合物6M(1.86mg)を、(4S,5R,6R)-2-[[2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ-ピリミジン-1-イル)-3,4-ジヒドロキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]メトキシ-オキシド-ホスホリル]オキシ-4-ヒドロキシ-5-[[2-[[2-[[2-[[4-[[2-[(3-ヒドロキシ-6-オキソ-キサンテン-9-イル)ベンゾイル]ピペラジン-1-イル]-2-オキソ-エトキシ]アセチル]-[2-[[2-[[3-(2-ピリジルジスルファニル)プロパノイルアミノ]エトキシ]エトキシ]エチル]アミノ]アセチル]アミノ]アセチル]アミノ]-6-[(1R,2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル]テトラヒドロピラン-2-カルボン酸ジアンモニウム、化合物4Mおよびシアリルトランスフェラーゼ(ST3GalI)と混合した。最終濃度は、第VIII因子:1.5mg/ml、シアリルトランスフェラーゼ:0.3mg/ml、スクレオチド:95マイクロモーラーであった。最終体積:1.25mlであった。混合物を摂氏32度で15時間静置した。(2R,5R,6R)-5-アセトアミド-2-[[2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ-ピリミジン-1-イル)-3,4-ジヒドロキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]メトキシ-オキシド-ホスホリル]オキシ-4-ヒドロキシ-6-[(2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル]テトラヒドロピラン-2-カルボン酸二ナトリウム(最終濃度:2.5mM)およびST3GalIを混合物に加えた。混合物を摂氏32度で30分間インキュベートした。混合物を緩衝液(20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、150mMのNaCl、pH7.3)で25mlまで希釈した。

20

【0257】

混合物を事前に調整した(緩衝液Aで)MonoQ5/50GLカラム(GE Healthcare)上に載せ、以下のプログラムを用いて溶出させた:1倍カラム体積eq 0%の緩衝液B、2倍カラム体積の未結合の試料の洗い流し(0%の緩衝液B)、10倍カラム体積の0~20%の緩衝液B、10倍カラム体積の20%の緩衝液B、10倍カラム体積の100%の緩衝液B。イミダゾール緩衝液A:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、25mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3。イミダゾール緩衝液B:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1MのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3。

30

【0258】

SDS-PAGE分析(還元および非還元、7%のNuPAGEトリスアセテート、1.0mm、Invitrogen、150V、70分間)により、BDD FVIII重鎖中のフルオロフォアの組み込みが確認された。

40

【0259】

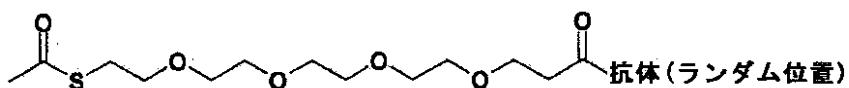
(実施例27)

AP3完全長抗体とコンジュゲートした3-[2-[2-[(2-アセチルスルファニルエトキシ)エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパノイルハンドル、ランダム位置、化合物10M

50

【 0 2 6 0 】

【化 2 6】



〔 0 2 6 1 〕

緩衝液(50%の100mMのHEPES.HCl、150mMのNaCl、pH7.5、33%の100mMのグリシン.HCl、pH3.5、17%の20mMのHEPES.HCl、150mMのNaCl、0.01%のTween80、pH7.5～最終pH7.2)中のAP3 mIgG1 wt Hc Lc C39S完全長抗体(1.3mg)を、Millipore Amicon Ultra遠心装置、分子量カットオフ10,000Daを入れた。タンパク質を緩衝液(20mMのHEPES、pH7.3)で数回洗浄した。溶液を前記緩衝液中で65マイクロリットルまで濃縮した。 10

(0 2 6 2)

(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)3-[2-[2-[2-(2-アセチルスルファニルエトキシ)エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパノエート(Pierce/Thermo Scientific、2.2mg、5.2マイクロモル)を緩衝液(20mMのHEPES、pH7.3、100マイクロリットル)に溶かした。4マイクロリットルのこの溶液(209nmol)をタンパク質溶液に加えた。生じた混合物を1時間インキュベートした。溶液をMillipore Amicon Ultra遠心装置、分子量カットオフ10,000Daに入れた。タンパク質を緩衝液(20mMのHEPES、pH7.3)で数回洗浄した。

[0 2 6 3]

(实施例28)

N-グリカン-アシアロ-BDD第VIII因子、化合物11M

水性緩衝液(20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、500mMのNaCl、pH7.3)中のBDD第VIII因子(7mg)をウェルシュ菌からの組換えシアリダーゼ(4U)と混合した。最終体積は4mlであった。混合物を摂氏25度で30分間静置した。混合物を緩衝液(20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、25mMのNaCl、pH7.3)で5mlまで希釈した。混合物を事前に調整した(緩衝液Aで)MonoQ5/50GLカラム(GE Healthcare)上に載せ、以下のプログラムを用いて溶出させた:5倍カラム体積eq 0%の緩衝液B、2倍カラム体積の未結合の試料の洗い流し(0%の緩衝液B)、25倍カラム体積の0~70%(緩衝液B)、10倍カラム体積の70~100%(緩衝液B)、5倍カラム体積の100%の緩衝液B。緩衝液A:ヒスチジン(1.5mg/ml)、CaCl₂(0.25mg/ml)、Tween80(0.1mg/ml)、NaCl(2.9mg/ml)、およびスクロース(3mg/ml)、pH7.0。緩衝液B:ヒスチジン(1.5mg/ml)、CaCl₂(0.25mg/ml)、Tween80(0.1mg/ml)、NaCl(58mg/ml)、およびスクロース(3mg/ml)、pH7.0

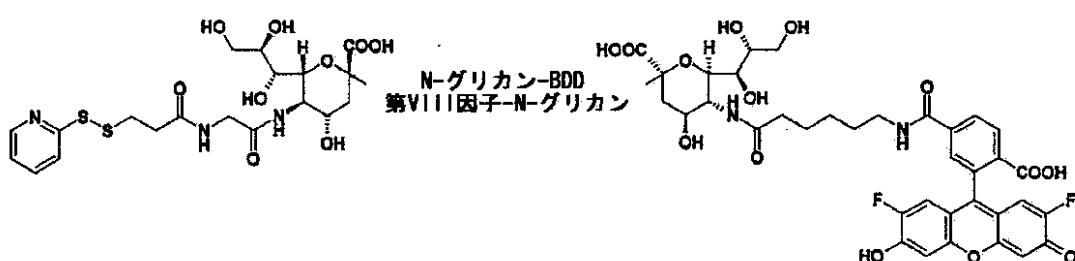
[0 2 6 4]

(塞施例29)

N-グリカンを介して蛍光標識したBDD FVIIIとコンジュゲートした3-(2-ピリジルジスルファンイル)プロパノイルアミノハンドル、化合物12M

[0 2 6 5]

【化 2.7】



【 0 2 6 6 】

緩衝液(ヒスチジン(1.5mg/ml)、CaCl₂(0.25mg/ml)、Tween80(0.1mg/ml)、NaCl(30mg/ml))およびスクロース(3mg/ml)、pH7.0)中のN-グリカン-アシアロ-BDD第VIII因子、化合物11M(3mg)を、(5R,6R)-2-[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ-ピリミジン-1-イル)-3,4-

ジヒドロキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]メトキシ-オキシド-ホスホリル]オキシ-4-ヒドロキシ-5-[[2-[3-(2-ピリジルジスルファニル)プロパノイルアミノ]アセチル]アミノ]-6-[(2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル]テトラヒドロピラン-2-カルボン酸二ナトリウム、化合物1M、(2R,5R,6R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ-ピリミジン-1-イル)-3,4-ジヒドロキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]メトキシ-オキシド-ホスホリル]オキシ-5-[[6-[[4-カルボキシ-3-(2,7-ジフルオロ-3-ヒドロキシ-6-オキソ-キサンテン-9-イル)ベンゾイル]アミノ]ヘキサノイルアミノ]-4-ヒドロキシ-6-[(2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル]テトラヒドロピラン-2-カルボン酸二ナトリウムおよびシアリルトランスフェラーゼ(rat rec. ST3Gal1111)と混合した。最終濃度は、第VIII因子:0.85mg/ml、シアリルトランスフェラーゼ:271U/l、オレゴングリーン488ヌクレオチド:14マイクロモーラー、化合物1M:15マイクロモーラーであった。最終体積:3.5mlであった。混合物を摂氏32度で18時間静置した。(2R,5R,6R)-5-アセトアミド-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ-ピリミジン-1-イル)-3,4-ジヒドロキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]メトキシ-オキシド-ホスホリル]オキシ-4-ヒドロキシ-6-[(2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル]テトラヒドロピラン-2-カルボン酸二ナトリウムを混合物に加えた(最終濃度:54マイクロモーラー)。混合物を摂氏32度で30分間インキュベートした。

【0267】

混合物を緩衝液(ヒスチジン(1.5mg/ml)、CaCl₂(0.25mg/ml)、Tween80(0.1mg/ml)、NaCl(2.9mg/ml)、およびスクロース(3mg/ml)、pH7.0)で14mlまで希釈した。

【0268】

混合物を事前に調整した(緩衝液Aで)MonoQ5/50GLカラム(GE Healthcare)上に載せ、以下のプログラムを用いて溶出させた:5倍カラム体積eq、2倍カラム体積の未結合の試料の洗い流し、25倍カラム体積の0~70%、10倍カラム体積の70~100%の緩衝液B、および5倍カラム体積の100%のB。イミダゾール緩衝液A:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、25mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3。イミダゾール緩衝液B:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1MのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3。

【0269】

SDS-PAGE分析(還元および非還元、7%のNuPAGEトリスアセテート、1.0mm、Invitrogen、150V、70分間)により、BDD FVIII重鎖および軽鎖中のフルオロフォアの組み込みが確認された。SDS-PAGE分析の前に生成物をPEG 30kDaチオールと共にインキュベートすることで、非還元条件下ではFVIIIよりも高い分子量を有する蛍光バンドの存在がもたらされたが、還元条件下ではそうではなかった。

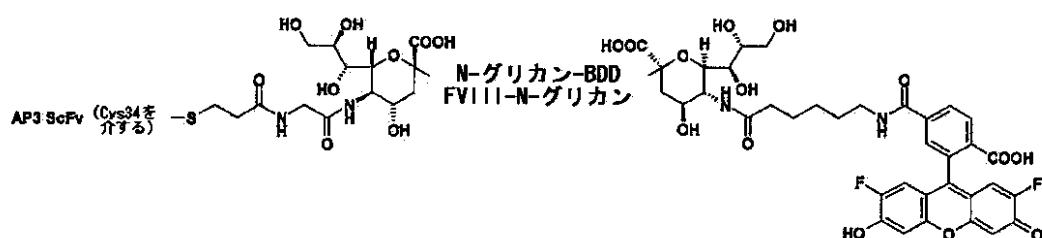
【0270】

(実施例30)

N-グリカンを介して蛍光標識したBDD FVIIIとコンジュゲートした3-(2-ピリジルジスルファニル)プロパノイルアミノハンドル、化合物12MとAP3 scFv LC-HC、化合物13Mとの間のコンジュゲート

【0271】

【化28】



【0272】

グリシン緩衝液(100mM、pH3.5)およびHEPES緩衝液(100mM、pH7.5)の1:1混合物中のAP3 scFvを、水性緩衝液(20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、500mMのNaCl、pH7.3)中のN-グリカンを介して蛍光標識したBDD FVIIIとコンジュゲ

10

20

30

40

50

ートした3-(2-ピリジルジスルファニル)プロパノイルアミノハンドル、化合物12Mと混合した。最終濃度は、化合物12M:0.25mg/ml、ScFv:2マイクロモーラー、0.06mg/mlであった。最終体積:2.1mlであった。混合物を摂氏23度で3時間静置した。緩衝液中のシステイン(1mg/ml)(2.3マイクロリットル)および緩衝液中のシスチン(1mg/ml)(3.5マイクロリットル)の溶液を加えた。混合物を摂氏23度で15分間静置した。

【0273】

混合物を緩衝液(20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1Mのグリセロール、25mMのNaCl、pH7.3)で40mlまで希釈した。混合物を事前に調整した(緩衝液Aで)MonoQ 5/50GLカラム(GE Healthcare)上に載せ、以下のプログラムを用いて溶出させた:5倍カラム体積eq 0%の緩衝液B、2倍カラム体積の未結合の試料の洗い流し(0%の緩衝液B)、25倍カラム体積の0~70%(緩衝液B)、50倍カラム体積の70~100%(緩衝液B)、5倍カラム体積の100%の緩衝液B。イミダゾール緩衝液A:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、25mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3。イミダゾール緩衝液B:20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1MのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3。

【0274】

選択された画分をMillipore Amicon Ultra遠心装置、分子量カットオフ50,000Daに移し、全体積を0.5mlまで減らした。混合物を事前に調整した(緩衝液で)Superose6 10/300 GLカラム(GE Healthcare)上に載せ、ヒスチジン(1.5mg/ml)、CaCl₂(0.25mg/ml)、Tween80(0.1mg/ml)、NaCl(18mg/ml)、およびスクロース(3mg/ml)、pH7.0の緩衝液を用いて溶出させた。

【0275】

SDS-PAGE分析(非還元およびトロンビン消化/非還元、7%のNuPAGEトリスアセテート、1.0mm、Invitrogen、150V、70分間)により、出発物質よりも高い分子量を有する蛍光バンドの存在が示された。タンパク質は血小板と結合しないことが示され、これは、Cys-34がCDR領域中に見つかり、したがって結合親和性に影響を与えることによって合理的に説明することができる。

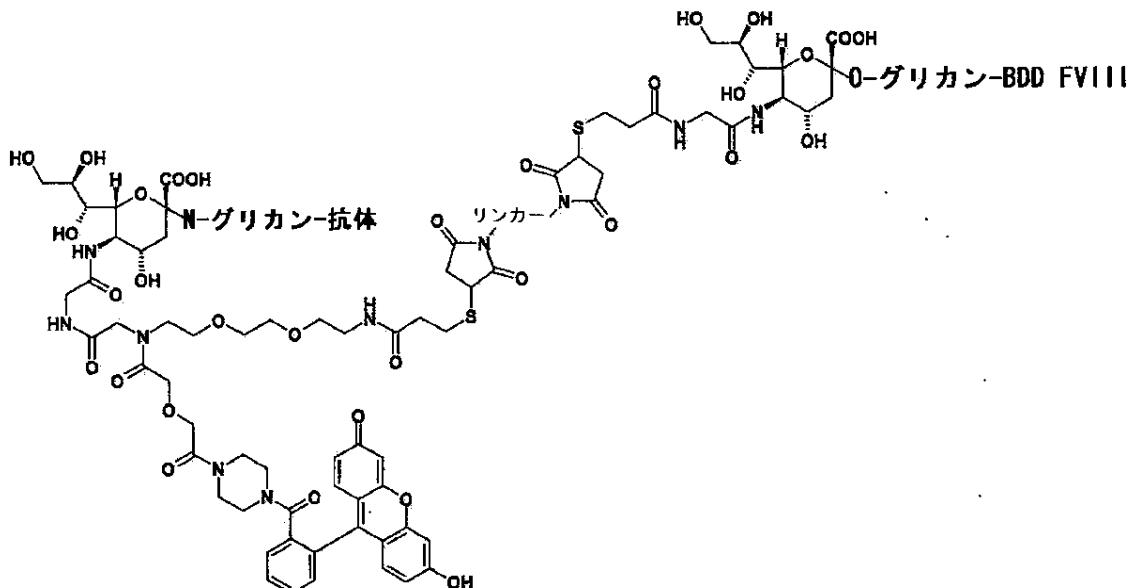
【0276】

(実施例31)

N-グリカンを介してAP3 mIgG1 wt HC LC C39S完全長抗体とコンジュゲートした蛍光3-(2-ピリジルジスルファニル)ハンドル、化合物8MとBDD-FVIIIとの間の、O-グリカン上のハンドルを介したコンジュゲート、化合物7M

【0277】

【化29】



【0278】

10

20

30

40

50

緩衝液中のハンドルとコンジュゲートしたAP3 mIgG1 wt Hc Lc C39S完全長抗体、たとえば化合物8Mを、緩衝液中のトリス(カルボキシエチル)ホスフィンの溶液と混合する。ジスルフィド結合の選択的還元後に過剰のトリアルキルホスフィンを除去するために、緩衝液を交換する。緩衝液中のビス-マレイミド、たとえばRapp Polymere GmbH、カタログ番号:11 6000-45からのビス-マレイミドPEG6000の溶液を加える。反応の完了後に緩衝液を交換する。

【0279】

緩衝液中の3-(2-ピリジルジスルファニル)プロパノイルアミノハンドルとコンジュゲートしたFVIII、たとえば化合物7Mを、緩衝液中のトリス(カルボキシエチル)ホスフィンの溶液と混合する。ジスルフィド結合の選択的還元後に過剰のトリアルキルホスフィンを除去するために、緩衝液を交換する。 10

【0280】

修飾されたタンパク質(FVIIIおよびAP3 ab)の2つの溶液を混合する。所望のコンジュゲートの形成をSDS-PAGE分析によって監視する。精製は、適切な種類のクロマトグラフィー、たとえばイオン交換または抗FVIIIアフィニティークロマトグラフィーを用いて達成する。

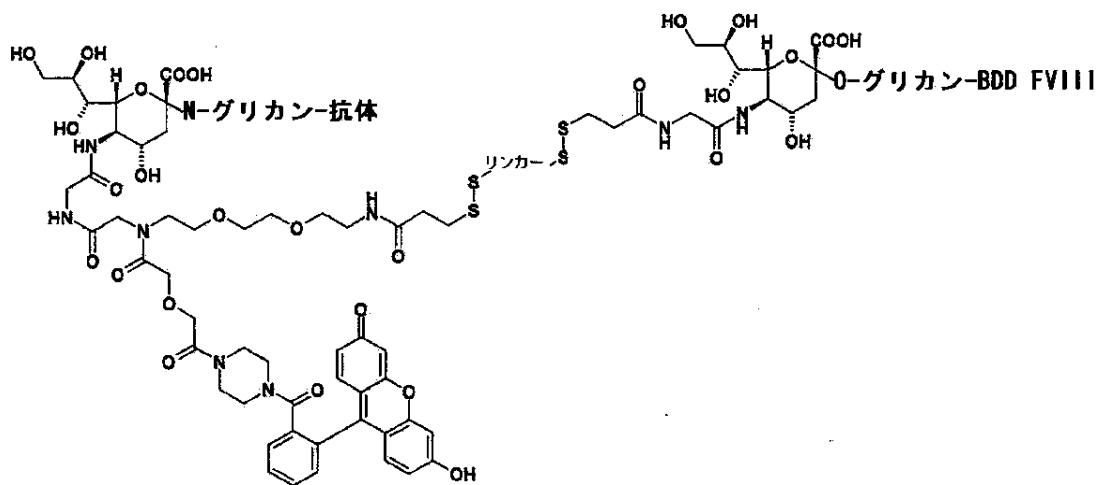
【0281】

(実施例32)

N-グリカンを介してAP3 mIgG1 wt HC LC C39S完全長抗体とコンジュゲートした蛍光3-(2-ピリジルジスルファニル)ハンドル、化合物8MとBDD-FVIIIとの間の、0-グリカン上のハンドルを介したコンジュゲート、化合物7M 20

【0282】

【化30】



【0283】

緩衝液中のハンドルとコンジュゲートしたAP3 mIgG1 wt Hc Lc C39S完全長抗体、たとえば化合物8Mを、緩衝液中のジチオール、たとえば3,6-ジオキサ-1,8-オクタンジチオールの溶液と混合する。反応の完了後に緩衝液を交換する。FVIIIとコンジュゲートした3-(2-ピリジルジスルファニル)プロパノイルアミノハンドル、たとえば化合物7Mの溶液を加える。所望のコンジュゲートの形成はSDS-PAGE分析によって監視する。精製は、適切な種類のクロマトグラフィー、たとえばイオン交換または抗FVIIIアフィニティークロマトグラフィーを用いて達成する。 40

【0284】

(実施例33)

N-グリカンを介してAP3 mIgG1 wt HC LC C39S完全長抗体とコンジュゲートした蛍光3-(2-ピリジルジスルファニル)ハンドル、化合物8MとFVIIIのCys突然変異体との間のコンジュゲート

【0285】

10

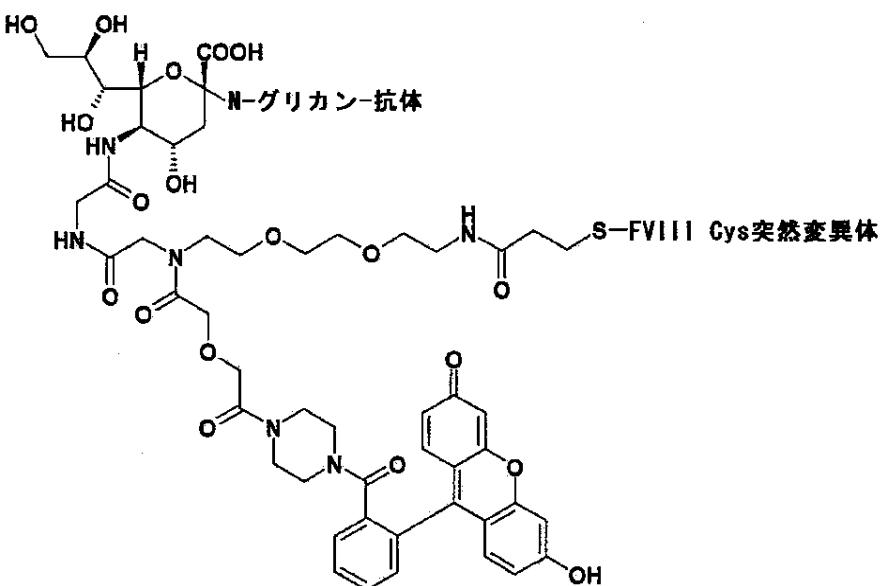
20

30

40

50

【化31】



【0286】

上述の方法と同じ方法を用いて、FVIIIの表面接近可能なCys突然変異体を、AP3抗体もしくは同様のもの(またはその断片)とコンジュゲートさせる。FVIIIのCys突然変異体は、必要な場合は、突然変異したシスティンと共有結合した置換基を除去するために還元剤で処理し、したがってチオールの発生/その存在の保証がもたらされる。形成されたタンパク質を、記載した種類の適切な試薬、たとえばN-グリカンを介してAP3完全長抗体とコンジュゲートした蛍光2-ピリジルジスルファニルハンドル、化合物8Mとコンジュゲートさせる。所望のコンジュゲートの形成はSDS-PAGE分析によって監視する。精製は、適切な種類のクロマトグラフィー、たとえばイオン交換または抗FVIIIアフィニティーコロマトグラフィーを用いて達成する。

【0287】

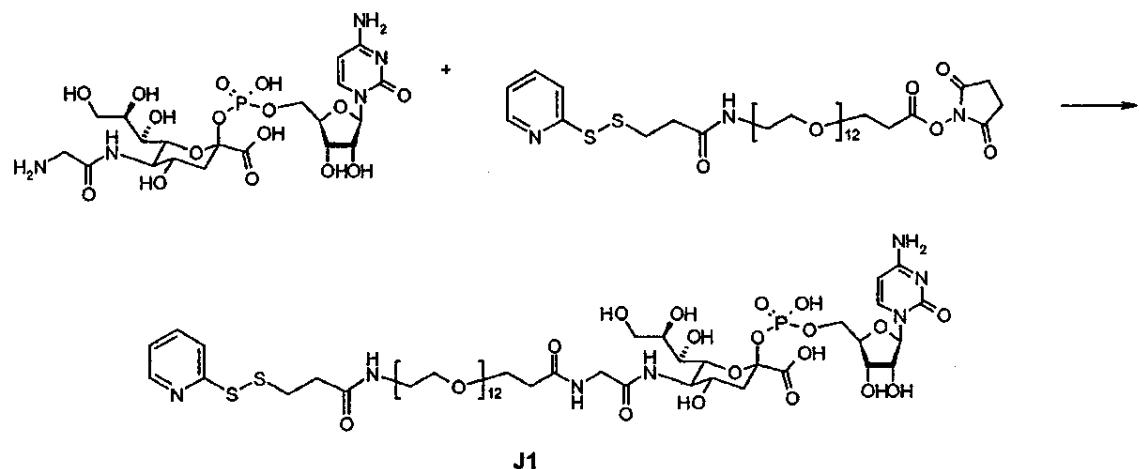
(実施例34)

N-グリカン上のオレゴングリーン488および0-グリカン上のdPEG12-SHで修飾されたFVIIIの調製

ステップ1: PySS-dPEG₁₂-GSC(化合物J1)の調製

【0288】

【化32】



【0289】

グリシルシアル酸シトシン5'－リン酸エステル(GSC、ジメチルアミン塩、分子量673、

50

85%の純粋、96mg、153 μ mol)を100mMのトリス緩衝液、pH8.4(650 μ L)に溶かし、次いでアセトニトリル(650 μ L)に溶かし、搅拌して2相系が観察された。SPDP-dPEG₂-NHS-エステル(Quanta Biodesign、製品番号10378、1.2当量、183 μ mol、170mg)を650 μ LのTHFに溶かし、次いで100mMのトリス、pH8.4(650 μ L)に溶かし、薄い白色のかすんだ沈殿物が観察され、このNHS-エステル溶液をGSC溶液に加えた。溶液はpH8.4でわずかにかすんでいた。溶液を室温で7時間搅拌し、生じた混合物を凍結し、凍結乾燥して、粗化合物が得られた。凍結乾燥後に得られた白色粉末は、ニートな水を平衡化緩衝液として使用し、溶出にはニートなアセトニトリルの直線勾配を使用した調製用HPLCによって精製した。所望の生成物を含有する画分をプールし、凍結乾燥して100mgの標的化合物が得られ、これは分析用HPLCによって均質であり、質量分析によって同定した。

10

【0290】

ステップ2:PySS-dPEG₂-GSCとwt BDD FVIIIのO-グリカンとのカップリング(化合物J2)
wt BDD FVIII(「N8」、5.7mg/ml、5mg、875 μ l)に、緩衝液(20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、200mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3、100ulを使用した)中のA. ureafaciensのシアリダーゼ(0.44mg/ml、50 μ l)および1mg/mlのPySS-dPEG₂-GSC(J1)ならびにHis-ST3Gal-I(2.5mg/ml、375 μ l)を加えた。反応混合物を32℃で終夜17時間の間インキュベートした。その後、伝導率を下げるためにこれを25mlの、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、25mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3の緩衝液で希釈した。その後、混合物を20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、25mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3で平衡化したMonoQ5/50GLカラムに載せた。生成物は、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1MのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3の溶出緩衝液を用いた2段階勾配を使用して溶出させた。FVIII非関連の物質は20%の溶出緩衝液で溶出された一方で、生成物は100%の溶出緩衝液で溶出された。所望の生成物(J2)を含有する画分をプールした。収量は4.1mg、1.17mg/mlであった。

20

【0291】

ステップ3:オレゴングリーンを用いた標識およびN-グリカンのキャップ(J3)

ステップ2に従って調製した修飾されたタンパク質(J2)を、MBP-ST3Gal-III(1.2U/ml、300 μ l)およびオレゴングリーン488-GSC(2mgを、800 μ lの、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、200mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3の緩衝液に溶かし、200 μ l、0.5mg、20当量を使用した)と混合し、暗所、32℃で終夜インキュベートした。続いて、CMP-NAN(250 μ lの、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、200mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3の緩衝液中に9mg)を反応混合物に加え、さらに1時間、32℃でインキュベートした。その後、伝導率を下げるためにこれを30mlの20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、25mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3で希釈した。精製は、ステップ2に概要を示すようにAIEXによって実施した。収量:1.54mg、0.51mg/mlであった。

30

【0292】

ステップ4:TCEPを用いた還元

ステップ3に従って調製した修飾されたタンパク質(J3)を、トリスカルボキシルエチルホスフィン(TCEP、700当量、1.69mg、6mgのTCEPを、1mlの、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、200mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3の緩衝液に溶かし、282 μ lを使用した)と混合し、30分間、5℃、暗所でインキュベートした。その後、伝導率を下げるためにこれを30mlの20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、25mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3で希釈した。精製は、ステップ2に概要を示すようにAIEXによって実施した。収量:610 μ g、610 μ g/mlであった。生成物を、緩衝液ヒスチジン(1.5mg/ml)、CaCl₂(0.25mg/ml)、Tween80(0.1mg/ml)、NaCl(18mg/ml)、スクロース(3mg/ml)を移動相として使用したSEC(カラム:Superdex200 10/300GL)によってさらに精製した。所望の生成物(J4)を含有する画分をプールした。収量:420 μ g、120 μ g/mlであった。生成物のSDS PAGEゲル分析からのデータはN8と本質的に同一であり、ゲル蛍光イメージングにより、HCおよびLCがどちらも蛍光標識を含有していたことが示された。生成物を、30kDa PEG-マ

40

50

レイミドを用いた試験反応に供した。この反応のSDS PAGE分析により、バンドの分子量の増加およびFVIII HCバンドの消失が示され、したがって遊離チオール基の存在が示された。

【0293】

本実施例は、FVIIIをO-グリカン上でチオール基を用いて修飾することができるることを示している。

【0294】

(実施例35)

SSPy基で修飾した完全長AP3 mIgG抗体の調製(J5)

完全長AP3 mIgG1 wt LC C39S(3.0mg/ml、400 μl、1200 μg、8nmol、pH7.2、50%の100mMのHEPES HCl、150mMのNaCl、pH7.5、33%の100mMのグリシンHCl、pH3.5、および17%の20mMのHEPES HCl、150mMのNaCl、0.01%のTween80、pH7.5の緩衝液の混合物中)を、100 μlまで濃縮し(15分間、12,000g、Millipore Amicon Ultra 10kDa)、900 μlまで希釈し、その後、100ulまで濃縮(12分間、12,000g)×6することによって、緩衝液を100mMのHEPES、pH7.5に交換した。最終体積は約80 μlであった。その後、100mMのHEPES、pH7.5を用いてこれを約260 μlまで希釈した。続いて、SPDP-dPEGi₂-NHS-エステル(Quanta Biodesign、製品番号10378、1.8mgを400 μlの100mMのHEPES、pH7.5に溶かし、これから20当量、144 μg、32 μlを使用した)を、緩衝液を交換したAP3 FL mIgGに加えた。反応混合物を室温で終夜インキュベートした。還元および非還元SDS PAGEゲル分析により、FL抗体ならびに個々の重鎖および軽鎖に対応するバンドの分子量が増加しており、外見がより幅広くなっていたことが示され、したがって所望の修飾が起こったことが示された。上述のようにタンパク質の緩衝液を100mMのHEPES、pH7.5に交換した。収量は765 μg、8.5mg/mlであった。

【0295】

本実施例は、AP3 FL mIgGを、チオール感受性-SSPyコンジュゲーション基を含有するアシル化剤で修飾することができるることを示している。

【0296】

(実施例36)

FVIIIとAP3 FL mIgGとの間のコンジュゲートの調製

AP3 mIgG1 dPEGi₂-SSPy(J5、8.5 μg/ μl、0.057nmol/ μl、31 μl、1.76nmol)を2500 μlのFVIII誘導体J4(300 μg、1.76nmol、120 μg/ml)と混合した。混合物を滅菌濾過し、アルミ箔に包み、室温で終夜静置した後、SDS PAGEゲル分析により、wt BDD FVIIIとAP3 FL mIgGとの間の所望の付加物に対応する分子量を有する生成物が形成されたことが示された。ゲル蛍光イメージングにより、これらのバンドは蛍光標識を含有しており、これらがFVIIIのHCまたはLC鎖に由来することが示された。コンジュゲーションがSDS試料の調製中に起こらなかったことを確認するために、ゲル分析を過剰のN-エチルマレイミドの存在下でも行った。混合物をさらに3日間反応させ、その後、これを30mlの20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、25mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3で希釈し、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、25mMのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3で平衡化したMonoQ5/50GLカラムに載せた。生成物は、20mMのイミダゾール、10mMのCaCl₂、0.02%のTween80、1MのNaCl、1Mのグリセロール、pH7.3の溶出緩衝液を用いた直線勾配を使用して溶出させた。このようにして、遊離AP3 FL mIgGを遊離BDD FVIIIおよびコンジュゲートから分離した。還元および非還元のSDS PAGE分析により、数個の画分が所望の生成物を含有していたことが示された。非還元ゲルにより、FVIII HCバンドの消失が示された一方で、AP3 FL mIgGとFVIIIとの間のコンジュゲートに対応する高分子量バンドが示された。mIgG特異的Abを用いたウエスタンプロットにより、これらのバンドがAP3 FL抗体を含有することが示された。還元ゲルにより、FVIIIならびにAP3の重鎖および軽鎖のどちらの存在も示された。

【0297】

本実施例は、AP3 FL mIgGおよびBDD FVIIIが、AP3 FL mIgG上のチオール基とBDD FVIII上の-SSPy基との間の反応によって形成されたジスルフィド結合を介してコンジュゲート

10

20

30

40

50

することができることを示している。

【0298】

(実施例37)

発色アッセイによって測定された細胞培養収集物中のFVIII:C

細胞培養収集物(上清画分)中のrFVIII化合物のFVIII活性(FVIII:C)を、Coatest SP試薬(Chromogenix)を用いた発色FVIIIアッセイで、以下のように評価した。rFVIII試料およびFVIII標準(凝固参照、Technoclone)をCoatestアッセイ緩衝液(50mMのトリス、150mMのNaCl、1%のBSA、pH7.3、保存料を含む)で希釈した。50 μlの試料、標準、および緩衝液陰性対照を96ウェルのマイクロタイタープレート(Spectraplates MB、Perkin Elmer)に加えた。すべての試料、1:100、1:400、1:1600、および1:6400に希釈して試験した。Coatest SPキットからの第IXa因子/第X因子試薬、リン脂質試薬およびCaCl₂を5:1:3(体積:体積:体積)で混合し、この75 μlをウェルに加えた。室温で15分間インキュベートした後、50 μlの第Xa因子基質S-2765/トロンビン阻害剤1-2581混合液を加え、反応を5分間、室温でインキュベートした後、25 μlの1Mのクエン酸、pH3を加えた。620nmでの吸光度を参照波長として使用して、405nmでの吸光度をEnvisionマイクロタイタープレートリーダー(Perkin Elmer)で測定した。陰性対照の値をすべての試料から減算し、FVIII濃度に対してプロットした吸光度値の直線回帰によって検量線を作成した。特異的活性は、試料の活性をELISAによって決定されたタンパク質濃度で除算することによって計算した。

【0299】

(実施例38)

臨床的に意味のあるFVIII活性アッセイにおけるAP3-FVIII融合タンパク質の特異的活性

精製したタンパク質およびコンジュゲート(N8対照、F8-500 AP3-LC-HC scFV-a3(配列番号40)、F8-500 AP3-LC-HC scFV(配列番号43)およびF8-500 AP3-HC-LC scFV(配列番号42))のFVIII活性を、標準のFVIII:Cアッセイである発色アッセイまたは一段階の段階血餅形成アッセイのどちらかで評価した。精製したタンパク質の発色FVIII活性はCoatest SPアッセイ(Chromogenix、米国マサチューセッツ州Lexington)を用いて評価した。アッセイは、いくつかの軽微な改変を用いて製造者の指示に従って行い、96ウェルプレート様式で実行した。手短に述べると、希釈したFVIII試料およびFVIII参考物質を、Coatest SPキットからの第IXa因子/第X因子試薬、リン脂質試薬およびCaCl₂の混合物と共にインキュベートした。室温で15分間インキュベートした後、第Xa因子基質S-2765/トロンビン阻害剤1-2581混合液を加え、反応を10分間、室温でインキュベートした後、反応を20%のクエン酸で停止させた。620nmでの吸光度を参照波長として使用して、415nmでの吸光度をSpectramaxマイクロタイタープレートリーダー(Molecular Devices)で測定した。第7WHO/NIBSC組換えFVIII標準に対して較正した組換えFVIIIを参考物質として使用した。Table 4(表4)を参照されたい。

【0300】

(実施例39)

一段階血餅アッセイによって測定した、精製した試料中のFVIII:C

FVIII化合物のFVIII血餅形成活性は、SSCの推奨に従って、濃縮したFVIII試料および参考物質を最初に緩衝液で希釈し、その後、フォンウィルブランド因子を有するFVIII欠乏血漿(Siemens、米国イリノイ州Deerfield)で希釈することによって決定した。それぞれのFVIII試料は4つの異なる濃度で測定した。FVIII血餅形成活性は、ACL9000装置で、FVIII試料をAPTT試薬(Synthasil、ILS、米国マサチューセッツ州Bedford)、25mMのCaCl₂およびFVIII欠乏血漿と混合した単一要因プログラム(FVIII:Cd)を用いて測定した。第7WHO/NIBSC組換えFVIII標準に対して較正した組換えFVIIIを参考物質として使用した。

【0301】

【表4】

Table 4

化合物	特異的血餅活性 (IU/mg)	特異的発色活性 (IU/mg)
N8-AP3 IgG コンジュゲート 化合物 MZ1	検出されず	2687 ± 177
F8-500 AP3 HC-LC	6867 ± 101 (n=2)	6837 ± 1241 (n=2)
F8-500 AP3-LC-HC scFV	5565 ± 69 (n=2)	5677 ± 1049 (n=2)
F8-500 AP3-LC-HC scFV-Δa3	13528 ± 2205 (n=3)	10554 ± 1410 (n=3)
N8 対照	8533 ± 638 (n=5)	7769 ± 692 (n=5)

10

【0302】

Table 4(表4)に示すように、AP3-FVIII融合タンパク質およびコンジュゲートは、FVIII発色および血餅形成活性アッセイにおいてN8出発物質と同様のFVIII活性を有する。

【0303】

(実施例40) 血小板と特異的に結合したAP3-N8融合タンパク質によって支持されるトロンビン産生

トロンビン産生試験(TGT)などの包括的な凝固試験は、特に血小板がアッセイに含まれる場合に、血餅形成および発色アッセイよりも生理的に関連する第VIII因子(FVIII)活性の測定であることが示唆されている。血小板に対するAP3-N8の効果を評価するために、FVIII化合物(F8-500 AP3-LC-HC scFV-Δa3およびN8対照)を、ヒト血友病Aを模倣する系中で試験した。FVIII欠乏血漿(>1%のFVIII活性)を個々の正常な血液ドナーからの洗浄した血小板で置換することによって、血友病Aの模倣体を調製した。凝固プロセスは組織因子およびカルシウムで開始され、フィブリン血餅が形成されると同時に検出することができる蛍光発生トロンビン基質をアッセイ中に含めることによって、トロンビン産生が続くことができる。したがって、血友病Aの模倣体では、産生されるトロンビンの量およびトロンビン産生の速度は、TGT中に存在するFVIIIの量に依存する。ここで使用するTGT方法はHemker(1)によって記載されている多血小板血漿(PRP)アッセイから改変されている。手短に述べると、血小板は、Mustard(2)の手順に従って、個々の正常な健康なドナーから収集したクエン酸添加した血液から単離し、一連の洗浄ステップによって精製した。^{*}洗浄した血小板をFVIII欠乏血漿(George King、米国カンザス州Overland Park)に、150,000個の血小板/μlの濃度まで加えた。80 μLのこのFVIII欠乏PRP(100,000個の血小板/μl、最終)をマイクロタイタープレート中で10 μlのInnovin(最終希釈率1:200,000)と混合し、10分間、37℃でブレインキュベートした後、10 μlのFVIII化合物または緩衝液、および20 μlのCaCl₂(最終濃度16.7mM)と混合した蛍光原基質(Z-Gly-Gly-Arg-AMC、Bachem、最終濃度417nM)を加えた。390nmで励起させた後の460nmでの発光を、Fluoroskan Ascentプレートリーダー(Thermo Electron Corporation)で2時間、連続的に測定した。蛍光シグナルを2-マクログロブリンと結合したトロンビン活性について補正し、較正物質およびTrombinoscopeソフトウェア(Synapse BV)を用いてトロンビン濃度に変換した。

20

【0304】

AP3が、FVIII分子が活性化時に血小板だけに局在せず、循環中で血小板と共に運ばれることを可能にする血小板とN8との特異的結合を伝達することを実証するために、上述のTGAアッセイを、以下の追加のステップを用いて行った。^{*}洗浄した血小板を得た後、N8化合物を血小板と結合させるために、血小板を30分間、室温で、AP3-N8-融合タンパク質またはN8(20U/ml)と共にインキュベートした。このインキュベートに続いて、休止血小板と特異的に結合していないすべてのN8を除去するために、2回の追加の洗浄ステップを行った。これらの2回の追加の洗浄ステップの後、血小板をFVIII欠乏血漿、カルシウムおよび蛍光原基質に加え、トロンビン産生の形態のFVIII活性を記載のように測定した。ソフトウェアから得られたパラメータは、トロンビン産生の開始までの時間を記載する「遅延時間」、トロンビン産生の最大速度をnMで記載する「ピーク」、および「ピークまでの時間」

30

40

50

として記録する。強力な血餅は、トロンビン形成の素早い初期の発生および速い速度によって特徴づけられる。

【0305】

【表5】

Table 5

化合物	遅延時間 (分)	ピーク (nM のトロンビン)	ピークまでの時間 (分)
緩衝液	18.2	9.9	97.9
N8 対照	17.1	16.5	99.6
F8-500 AP3-LC-HC scFV-Δa3	8.2	68.2	27.4

10

【0306】

結果により、血小板をAP3-N8-融合タンパク質と共にインキュベートした実験では強力なトロンビン産生が示される一方で、N8と共にインキュベートした血小板では、かろうじてバックグラウンド(血友病A)レベルよりも高いトロンビン産生しか示されなかつた。したがつて、N8対照を血小板から洗い流すことはできるが、AP3-N8-融合タンパク質は血小板と結合したままであり、それにより、血小板によって保有されるFVIII活性が直接実証された。

【0307】

(実施例41)

20

融合タンパク質と精製したGPIIbIIIaとの結合の分析

結合相互作用分析は、Biacore T-100装置で表面プラズモン共鳴によって得た。固定濃度での精製したGPIIbIIIa(Enzyme Research Laboratories)の捕捉は、10mMの酢酸ナトリウム、pH4.5~5.0中で1000~4000RUのレベルまで、CM5チップに直接固定することによって得られた。5~0.31nMからのFVIII誘導体の2倍希釈液を、固定したGPIIbIIIaとの結合について試験した。ランニングおよび希釈緩衝液:10mMのHEPES、150mMのNaCl、5mMのCaCl₂、0.005%のp20、pH7.4であった。すべてのFVIII誘導体をランニング緩衝液に溶解し、希釈した。再生は10mMのグリシン、pH1.7によって得られた。運動定数および結合定数(k_{on} 、 k_{off})の決定は、Biacore T100評価ソフトウェアを用いてFVIII誘導体とGPIIbIIIaとの1:1の相互作用を仮定することによって得られた。結果を以下の表に示す。

30

【0308】

【表6】

Table 6:表面プラズモン共鳴(SPR)分析。GPIIbIIIa との結合。運動定数。

FVIII 誘導体の ID	k_{on} (1/M 秒)	k_{off} (1/秒)	KD (nM)
F8-500 AP3-HC-LC scFV	1.3E+05	1.5E-04	1.2
F8-500 AP3-LC-HC scFV	1.4E+06	検出されず	検出されず
F8-500 AP3-LC-HC scFV-Δa3	2.2E+06	5.0E-05	0.02
N8-AP3 コンジュゲート	2.5E+05	6.1E-06	0.02
化合物 MZ1			

40

検出されず、観察された解離速度は k_{off} の正確な決定には低すぎた

【0309】

(実施例42)

FVIII融合体/コンジュゲートと血小板との結合の分析

融合タンパク質の血小板結合は、フローサイトメトリーによって試験することができる。末梢血の血小板を精製してもよく、または全血を使用することができる。血小板は活性または休止であり得る。血小板は融合タンパク質と共に15~30分間インキュベートする。融合タンパク質は、フルオロフォアで直接標識するか、または蛍光標識した二次抗体を用いて検出し得る。融合タンパク質と結合する粒子が実際に血小板であるかどうかを評価するため、融合タンパク質の結合を妨害しない蛍光標識した血小板特異的抗体を加えるこ

50

とができる。インキュベート後、細胞を洗浄して融合タンパク質を除去し、試料をフローサイトメーターで分析する。フローサイトメーターは非標識の細胞および細胞と結合する蛍光標識した分子を検出し、したがって、融合タンパク質が血小板(または他の細胞)と結合した程度を具体的に分析するために使用できる。

【0310】

結合の特異性は、たとえば過剰の非標識の抗体(直接標識した融合タンパク質を用いる場合)を加えることによって評価することができる。FVIII部分と血小板との結合は、たとえば過剰のアネキシンVまたはFVIIIを加えることによって評価することができる。休止血小板による融合タンパク質の内部移行は、たとえば、血小板を直接標識した融合タンパク質と共にインキュベートし、次いで、表面結合した(すなわち内部移行していない)融合タンパク質からのシグナルをクエンチする抗体と共にインキュベートことによって評価し得る。その後、内部移行した融合タンパク質のみがフローサイトメトリーによって検出される。活性血小板が血餅形成の部位で内部移行した融合タンパク質を放出すると仮定し得る。

10

【0311】

(実施例43)

FVIII-AP3融合体およびコンジュゲートと血小板との結合の試験

F8-500 AP3-LC-HC scFV- a3(配列番号40)(AP3-N8 2097)およびN8の化学的にカップリングした完全長AP3 IgG(実施例18のMZ1)の血小板結合をフローサイトメトリーによって試験した。ヒト末梢血からの洗浄した血小板を調製し、AP3-N8と共に暗所、室温で30分間インキュベートした(約300,000個の血小板/試料)。血小板マーカーとして、ペリジニンクロロフィルタンパク質(PerCP)で標識した抗CD42aを、AP3-N8構築体と共に試料に加えた。インキュベート後、細胞を緩衝液(20mMのHepes、150mMのNaCl、1mg/mlのBSA、5mMのCaCl₂)で洗浄して未結合の抗体を除去し、フィコエリスリン-Cy7(PE-Cy7)抗FVIIIモノクローナル抗体を加えた(10 μg/ml)。30分間インキュベートした後、細胞を緩衝液で洗浄し、試料を、ログモードの前方および側方散乱検出器を備えたBD LSRFortessa(商標)フローサイトメーターで分析した(少なくとも5,000回の事象/試料を分析した)。約0.025 ~ 51.2nM(MZ1では25.6nM)のAP3-N8の用量を分析して、結合の用量依存性を評価した。AP3-N8 2097では3人のドナーを個々の実験で試験し、MZ1構築体では1人のドナーを試験した。AP3-N8結合の特異性は、過剰の非標識のAP3-LC-HC scFV-FLAG(配列番号22)を試料に加えることによって(50倍過剰まで)評価した。したがって、データは、構築体と血小板上のGPIIb/IIIa受容体とのAP3特異的結合を示す。N8部分をオレゴングリーンで直接標識した類似のAP3-N8構築体を用いた実験により匹敵する結果が得られ、AP3-N8構築体と血小板との特異的結合が支持された(n=5)。

20

【0312】

AP3-N8の内部移行は、最初に血小板を蛍光標識したAP3-N8と共にインキュベートし、フローサイトメトリーによって蛍光を測定し、その後、表面結合した(すなわち内部移行していない)AP3-N8からのシグナルをクエンチする抗体を加えることによって、評価することができる。試料をフローサイトメトリーによって再分析した場合、内部移行したAP3-N8のみが検出される。

30

【0313】

(実施例44)

血小板に対するF8-500 AP3-LC-HC scFV- a3(配列番号40)の抗凝集効果の試験

潜在的なF8-500 AP3-LC-HC scFV- a3(配列番号40)の抗凝集効果は、単離した血小板の懸濁液を通る光透過率の変化を監視することによって測定した。この方法は、最初に1960年代にGustav von Bornによって本質的に記載されており(Born、Nature、194:927 ~ 29頁、1962年)、今日では、血小板機能を評価するための最も使用されている方法の1つである。手短に述べると、この方法では、光が血小板の懸濁液を横断する能力を測定する。この血小板の懸濁液は、多血小板血漿または単離した血小板のどちらかであり得る。活性化後、GPIIb/IIIaはそのコンホーメーションをフィブリノーゲン高結合状態へと変化させ、フィ

40

50

ブリノーゲンの存在下で血小板は凝集体を形成し始める。多くの単一の血小板よりも少数の大きな凝集体を有する試料の方が、より多くの光が通るため、これが光透過率の増加として記録される。抗体の阻害効果は、一般に、たとえば光透過率の変化によって測定した、活性化剤(たとえばADPまたはトロンビン)に対する血小板の凝集応答を減少させる抗体の能力によって検査される(Collerら、JCI、72(1):325～38頁、1983年)。

【0314】

本実施例における用語「単離したヒト血小板」とは、等張緩衝液中に保った、ヒト全血に由来する血小板をいう。血小板は、健康なボランティアからのヘパリン処理したヒト静脈血を、85mMのクエン酸Na、71mMのクエン酸および111mMのグルコースを含有する酸-クエン酸-デキストロース(ACD)溶液と混合したもの(6:1、v/v)から単離した。血液を220gで20分間遠心分離して多血小板血漿(PR)を得た。調製手順中にエイコサノイドおよびアデニンヌクレオチドによる血小板の活性化を防止するために、アセチルサリチル酸(100 μM)および0.5U/mlのアピラーゼを加えた。480gで20分間遠心分離することによってPRP中の血小板を遠心沈殿させ、上清を除去した。血小板を、145mMのNaCl、5mMのKCl、1mMのMgSO₄、10mMのグルコース、10mMのHepesおよび1U/mlのアピラーゼから構成される無カルシウムHepes溶液(pH7.4)に穏やかに再懸濁させた。血小板懸濁液をプラスチックチューブ中、室温で保ち、それぞれの実験で[Ca²⁺]を1mMに調節し、温度を37℃に調節した。

【0315】

血小板試料をシリコン処理したガラスキュベット中で連続的に攪拌しながら(1200rpm)37℃に保つ一方で、血小板凝集プロファイラー(登録商標)(PAP)-8E装置(Bio/Data Corporation、ペンシルベニア州Horsham)を用いて光透過率を測定した。試料をF8-500 AP3-LC-HC scFV- a3(配列番号40)(30nM)、AP3-LC-HC scFV-FLAG(配列番号22)(30nM)またはアブシキシマブ(ReoPro(登録商標))(30nM)のいずれかと共に3分間インキュベートした後、プロテアーゼ活性化受容体-1(PAR-1)活性化ペプチド(アミノ酸配列SFLLRN)(10 μM)で活性化させた。結果により、対照(Table 7(表7))と比較してAP3-N8で処理した血小板において血小板の凝集の有意な差異は示されなかった。さらに、AP3-LC-HC scFV-FLAGを30nMで抗凝集特性について試験し、阻害効果の効能は示されなかった。しかし、抗凝集アブシキシマブ(ReoPro(登録商標))(30nM)は、SFLLRNで活性化した血小板において血小板の凝集をほぼ40%、有効に阻害した(Table 7(表7))。血小板の凝集の阻害に関するF8-500 AP3-LC-HC scFV- a3およびReoPro(登録商標)の差異は、濃度を増加した際にさらに明白であった。図2は、F8-500 AP3-LC-HC scFV- a3(100nM)またはReoPro(登録商標)(100nM)を使用した際の血小板の凝集を示す。このより高い濃度は、ReoPro(登録商標)で増大した阻害をもたらす一方で、増加した濃度のF8-500 AP3-LC-HC scFV- a3は血小板の凝集に対して影響を与えない。

【0316】

【表7】

Table 7.血小板の凝集

F8-500 AP3-LC-HC scFV- Δa3 (30 nM)	AP3-LC-HC scFV- FLAG (30 nM)	ReoPro(登録商標) (30 nM)	対照
86.02±5.8	95.09±3.5	60.72±22.1	100

すべての群で、データは対照(SFLLRN、10 μM)の%±SD および n=3 として示す。

【0317】

(実施例45)

ヒト化IgB3受容体を用いたマウス株の調製および使用

ヒトITGB3のcDNAを含有するベクター{エクソン2(G26)からエクソン15まで(提供されたcDNAからの部分的3'UTRが含まれる)}を、ヒトITGB3イントロン5(647bp)をヒトエクソン5および6に対応する配列の間に挿入することによって操作した。転写STOPカセットをヒト部分的3'UTRのすぐ下流に挿入する。操作したヒトITGB3のcDNAをマウスエクソン1中のそ

10

20

30

40

50

の対応する位置に挿入する。マウス細胞中でのヒトITGB3タンパク質のプロセッシングを最適化するために、ヒト化対立遺伝子は、マウスItgb3シグナルペプチド(エクソン1内にコードされている)とヒトITGB3成熟タンパク質との融合タンパク質を発現する。選択マーカー(Puro)はF3部位が隣接しており、ヒトITGB3 3'UTRの下流に挿入されている。F1p媒介性の選択マーカーの除去の後のヒト化対立遺伝子。ヒトItgb3タンパク質はマウスItgb3プロモーターの調節下で発現される。その3'UTR領域を含めた操作したヒトITGB3 cDNAの、マウスエクソン1内への挿入により、マウスItgb3遺伝子の失活化がもたらされるはずである。最終標的化ベクターの確認された配列を図3に示す。

【0318】

ヘテロ接合性標的化C57BL/6 ES細胞の作製

10

C57BL/6N ES細胞系を、20%のFBSおよび1200u/mLの白血病阻害因子を含有するDMEM高グルコース培地中のマウス胚性線維芽細胞からなる、有糸分裂的に失活させた供給層上で成長させる。1×10⁷個の細胞および30μgの直鎖状にしたDNAベクターを240Vおよび500μFで電気穿孔する。クローニングの選択は電気穿孔後の2日目に開始したピューロマイシン選択(1μg/mL)に基づき、ガンシクロビル(2μM)を用いた対抗選択は5日目に開始した。8日目にESクローニングを単離し、拡大後にササンプロッティングによって分析した。

【0319】

ヘテロ接合性動物の作製：

ホルモンを投与した後、過排卵のBalb/cの雌をBalb/cの雄と交配させた。交尾後3.5日目に胚盤胞を子宮から単離した。微量注入には、胚盤胞を鉛物油下で1滴の15%のFCSを含むDMEMに入れた。12~15マイクロメートルの内径を有する平らな先端の圧電作動の微量注入ピペットを用いて、10~15個の標的化C57BL/6 N.tac ES細胞をそれぞれの胚盤胞内に注入した。回収後、8個の注入した胚盤胞を、交尾後2.5日の擬似妊娠したNMR1雌のそれぞれの子宮角に移植した。キメラ(G0)において、ES細胞のBalb/c宿主への毛皮色寄与(黒/白)によってキメラ化が測定された。高度にキメラのマウスをC57BL/6雌の株に繁殖させた。生殖系列伝達は、黒い株C57BL/6の子孫(G1)の存在によって同定された。

20

【0320】

ホモ接合性動物の作製：

子孫G1の作製は、ヘテロ接合性マウスの繁殖またはin vitro受精のどちらかによって繁殖させた。交配および体外受精の最初の試みから、Table 8(表8)に概要を示すように遺伝子型の分布が決定された。

30

【0321】

【表8】

Table 8. ヒト化 GPIIIb マウスの遺伝子型同定。

遺伝子型	体外受精		交配
ヒトItgb3	雄	雌	
ホモ接合性	なし	なし	3
ヘテロ接合性	10	12	7
野生型	8	11	4

40

【0322】

(実施例46)

GPIIIaトランスジェニックマウスにおけるGPIIIa標的化融合タンパク質薬物動態学

AP3抗体は血小板上のヒトGPIIb/IIIa(インテグリン II-3)受容体と結合するが、ネズミGPIIb/IIIaを認識せず、薬物動態学(PK)分析に野生型マウスを使用することが妨げられる。AP3-FVIII融合体またはコンジュゲートのPKプロフィールは、AP3と受容体との結合を可能にするネズミGPIIbと会合するヒトGPIIIaを発現するトランスジェニックマウス(Taconic M&Bで繁殖)で分析することができる。GPIIIaトランスジェニックマウスはAP3-FVIII融合体またはコンジュゲートの単一の静脈内注射を受け、血液は、注射後288時間までの時点に前眼窩叢から収集する。研究中に約3個の試料をそれぞれのマウスから収集し、2~

50

4個の試料をそれぞれの時点で収集する。血液を安定化させ、適切な緩衝液で希釈する。注射したAP3-FVIII融合体またはコンジュゲート(遊離および/またはプレート結合)は、ELISAまたはフローサイトメトリーによって、N8に対する抗体または直接標識したAP3-FVIII融合体もしくはコンジュゲートのいずれかを用いて、定量することができる。

【0323】

(実施例47)

GP111aトランスジェニックマウスにおけるGP111a標的化融合タンパク質の効果の持続期間

動物疾患モデルにおけるGP111a標的化融合タンパク質の効果の有効性および作用持続時間を評価するために、ヒト化IgG3受容体を有するマウス株を作製する。作製したマウス株は他の(トランスジェニック)マウス株と交雑させてもよく、これには、それだけには限定されないが、凝固第VIII因子または第IX因子を欠くマウスが含まれる。マウスは、天然の交配によってまたは体外受精移植を用いて繁殖させ得る(たとえばG.Vergara、Theriogenology、1997年;47、1245～1252頁)。あるいは、ヒト化血小板は骨髄移植によって他のマウスに移植し得る。骨髄細胞をヒト化マウスから、たとえばShiら(Blood、2008年;112、2713～2721頁)に記載の方法によって単離し、適切に調製したレシピエントマウス、すなわち第VIII因子または第IX因子を欠くマウス内に注射する。有効性は、尾部出血試験において出血を低下させる能力(Holmbergら、J Thromb Haemost、2009年;7:1517～22頁)またはFeC_{I₃}傷害モデルにおいて血餅を形成する能力(MollerおよびTranholm、Haemophilia、2010年;16、e216～e222頁)を測定することによって、上述の動物モデルで試験することができる。作用持続時間は、上述のモデルにおいて延長した後の薬物の有効性によって試験することができる。

10

20

【図1】

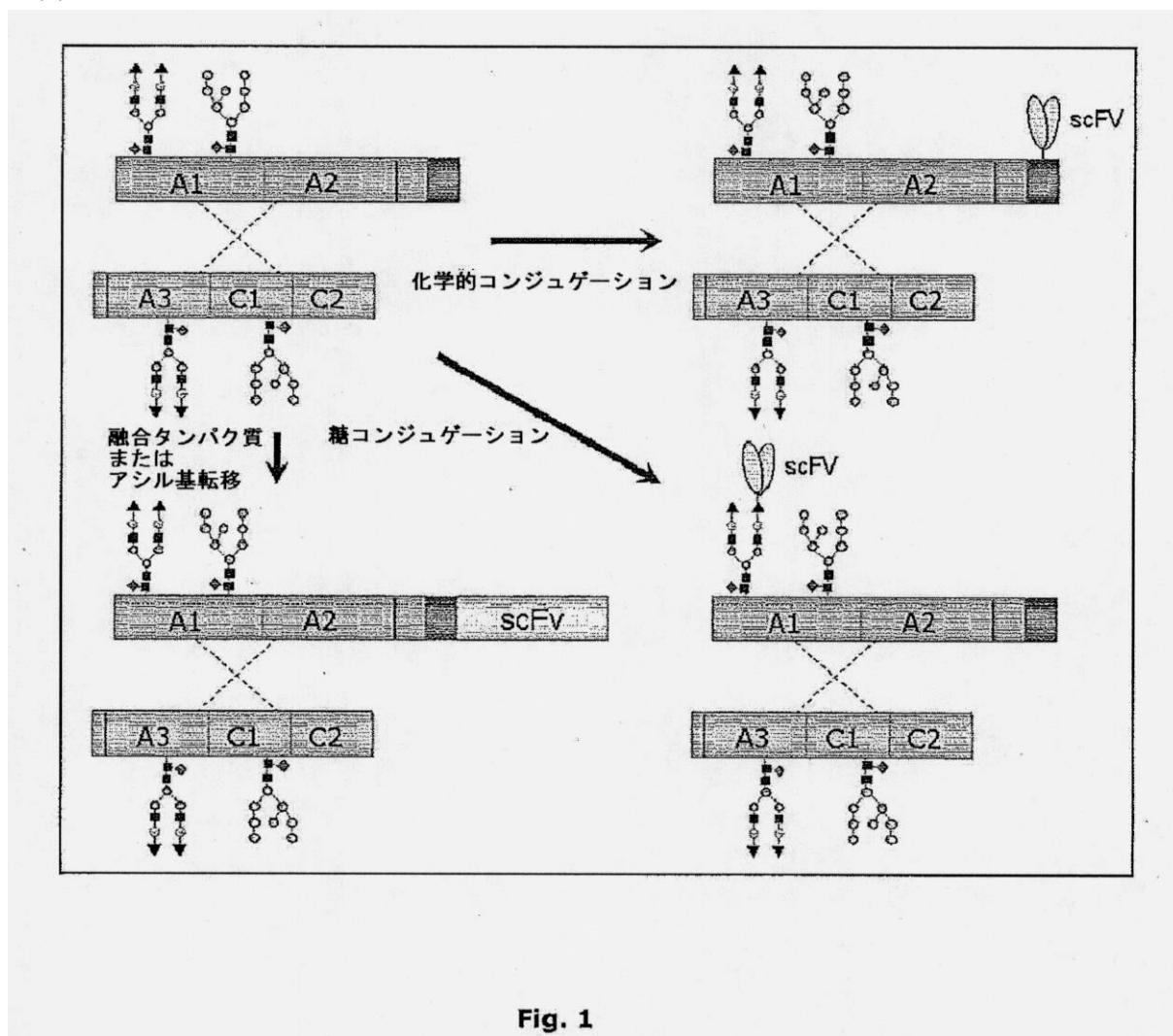
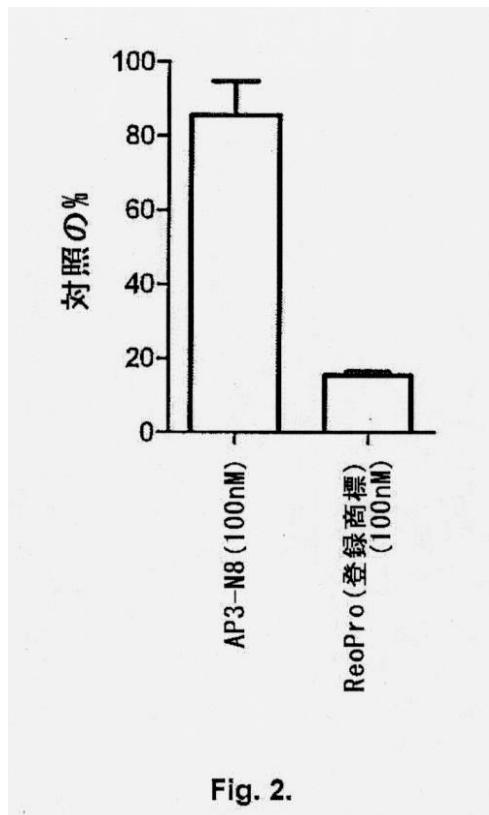
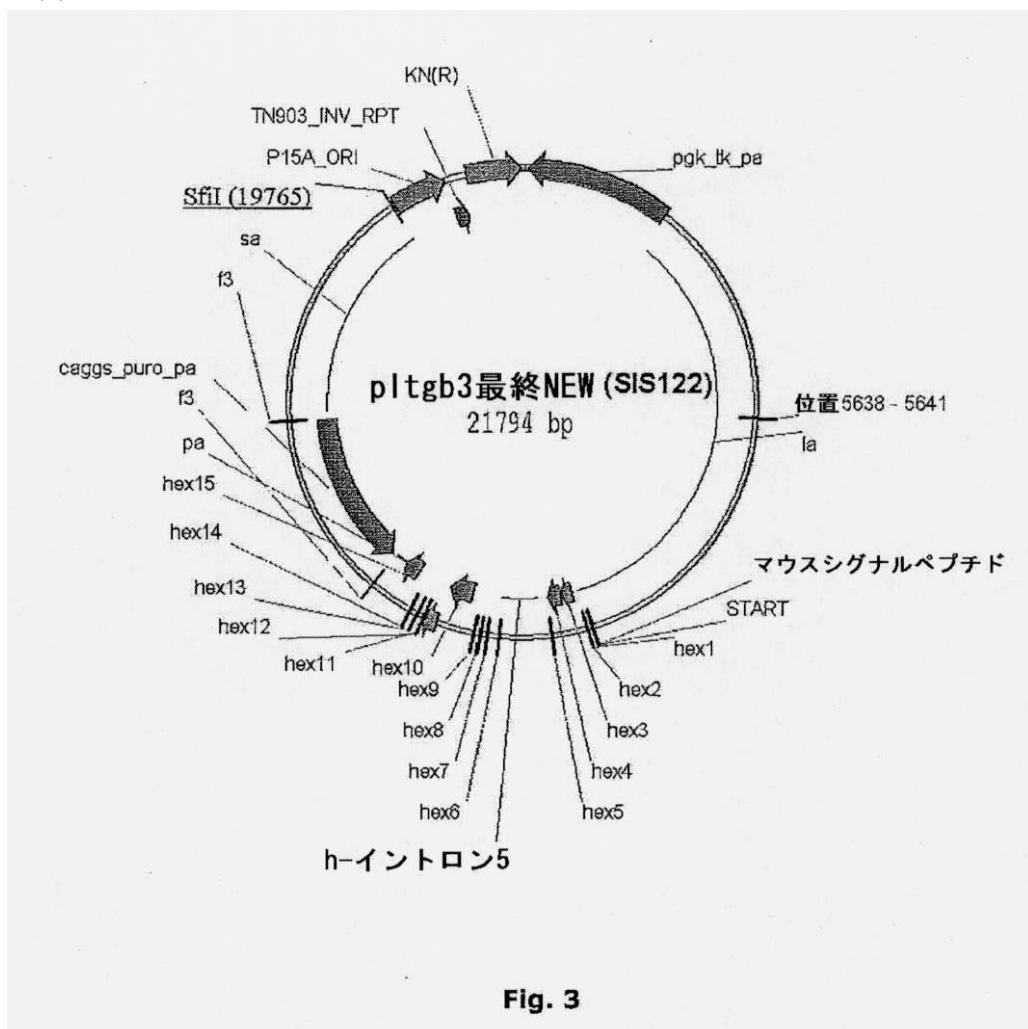


Fig. 1

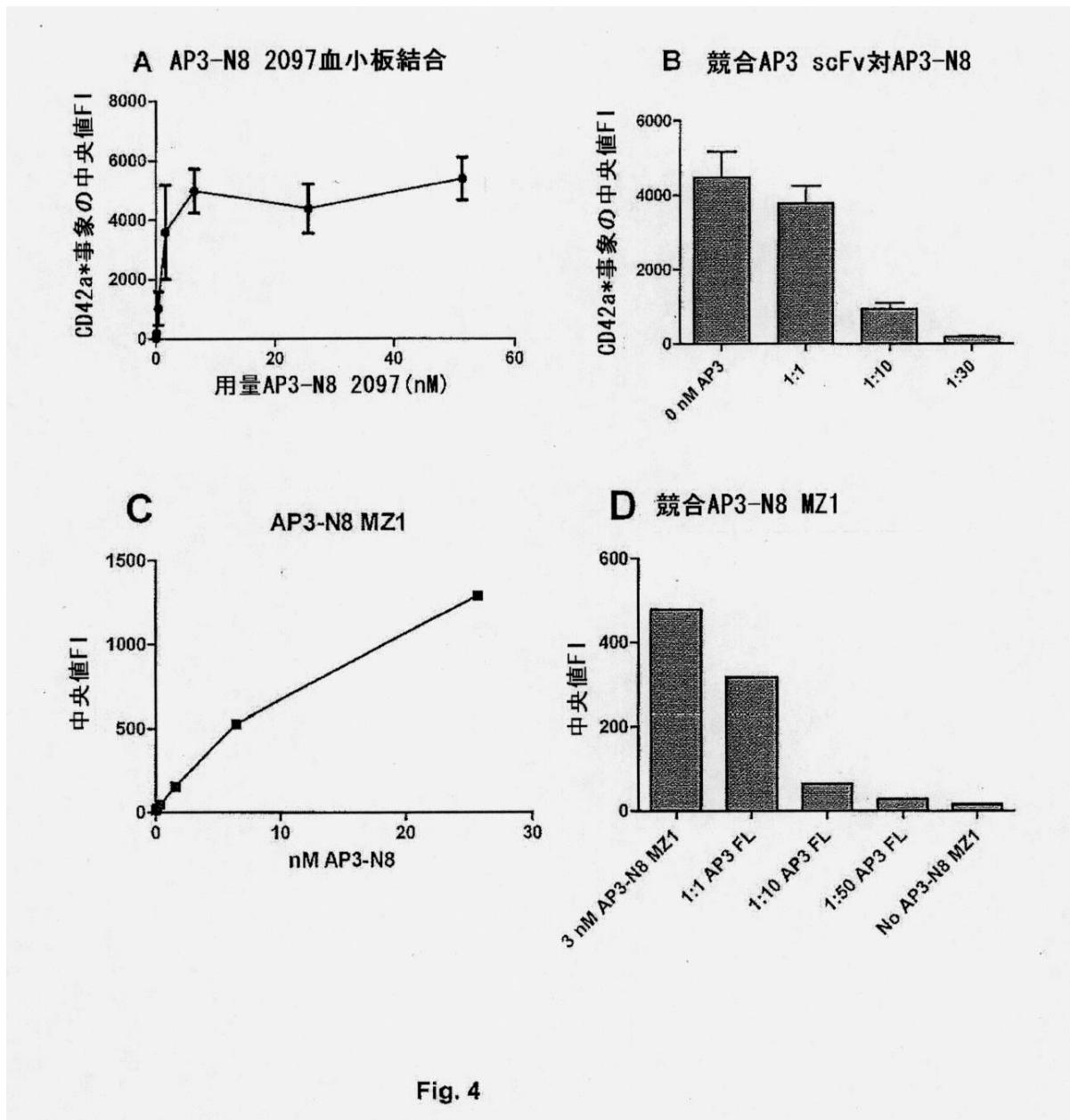
【図2】



【図3】



【図4】



【配列表】

0005770161000001.app

フロントページの続き

			F I		
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
A 6 1 K	38/43	(2006.01)	A 6 1 K	37/465	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
			A 6 1 P	7/04	

(72)発明者 トニー・プサテリ

アメリカ合衆国・ニュー・ジャージー・08844・ヒルズバラ・イースト・マウンテン・ロード
・181

(72)発明者 トーマス・アール・バーネット

アメリカ合衆国・ノース・カロライナ・27514-1415・チャペル・ヒル・ラウンドツリー
・ロード・105

(72)発明者 イエンス・ブヒアルト

デンマーク・DK-2820・ゲントフテ・ヴァンゲゼヴァイ・115

(72)発明者 ベルント・ペシュケ

デンマーク・DK-2760・モーレウ・エスケビュエーガルド・56・2・ティヴィ

(72)発明者 ミケール・コフォーズ・ハンセン

デンマーク・DK-2200・コペンハーゲン・エヌ・アルゼスロゲーゼ・45シ・3・ティホ

(72)発明者 マガリ・ア・ズンデル

デンマーク・DK-2870・デュセゴー・プランテヴァイ・27・3・ティ・ホ

(72)発明者 カルステン・ベーレンス

デンマーク・DK-2200・コペンハーゲン・エヌ・ルンドトフテガーデ・107・1・ティホ

(72)発明者 エヴァ・ホ・ノーリング・オルセン

デンマーク・DK-2750・バラロプ・ピレホイヴァイ・26

(72)発明者 ヘニング・ステンニケ

デンマーク・DK-2980・コゲデール・ノーアスクランテン・59

審査官 一宮 里枝

(56)参考文献 國際公開第2009/140598 (WO, A1)

特開平02-000296 (JP, A)

國際公開第2009/108806 (WO, A1)

Newman, PJ, et al., Quantitation of membrane glycoprotein IIIa on intact human platelets using the monoclonal antibody, AP-3, Blood, 1985年 1月, vol. 65, no. 1, p. 227-232

Michnick, D. A., et al, Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage, Journal of Biological Chemistry, 1994年 8月 5日, vol. 269, no. 31, p. 20095-20102

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00-15/90

A 6 1 K 39/00-39/44

A 6 1 P 7/04

C 0 7 K 1/00-19/00

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / A G R I C O L A / S C I S E

ARCH(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)