

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4906873号
(P4906873)

(45) 発行日 平成24年3月28日 (2012. 3. 28)

(24) 登録日 平成24年1月20日 (2012. 1. 20)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/755 (2006. 01)

C O 7 K 14/755

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 31/736 (2006. 01)

A 6 1 K 31/736

A 6 1 P 37/02 (2006. 01)

A 6 1 P 37/02

C O 8 B 37/00 (2006. 01)

C O 8 B 37/00

Z

請求項の数 20 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2008-546528 (P2008-546528)
 (86) (22) 出願日 平成18年12月22日 (2006. 12. 22)
 (65) 公表番号 特表2009-520775 (P2009-520775A)
 (43) 公表日 平成21年5月28日 (2009. 5. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2006/002892
 (87) 国際公開番号 W02007/071850
 (87) 国際公開日 平成19年6月28日 (2007. 6. 28)
 審査請求日 平成21年4月6日 (2009. 4. 6)
 (31) 優先権主張番号 0513120
 (32) 優先日 平成17年12月22日 (2005. 12. 22)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 309009694
 インスティテュート ナショナル デ ラ
 サンテ エト デ ラ ルシエルシェ メ
 ディケール エタブリッセメント パブリ
 ック デ ルシエルシェ ア カラクテレ
 サイエントフィクエ エト テクノロ
 ジークエ
 フランス国 7 5 6 5 4 パリ セデック
 ス 1 3, ルー デトルビアク, 1 0 1
 (73) 特許権者 508183139
 エルエフビー バイオテクノロジー
 フランス国 9 1 9 4 0 レ ウリス ゼ
 ットエー デ コータボエウフ 3 アベ
 ニュー デ トロピクイス

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 F V I I I 免疫応答を阻害する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原を取り込むことができる細胞と反応する能力及びその細胞に取り込まれることができる能力が天然の因子 V I I I によって低下あるいは阻害される脱グリコシル化因子 V I I I であって、前記脱グリコシル化がエンドーベーター N-アセチルグルコサミニダーゼ型の単一の酵素の作用によってなされ、前記酵素は、オリゴマンノース型およびハイブリッド型の炭水化物構造を切断する能力を有しているが、複合型の炭水化物構造を切断する能力を有していない、脱グリコシル化因子 V I I I。

【請求項 2】

抗原を取り込むことができる上記細胞の表面に存在する受容体と相互作用する能力が低下あるいは阻害される請求項 1 に記載の脱グリコシル化因子 V I I I。

【請求項 3】

上記受容体がマンノース特異的受容体である請求項 2 に記載の脱グリコシル化因子 V I I I。

【請求項 4】

上記受容体がマンノース受容体 C D 2 0 6 あるいは D C - S I G N (樹状細胞特異的細胞内接着分子 3 (I C A M - 3) - グラビング非インテグリン) 受容体 C D 2 0 9 である、請求項 3 に記載の脱グリコシル化因子 V I I I。

【請求項 5】

抗原を取り込むことができる上記細胞が抗原提示細胞 (A P C) であることを特徴とす

10

20

る、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の脱グリコシル化因子 V I I I。

【請求項 6】

上記抗原提示細胞（A P C）が樹状細胞あるいは B リンパ球であることを特徴とする、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の脱グリコシル化因子 V I I I。

【請求項 7】

抗原を取り込むことができる上記細胞が、マクロファージ、内皮細胞、肝洞様毛細血管内皮細胞、肝クッパー細胞から選択されることを特徴とする、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の脱グリコシル化因子 V I I I。

【請求項 8】

脱グリコシル化がノイラミニダーゼ、ベータ・ガラクトシダーゼ、及びアルファ・マンノシダーゼで構成される群から選択される 1 つあるいは複数の酵素を用いなくとも得られることを特徴とする、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の脱グリコシル化因子 V I I I。

10

【請求項 9】

上記エンドーベーター N－アセチルグルコサミニダーゼがエンドーベーター N－アセチルグルコサミニダーゼ F 1 及びエンドーベーター N－アセチルグルコサミニダーゼ H で構成される群から選択されることを特徴とする、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の脱グリコシル化因子 V I I I。

【請求項 10】

上記エンドーベーター N－アセチルグルコサミニダーゼ F 1 がクリセオバクテリウム（フラボバクテリウム）メニンゴセプトチカム由来のエンドーベーター N－アセチルグルコサミニダーゼ F 1であることを特徴とする、請求項 9 に記載の脱グリコシル化因子 V I I I。

20

【請求項 11】

上記エンドーベーター N－アセチルグルコサミニダーゼ H がストレプトマイセス・ピカタス由来のエンドーベーター N－アセチルグルコサミニダーゼ Hであることを特徴とする、請求項 9 に記載の脱グリコシル化因子 V I I I。

【請求項 12】

薬品として使用するための、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の脱グリコシル化因子 V I I I。

30

【請求項 13】

血友病患者の治療のための医薬品として用いるための、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の脱グリコシル化因子 V I I I。

【請求項 14】

タイプ A あるいはタイプ B の血友病患者の治療のための医薬品として用いるための、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の脱グリコシル化因子 V I I I。

【請求項 15】

血友病患者の治療を目的とする医薬品調製のための、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の脱グリコシル化因子 V I I Iの使用。

【請求項 16】

外来因子 V I I I と組み合わせて、血友病患者の治療を目的とする医薬品を調製するための請求項 15 に記載の脱グリコシル化因子 V I I Iの使用。

40

【請求項 17】

タイプ A あるいはタイプ B の血友病患者の治療のための医薬品を調製するための請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の脱グリコシル化因子 V I I Iの使用。

【請求項 18】

血友病患者における外来性因子 V I I I の半減期を延長することを目的とした医薬品調製のための請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の脱グリコシル化因子 V I I Iの使用。

【請求項 19】

血友病患者における外来性因子 V I I I の免疫原性を低下させることを目的とした医薬

50

品調製のための請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の 脱グリコシル化因子 V I I I の使用。

【請求項 2 0】

請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの 脱グリコシル化因子 V I I I と、1 つあるいは複数の薬学的に許容される補助剤及び／又は賦形剤とを含む 医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、抗原をエンドサイトーシスすることが可能な免疫系の細胞による F V I I I (第 V I I I 因子) のエンドサイトーシスをブロックすることによって、抗 F V I I I 免疫応答を阻害する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

血友病 A は染色体 X の異常に起因する遺伝性疾患であり、その病気に冒されている人において、それ自体で血餅を形成する能力がないことによって示される。この疾患は、凝固に関与する蛋白質、第 V I I I 因子 (F V I I I) の遺伝子における突然変異の結果であり、これは、血液中における F V I I I の完全な欠如か、またはその部分的な欠乏を引き起こす。

【0 0 0 3】

血友病 A は、血液凝固に影響を与える不全症の中で最も一般的である：フランスにおいて、5 0 0 0 人のうち 1 人の男性が冒されている。これは血友病に苦しむ患者の内の 8 0 % に相当する。他のタイプの血友病、血友病 B は、血友病に苦しむ患者の 2 0 % にみられ、それは、他の凝固因子、第 I X 因子の欠乏に起因する。

【0 0 0 4】

血友病 (タイプ A または B) の現在の治療は、欠乏しているかまたは欠如している凝固因子の静脈投与により行われる。フランスにおいて、血友病の治療のための F V I I I は、ラボラトワール、フランセ、デュ、フラクシオヌマン、エ、デ、ビオテクノロジー (Laboratoire Francais du Fractionnement et des Biotechnologies ; LFB) によってまたはインターナショナル・ファーマシューティカル・ラボラトリーズ (international pharmaceutical laboratories) によって提供される血液誘導化薬物の形態で、ならびに遺伝子工学方法によって調製された遺伝子組換え薬物の形態で、入手可能である。実際に、F V I I I をコードする DNA が、単離されおよび哺乳動物細胞において発現され (Wood ら、Nature (1984) 312 : 330-337)、そしてそのアミノ酸配列が cDNA から誘導された。

【0 0 0 5】

分泌された F V I I I は 3 0 0 Kda (2 3 3 2 アミノ酸) の分子量を有する糖蛋白質であり、これは、内因性凝固経路の活性化において重要な役割を果たしている。不活性 F V I I I は、以下の 6 つの領域からなる：N 末端から C 末端へ、A 1 (残基 1-372)、A 2 (残基 373-740)、B (残基 741-1648)、A 3 (残基 1649-2019)、C 1 (残基 2020-2172) および C 2 (残基 2173-2332)。分泌後、F V I I I は、フォン・ビルブランド因子 (Wilbrand Factor ; WF) と相互作用し、これは、F V I I I を血漿プロテアーゼから保護する。F V I I I は、この形態で血液中を循環する。F V I I I は、トロンビンによる切断時に、WF から解離する。この切断は、ドメイン B の排除、およびドメイン A 1、ドメイン A 2 および軽鎖 A 3 - C 1 - C 2 からなるヘテロダイマー (heterodimer) の形態で F V I I I の活性化を生じさせる。F V I I I は、この形態で血漿中を循環する。このヘテロダイマーは、重鎖 (A 1、A 2) および軽鎖 (A 3、C 1、C 2) からなる。

【0 0 0 6】

10

20

30

40

50

F V I I I が血友病患者へ注入されると、それは、患者の血流中のフォン・ビルブラント因子へ結合する。活性化第 V I I I 因子は、活性化第 I X 因子の補因子として作用し、第 X 因子の活性化第 X 因子への変換を促進する。活性化第 X 因子は、プロトロンビンをトロロンビンへ変換する。次いで、トロロンビンは、フィブリノーゲンをフィブリンへ変換し、続いて血餅が形成される。

【0007】

F V I I I の投与で遭遇する主な問題は、《阻害抗体 (i n h i b i t o r y a n t i b o d i e s) 》と呼ばれる、患者における F V I I I に対する抗体の出現である。これらの抗体は、F V I I I のプロ凝固活性 (p r o c l o t t i n g a c t i v i t y) を中和し、これは、注入されるとすぐに不活性化される。従って、投与された凝固因子は、出血が停止し得る前に破壊され、これは、血友病の重大な合併症であり、治療を無効にしてしまう。更に、ある遺伝的に非血友病性の患者は、内因 F V I I I に対するインヒビターを発現し得る：これは、後天性血友病である。

10

【0008】

F V I I I の作用に対する抗 F V I I I 抗体干渉 (i n t e r f e r e n c e) には、F V I I I の蛋白分解性切断および F V I I I と種々のパートナー、例えばフォン・ビルブラント因子 (V W F) 、リン脂質 (P L) 、第 I X 因子、活性化第 X 因子 (F X a) または A P C (A c t i v a t e d P r o t e i n C ; 活性化プロテイン C) との相互作用における干渉など多数の機構が存在する。

20

【0009】

F V I I I に対する特定の免疫応答の開始の第 1 段階は、抗原提示細胞による F V I I I のエンドサイトーシスである。樹状細胞 (D C) は最も効力のある抗原提示細胞 (A P C) であり、一次ナイーブ T 細胞を活性化することができる希少なタイプの A P C の一つである。従って D C は、抗原 (1 , 2) に対する特定の免疫応答を開始することができる。これらの D C は、受容体を介して、あるいはマクロピノサイトーシスによって抗原を取り込み、従って、受容体によって媒介されるエンドサイトーシスがイン・ビボでの D C にとって好適である。

【0010】

D C の表面は無数のエンドサイトーシス受容体を有しており、それら受容体の大部分は、二価イオン、主にカルシウムに強く依存している (図 1) 。無数のエンドサイトーシス受容体は、それらの糖認識ドメイン (C R D) のために、抗原上に存在する糖残基に特異的であり、C 型レクチン受容体 (C L R) と呼ばれる。従って、抗原上のマンノース残基は、マンノース受容体 (M R , C D 2 0 6) 、 D C - S I G N 受容体 (C D 2 0 9) 、デクチン、 D E C - 2 0 5 (C D 2 0 5) を包含する樹状細胞の表面上の一連のマンノース感作性 C L R によって認識される。マンナンは、マンノースに対して感作性があるこれらマンノース感作性 C L R 用の、特に M R および D C - S I G N (3 - 5) 用のリガンドである。樹状細胞の D C - S I G N 分子は T リンパ球の I C A M - 3 分子と結合する。この特定の相互作用は、樹状細胞および T L 間の免疫シナプスの開始において重要な役割を果たす。リンパ球の活性化は、抗 D C - S I G N 阻止抗体によって阻害される。

30

【0011】

F V I I I 分子は、N に結合した潜在的グリコシル化部位である 2 5 のコンセンサス配列 (A s n - X x x - T h r / S e r) を含み、その内の 2 0 がグリコシル化することが実証されている (6) 。N 結合型グリコシル化の中には、F V I I I - B D D (B ドメイン欠失組換え F V I I I 、 R e F a c t o 、 W y e t h) 上で保たれるものもある。血液由来 F V I I I および遺伝子組換え F V I I I の両 F V I I I は同様のグリコシル化特性を示し、残基がガラクトースまたはマンノースで終端している (8 , 9) 。

40

【0012】

故に、F V I I I および F V I I I - B D D は、樹状細胞の表面上の C L R に対するリガンドの候補である。

【発明の開示】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

例えば、FV I I I の産生を刺激する合成ホルモンであるデスモプレシン、プロトロンビン複合体濃縮物または活性化プロトロンビン複合体濃縮物などの凝固を促進する作用物質、組換えV I I a 因子を含む処理、および多量のまたは中間量のFV I I I を灌流培養して寛容性を誘発する方法を含む処理など、抗FV I I I 免疫応答が招く結果を減衰させることのできる処理が幾つか存在する。しかし、これらの方法はコストが非常に高く、あまり有用ではない。

【0014】

FV I I I のインヒビター抗体に対すさらにより最近の戦略的努力は、該インヒビター抗体を中和する抗イディオタイプ抗体（他の抗体の可変領域と相互作用する能力を有する抗体）の投与を考慮に入れている（Saint-Remy JMら、（1999）Vox Sang；77（suppl 1）21?24）。この免疫ポリクローナル応答のインビボ分析の複雑性のために、FV I I I の特定ドメインに対するモノクローナル抗体が、研究チームによって単離された。従って、IgG4κタイプのヒトモノクローナル抗体（LE2E9）が単離された。この抗体は、FV I I I のドメインC1に対するものであり、そしてFV I I I の補因子活性およびvWFへのその結合を阻害する（Jacqueminら、（2000）Blood 95：156-163）。同一の様式で、インヒビターを有する血友病Aに苦しむ患者のメモリーB細胞のレパートリーから産生された、BO2C11と呼ばれる（IgG4κ）FV I I I のドメインC2に対するヒトモノクローナル抗体が、単離された（Jacqueminら、Blood 1998 Jul 15；92（2）：496-506）。BO2C11は、FV I I I のドメインC2を認識し、そしてVWFおよびリン脂質へのその結合を阻害する。それは、天然および活性化FV I I I のプロ凝固活性（proclotting activity）を完全に阻害する。モノクローナル抗体の更なる例は、FV I I I のドメインA2に対するBO11B2抗体である。BO11B2抗体は、FV I I I 活性の99%を阻害する。ドメインA2へ結合することによって、それは、FIXa（これは、FV I I I のこの領域内に低親和性結合部位を含有する）の結合に干渉しそして阻害し得、そして、その瞬間から、FIXaの酵素活性を阻害する。第二の考えられる作用様式は、FV I I I のヘテロダイマー形態（A2：A1およびA3：C1：C2）とFV I I I のヘテロトリマー形態（A2およびA1およびA3：C1：C2）との間の平衡におけるその干渉であり、これらの複合体からのドメインA2の分離（dissociation）を促進し、それらを非機能性にする（Ananyeva NMら、（2004）Blood Coagul Fibrinolysis. Mar. 15（2）：109-24. Review）。

【0015】

しかし、抗FV I I I 免疫応答はポリクローナルであり、そして患者中で発現されるFV I I I インヒビター抗体は、必ずしも、FV I I I の単一のドメインに対するわけではない。

【0016】

FV I I I の単一ドメインに対する抗FV I I I 抗体に対する抗イディオタイプ抗体の投与からなる処理は、患者中で発現される抗FV I I I 免疫応答を部分的にしか中和することができない。

【0017】

抗FV I I I 免疫応答が出現する前の作用に対して利用可能な処理は存在せず、そのためそれを回避する処理も存在しない。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明は、抗原を取り込むことができる細胞と反応する能力及びその細胞に取り込まれることができる能力が天然の因子V I I I によって低下あるいは阻害される脱グリコシル化因子V I I I あるいはその断片である。

【発明の効果】

【0019】

本発明によれば、脱グリコシル化V I I I因子またはそのフラグメントが提供され、この脱グリコシル化V I I I因子においては、天然の第V I I I因子に比して、相互作用の能力および抗原をエンドサイトーシスすることが可能な細胞によってエンドサイトーシスされる能力が減少または阻害される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

[発明の概要]

従来技術における上述のような不利点を解消するために、出願人は、抗原をエンドサイトーシスし、その結果として抗F V I I Iインヒビター抗体の形成を阻害することができる免疫系の細胞によって、F V I I Iのエンドサイトーシスをブロックし、またF V I I Iの半減期を増加させることができることを発見した。

【0021】

本発明の一態様によれば、脱グリコシル化V I I I因子またはそのフラグメントが提供され、この脱グリコシル化V I I I因子においては、天然の第V I I I因子に比して、相互作用の能力および抗原をエンドサイトーシスすることが可能な細胞によってエンドサイトーシスされる能力が減少または阻害される。

【0022】

もう1つの特定の好適な実施の形態によれば、この脱グリコシル化V I I I因子またはそのフラグメントにおいては、抗原をエンドサイトーシスすることが可能な該細胞の表面上に存在する受容体、特にマンノースに特異的な受容体、より特にマンノース受容体C D 2 0 6またはD C - S I G N受容体C D 2 0 9（非-インテグリンを取り込む樹状細胞特異的細胞間接着分子3（I C A M - 3））との相互作用の能力が低減または阻害される。

【0023】

本発明の好ましい1つの実施の形態によれば、抗原をエンドサイトーシスすることができる該細胞は、抗原提示細胞（A P C）、特に樹状細胞またはBリンパ球である。本発明のもう1つの好ましい形態によれば、抗原をエンドサイトーシスすることができる別の細胞は、マクロファージ、内皮細胞、肝類洞内皮細胞、肝クッパー細胞の内から選択される。

【0024】

本発明の好ましい1つの実施の形態によれば、第V I I I因子またはそのフラグメントは、ノイラミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼおよび α -マンノシダーゼから成る群より選択される1種またはそれ以上の酵素を用いることなく脱グリコシル化される。

【0025】

本発明の特殊な1つの実施の形態によれば、第V I I I因子またはそのフラグメントは、エンドグルコシダーゼ型、特にエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ型の単一の酵素の作用によって脱グリコシル化される。本発明の好ましい1つの実施の形態において、用いられる酵素は、オリゴマンノース型およびハイブリッド型の炭水化物構造を切断する能力を有しているが、複合型の炭水化物構造を切断する能力を有していない。

【0026】

本発明の特定の実施の形態において、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ型の該酵素は、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼF 1およびエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼH、例えばクリセオバクテリウム（フラボバクテリウム）・メニンゴセプティカムのエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼF 1またはストレプトミセス・プリカタスのエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼHから成る群より選択される。

【0027】

本発明のもう1つの実施の形態によれば、本発明の脱グリコシル化V I I I因子またはそのフラグメントは、薬物として、具体的には血友病患者の治療のため、特にタイプAま

10

20

30

40

50

たはタイプBの血友病の治療のために用いられる。本発明のもう1つの実施の形態によれば、本発明の脱グリコシル化V I I I因子またはそのフラグメントは、血友病患者の治療を意図した薬剤の調製のため、あるいはタイプAまたはタイプBの血友病の治療のためにも用いられ、外因性第V I I I因子と組み合わせて好適に用いられる。

【0028】

本発明のさらにもう1つの目的によれば、本発明の脱グリコシル化V I I I因子またはそのフラグメントは、外因性V I I I因子の半減期を増加させることを目的とした、または外因性V I I I因子の免疫原性を低減させることを目的とした医薬の調製に用いることができる。

【0029】

また本発明のもう1つの態様は、少なくとも本発明の脱グリコシル化V I I I因子またはそのフラグメント、および医薬的に許容可能な一つ以上の補助剤および／または賦形剤を含有する医薬組成物にも関係している。

【0030】

本発明の最後の目的は、血友病患者の治療を目的とした、またはタイプAまたはタイプBの血友病の治療を目的とした医薬の調製のための、マンナンを含有する組成物の使用に関するものである。特定の1つの実施の形態によれば、このマンナンを含有する組成物は、外因性V I I I因子の半減期を増加させること、または血友病患者の外因性V I I I因子の免疫原性を低減させることを目的とした医薬の調製に用いられる。好適な1つの実施の形態によれば、該マンナン組成物は、天然型の外因性V I I I因子および／または本発明による脱グリコシル化V I I I因子またはそのフラグメントをも含有する。

【0031】

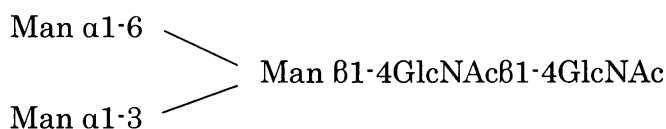
全体として、明細書本文および要約書、また請求項において用いられている以下の用語は、特に指定がない限り以下の意味で用いられる。

【0032】

概括的に述べると、明細書本文および要約書、また請求項において、アスパラギン残基(N)に結合した炭水化物鎖(この残基は、例えば天然または脱グリコシル化F V I I Iなどの、ポリペプチドに含有され得る)の定義は、当業者にはよく知られており、2つのN - アセチルグルコサミン(G l c N A c)および3つのマンノースから成る塩基構造を有しており、またその他の単糖類がこの構造上にグラフト結合していてもよい。この塩基構造は、位置β 1、4で結合した2つのN - アセチルグルコサミン(G l c N A c)残基を一緒にして結合させることにより形成される。その一方は、蛋白質とのN - グリコシド結合を形成する(アスパラギンによって)。他方は位置β 1、4のマンノース残基と結合し、それ自体は、例えば位置α 1、6およびα 1、3の2つのマンノース残基と結合する。

【0033】

【化1】



【0034】

本願において示されるアスパラギンに結合した炭水化物鎖は、単なる1例である。したがって、いかなる態様においても本発明がこれらに限定されるわけではない。

【0035】

“分岐”は単糖を末端マンノースに付加することによって形成される。糖の性質によって、このように3つの型のグリカン構造で区別する。

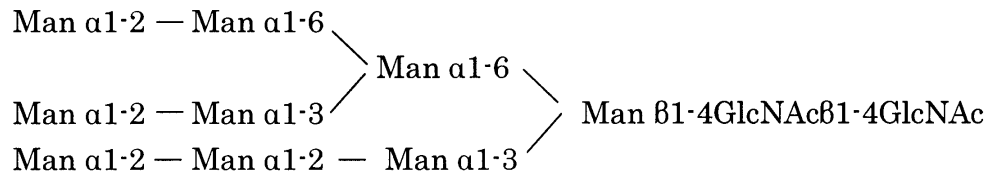
【0036】

- マンノース残基の塩基構造への付加に相当する“オリゴマンノース”型構造；例えば

:

【0037】

【化2】



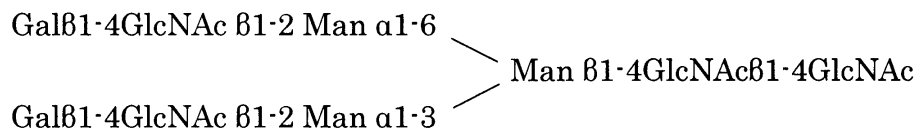
【0038】

10

- N - アセチルラクトサミン残基 (LacNAc: Gal β 1, 4 GlcNAc) の塩基構造の末端マンノース (GlcNAcおよびGalの添加は順次であり、GlcNAc T - 1, 2, 3, 4, 5 続いてGal Tの活性の結果生じる) への結合の結果生じる“複合”型構造; 例えば:

【0039】

【化3】



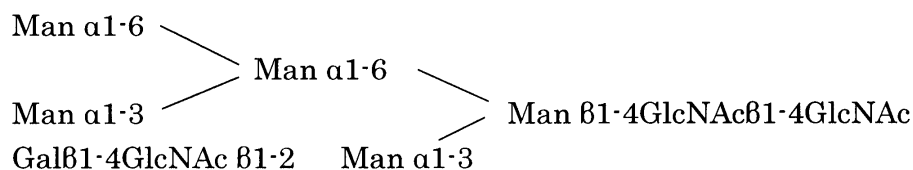
20

【0040】

- その名が示す通り、前記2つの形態の混合である“ハイブリッド”型構造。以下に示す実施例において、 α 1, 6分枝のマンノースはマンノース残基によってのみ置換され、一方 α 1, 3分枝は1つまたは2つのN - アセチルラクトサミン残基によって置換される:

【0041】

【化4】



30

【0042】

[発明の詳細な説明]

本発明は、主として第V I I I因子と抗原をエンドサイトーシスすることが可能な細胞との相互作用、および該細胞による第V I I I因子のエンドサイトーシスを阻害することができる化合物に関する。

40

【0043】

実際に、出願人はマンナンおよび脱マンノシル化F V I I Iなどの特定の化合物が樹状細胞によるF V I I Iのエンドサイトーシスを阻害することができることを証明した。

【0044】

また、出願人は、このようにマンナンが、F V I I Iのプロ凝固活性またはF V I I IとVWFとの相互作用を阻むことなくF V I I Iに特異的なT細胞の増殖を阻害することをも証明した。

【0045】

具体的に述べると、この化合物は、第V I I I因子と、抗原をエンドサイトーシスする

50

ことが可能な細胞上に存在し、該細胞による第V I I I因子のエンドサイトーシスの原因ともなる受容体との相互作用を阻害することができる。

【0046】

このように本発明には、F V I I Iのエンドサイトーシスの原因となる細胞上の受容体を阻害するF V I I I以外の化合物、そしてエンドサイトーシスの原因となる細胞との結合能力が天然のF V I I Iに比して低い修飾F V I I I分子その全体またはそのフラグメントも含まれる。これら2つのタイプの化合物はそれぞれ、抗原をエンドサイトーシスすることが可能な免疫系の細胞によるF V I I Iのエンドサイトーシスを阻害する。

【0047】

修飾F V I I I分子またはそのフラグメントの場合、該F V I I I化合物は、それをエンドサイトーシスすることが可能な細胞とのそれ自体の相互作用および該細胞によるそれ自体のエンドサイトーシスを阻害する。それゆえ修飾F V I I Iまたはそのフラグメントのエンドサイトーシスは天然のF V I I Iに比して低減される。このF V I I Iは、天然のF V I I Iに対して、そのグリコシル化のレベルに修飾されるのが好ましい。

【0048】

本発明の好ましい実施の形態において、上記受容体はマンノースに対して特異的であり、特に好ましくは、マンノースに対して特異的な上記受容体はマンノース受容体C D 2 0 6またはD C - S I G N（非 - インテグリンを取り込む樹状細胞特異的細胞間接着分子3（I C A M - 3））受容体C D 2 0 9である。

【0049】

本発明の特定の実施の形態において、抗原をエンドサイトーシスすることが可能な上記細胞は、抗原提示細胞、例えば樹状細胞またはBリンパ球である。

【0050】

このように、本発明による化合物は抗原提示細胞によるF V I I Iのエンドサイトーシスを阻害することができ、それゆえに免疫応答を惹起するF V I I Iペプチドの提示を阻害することができる。その結果として、本発明による化合物は、抗F V I I I抗体の産生を阻害し、F V I I Iの免疫原性を低減させる。

【0051】

本発明の特定の一実施の形態において、抗原をエンドサイトーシスすることが可能な上記細胞は、マクロファージ、内皮細胞、肝類洞内皮細胞、肝クッパー細胞の内から選択される。

【0052】

これらの細胞は、F V I I Iを排除するためにこのF V I I Iをエンドサイトーシスする。これらの細胞によるF V I I Iのエンドサイトーシスを阻害することによって、本発明による化合物は、F V I I Iの排除経路を減少させ、F V I I Iの循環量を増加させ、そしてそれによりF V I I Iの半減期を増加させる。

【0053】

また本発明は、外因性F V I I Iと組み合わせた血友病の治療を目的とした医薬の調製での本発明による化合物の使用にも関する。

【0054】

具体的に述べると、この医薬は、血友病患者における外因性F V I I Iの免疫原性を低減させ、および／または血友病患者における外因性F V I I Iの半減期を増加させることを目的としている。

【0055】

この場合、この医薬は、そのプロ凝固活性を目的とした外因性F V I I Iまたはそのフラグメントと共に投与される。

【0056】

具体的に述べると、マンナンは、外因性F V I I Iと組み合わせ、血友病患者における外因性F V I I Iの免疫原性を低減させ、および／または血友病患者における外因性F V I I Iの半減期を増加させることによって血友病を治療することを目的とした医薬の調製

10

20

30

40

50

のために使用される。

【0057】

さらに本発明は、血友病の治療を目的とした医薬の調製のための、修飾FV I I Iまたはそのフラグメントの使用に関し、抗原をエンドサイトーシスすることが可能な細胞によるこの修飾FV I I Iのエンドサイトーシスは、天然のFV I I Iに比して低減される。

【0058】

具体的に述べると、このFV I I IまたはFV I I Iのフラグメントは脱マンノシル化される。

【0059】

この場合、上記医薬は、天然のFV I I Iに比して免疫原性が低く、またその半減期が天然のFV I I Iに比して増加してはいるが、そのプロ凝固活性は十分に維持しているFV I I Iを含む。

【0060】

さらに本発明は、本発明による少なくとも1つの化合物、および1つまたはそれ以上の医薬的に許容可能な補助剤および／または賦形剤を含む医薬組成物に関する。

【0061】

[実施例]

以下の実施例は、本発明の範囲に制限を加えることなく、本発明を例示するものである。

【実施例1】

【0062】

実施例1：ヒト単球由来DCの調製

DCを単球から、既報の手順(29)を用いて培養用培地内で変化させて調製した。簡単に述べると、単核になった細胞を、10%ヒトAB型血清、グルタミンおよび抗生物質を補充したRPMI 1640培地中で、プラスチック細胞培養皿上に接着させることによって、60分かけて健常な成人ドナー由来のヘパリン化白血球-血小板層(バフィーコート)から単離した。この培地で3回軽く洗浄することで、非接着性細胞を除去した。接着性単球を、1%ヒトAB型血清および抗生物質を補充したX-VIVO15培地(Cambrex Bio Sciences, Paris, France)内で、500IU/mlの組み換えヒトインターロイキン-4(rhIL-4)、R&D Systems(Lille, France)および1,000IU/mlの組み換えヒト顆粒求マクロファージコロニー刺激因子(rhGM-CSF)、Immunotools(Friesoythe, Germany)の存在下で培養した。全ての補充物質を含む培地の半分を2日毎に交換した。5日間培養した後、DCを富化させた画分に相当する非接着性細胞および僅かに接着性を有する細胞を、回収、洗浄し、その後の実験に使用した。

【実施例2】

【0063】

実施例2：全組み換えヒトFV I I IおよびBドメイン欠失組み換えヒトFV I I Iとフルオレセインとの結合

全組み換えヒトFV I I I(1,000IU, Kogenate, Bayer)またはBドメイン欠失組み換えヒトFV I I I(FV I I I-BDD)(1,000IU, Refacto, Wyeth)を、水中で可溶化し、5mM、4℃でCaCl₂を含む重炭酸緩衝液(pH9.2)に対して透析し、次に4℃で7~8時間かけてフルオレセイン-5-イソチオシアネート(isomer I, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)に結合させた。続いてこの標識FV I I IをRPMI 1640培地に対して透析し、非結合FITCを除去した。このFV I I I-FITCを、標準としてウシ血清アルブミンを用い、ブラッドフォード(Bradford)法により定量した。

【実施例3】

【0064】

実施例 3：ELISAを用いたマンノース受容体の構築物のFVIIへの結合

英国ノッティンガム大学、王室医学センター、分子医療科学科 (School of Molecular Medical Sciences, Queen's Medical Centre, University of Nottingham, UK) の Luisa Martinez-Pomares 教授に、マンノース受容体の構築物、CTLD (4 - 7) - FC および CR - FNII - CTLD (1 - 3) - CR - FC を提供して頂いた。この構築物の全組み換えヒト FVII への結合および Bドメイン欠失組み換えヒト FVII への結合を、直接リガンドをコーティングした ELISA プレートへの結合を測定することによって (マンナンを正のコントロールとして用いた)、または間接的に阻害試験を行うことによって試験した。ELISA プレート (Nunc; MAXISOR D) を、154 mM の NaCl 中で FVII の希釈系列 (開始時は 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で一晩コーティングした。洗浄には全て TTBS 緩衝液 (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, Ca^{2+} 10 mM, NaCl 154 mM および 0.05% Tween-20) を用いた。非反応部位は 3% BSA を含んだ TTBS 緩衝液 (Tween-20 を含まない TTBS) によってブロックした。続いて、このプレートを、3% BSA を含んだ TTBS 緩衝液中で、上記構築物 2 または 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ によって室温で 2 時間培養した。MR 構築物の結合を、HRP (clone JDC-10, Southern Biotechnology Associates, Inc AL, USA) に結合したヒト IgG の FC 部分に特異的なマウス抗体を用いて検出した。HRP の活性を、基質 OPD (o-フェニレンジアミン, Sigma) によって示した。492 nm での吸収度を測定した。阻害試験のため、プレートを各形態の FVII (5.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$) でコーティングした。種々の濃度のマンナンを、FVII でコーティングしたプレートの培養の前に、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の構築物 CTLD (4 - 7) - FC で、室温で 30 分間培養した。上述の方法で吸収度を測定した。

【0065】

結果：

図 3 c および図 3 d

マンノース受容体は 8 個の C 型レクチンドメイン (CTLD) を含有する。：CTLD 4 ~ 7 はマンノシル化構造に対して結合性を有しているが、CTLD 1 ~ 3 は有していない。

図 3 c に示すように、マンナンは CTLD (4 - 7) - FC に対して特異的な結合を示す。FVII および FVII - BDD の両方は、構築物 CTLD (1 - 3) には結合しないが、その一方で、特に CTLD (4 - 7) - FC に対して量依存性の相互作用を示す。これは、FVII のドメイン B 外のグリコシル化 (おそらくマンノシル化を示す) によって分子が MR と相互作用することを示している。

CTLD (4 - 7) - FC で前培養したマンナンは、2 つの形態の FVII の CTLD (4 - 7) - FC への結合を量依存的に阻害する。これは、DC 上の MR がマンナンで飽和し、それによって FVII のエンドサイトーシスが阻害されるという DC の状態を反映している。

【実施例 4】

【0066】

実施例 4：ヒト単球由来 DC による FVII の取り込みのイン・ビトロ試験物質および方法

実施例 1 で得た DC (96-ウェルプレートに 0.4 $\times 10^5$ 細胞/ウェル、100 μl /ウェル) を、X-VIVO 培地中で、実施例 2 で得た種々の量 (0.029、0.057、0.143、0.358 μM) のフルオレセント結合リガンド (FVII-FITC、BDD-FVII-FITC) によって 4℃ または 37℃ で 0、15、60、120 分かけて培養した。培養終了後、この細胞を冷 PBS で洗浄して、フローサイトメトリー法によって分析した。受容体の取り込みへの関与を調べるため、この細胞を、フルオレセインに結合したリガンドを添加する前に、0、0.001、0.01、0.1、1 mg

／mlのマンナン (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) によって37℃で30分間培養した。FVIIII-FITCおよびFVIIII-BDD-FITCに加えて、Biomac (Leipzig, Germany) 社製のFITCに結合したヒト $\alpha 2$ -マクログロブリン-MA ($\alpha 2M$)、Molecular Probes (Leiden, The Netherlands) 社製のデキストラン-FITC (分子量40,000)、Sigma-Aldrich社製のLucifer yellow (LY-CH)を使用した。またFVIIIIの取り込みの検査を、20 μg ／mlの抗マンノース受容体モノクローナル抗体 (PAM-1, isotype IgG1) または抗DC-SIGNモノクローナル抗体 (AZN-D1, isotype IgG1) またはPE-Cy (BD Pharmingen, France) に結合したマウスIgG λ , κ の存在下で行った。DC-SIGNがFVIIIIのエンドサイトーシスに関与しているのかどうかを調べるため、野生型のEBVによって形質転換した、またDC-SIGNでトランスフェクトしたまたはトランスフェクトしないBリンパ球系HD-420を、10% FCS (foetal calf serum: 牛の胎児の血清) および抗生物質を補充したRPMI 1640培地中で、種々の濃度のFVIIII-FITC (0, 0.036, 0.072および0.143 μM) によって2時間培養した。分析はDCに関して行われた。

【0067】

結果:

図2a、図2b

DCは、全FVIIIIおよびFVIIII-BDDを量および時間に比例して取り込む。求められた ΔMFI の値は、37℃および4℃で2時間培養した後のFVIIIIに対して陽性の反応を示すDCの異なる標識を表す。その結果はFVIIIIの取り込みが活性プロセスであることを示している。その後の実験のために、2時間の培養時間および0.143 μM の濃度が選択された。

【0068】

図2c

未熟DCによるFVIIIIの取り込みを、5mMのEDTAでこの細胞を前培養することによって大幅に低下させた (全FVIIIIおよびFVIIII-BDDに対して、それぞれ58.1 $\pm$ 11.1%、62.4 $\pm$ 11.4%の阻害)。これにより受容体の役割が二価イオンに依存していることが示された。DC上の可能性のあるFVIIII受容体 (即ちCD91/LRP、ASGPR、マンノース受容体) を特定の競合リガンドを使用して検査した。38kDの受容体関連蛋白質 (RAP) は、CD91/LRPなどのLDL受容体ファミリーのメンバーによるリガンドのエンドサイトーシスをブロックする。RAPが過剰になると、DCによるFVIIIIのエンドサイトーシスの阻害の妨げとなった。さらに、D-ガラクトース、C型レクチン受容体ASGPRの競合リガンドは、ドメインBの有無とは無関係に、FVIIIIの取り込みを大幅には低減しなかった。対照的に、マンナンの添加 (1mg/ml) は、FVIIIIのエンドサイトーシスを大幅に低減させた (全FVIIIIおよびFVIIII-BDDに対して、それぞれ35.0 $\pm$ 10.0%、41.3 $\pm$ 17.2% ; $p < 0.05$)。この結果は、マンノース感受性CLRがFVIIIIの取り込みに直接的または間接的に関与していることを示している。

【0069】

図2d

マンノース感受性CLRに対するマンナンの特異性を、マンノース感受性CLRの標準的リガンドであるデキストラン、およびLucifer yellow (ly) を用いて確認した。この取り込みはいずれの受容体とも関係なく、マクロピノサイトーシスのみによって進行する。デキストランの取り込みは、マンナンの存在下で80%までブロックされたが、一方lyの取り込みは影響を受けなかった。

【0070】

図2e

10

20

30

40

50

抗原の取り込みに対するマンナンの中和作用は、抗原の濃度とは無関係に、F V I I I、F V I I I - B D Dおよびデキストランの量に比例する。興味深いことに、種々の抗原（ $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）について、マンナンの同じ飽和濃度に到達した。この結果は、これらの抗原のマンナン感受性エンドサイトーシスが類似のマンノース感受性受容体を経由して進行することを示している。

【0071】

図2f

F V I I Iは種々の細胞内受容体と相互作用することができる。

細胞ナ受容体であるC D 9 1 / L R Pを固有に標的とするマンノシル化蛋白質である活性化された $\alpha 2 \text{M}$ をモデル抗体として用いた。 $\alpha 2 \text{M}$ 上でのマンノシル化された残基の発現は、他の受容体が関与している限り、上記抗原の取り込みにはまったく影響を及ぼさない。従って、 $\alpha 2 \text{M}$ の取り込みは過剰なR A Pが存在していれば完全に阻害されるが、マンナンは影響を示さない。

これらの結果は、F V I I I上に存在するマンノシル化された部分が独特な作用を示し、F V I I Iを他のマンノシル化された抗原より抗原が散在している細胞（A P C）により引きつけられやすくすることを示している。

【0072】

図3aおよび図3b

マンノース受容体M R（C D 2 0 6）及びD C - S I G N受容体（D C 2 0 9）を含むD C及び他のA P Cの表面のいくつかの受容体はマンナンに対して感受性を示す。抗体P M A - 1（抗M R）は20.22%のF V I I Iの取り込みを、37.35%のF V I I I - B D Dの取り込みを示したので、M RがF V I I Iのエンドサイトーシスに関与していることを示している。F V I I Iのエンドサイトーシスに対するマンナンの影響が抗M Rモノクローナル抗体のそれより強かったという事実は、D CによるF V I I Iの取り込みが未だその特徴が把握されていないマンナンに対して感受性を示すいくつかの受容体が関与しているということによって説明できる。一方、マンナンによる阻害が増大することは、M Rがいくつかの炭化水素領域（C R D）を有しており、従って、M Rの4番目のC R Dに対してだけ指向される抗体P A M - 1によるよりも高炭水化されたマンナンの方が阻害がより効果的に行われるという事実の結果であるかもしれない。

抗体A Z N - D 1（抗D C - S I G N）は未成熟なD CによるF V I I Iの取り込みを阻害しなかったが、F V I I I - B D Dによる取り込みは17.6%阻害された。B細胞によってトランスフェクトされた細胞によるD C - S I G Nの発現はF V I I Iのエンドサイトーシスの増大をもたらさなかった。

これらのデータはD C - S I G NがヒトD CによるF V I I Iの取り込みにおいて主要な役割を果たしていることを示唆している。

【実施例5】

【0073】

実施例5：自己C D 4 + 細胞の増殖に関するイン・ビトロ・テスト

実施例1のD Cを37度Cの温度で30分間マンナン（ $1 \text{mg}/\text{ml}$ ）を培養した。R P M I 1 6 4 0培地（B a y e r社製、コグネート（K o g n a t e））で透析したF V I I Iを2時間かけて加えた（ $40 \text{g}/\text{ml}$ ）加えた。この細胞を洗浄して、完全培地内でL P S（ $1 \mu\text{g}/50$ 万細胞）で培養した。これらの細胞を洗浄して、M A C S単離キット（ドイツ、M i l t e n y i B i o t e c h, B e r g i s c h G l a s b a c h社製）を用いて対応するドナーのP B M Cから得た自己C D 4 + T細胞を用いて培養した（R P M I 1 6 4 0培地。10%ヒト男性A B血清で補強。96ウェル。1ウェルあたり $200 \mu\text{l}$ ）。C D 4 + T細胞の数は各ウェルで一定にし（1ウェルあたり100,000細胞）、D Cの数は変えた（3ウェル毎に5,000、10,000及び15,000個とした）ので、T : D C細胞比は、20 : 1、10 : 1、及び6.6 : 1であった。

4日間培養した後、トリチウムを取り込んだチミジンを $0.5 \mu\text{Ci}$ 、それぞれのウェ

ルに加えた。これらの細胞を16時間後に取り出して、内部に組み込まれた放射性活性をカウントした。

【0074】

結果：

図4a

マンナンはヒトDCによるFV I I Iのエンドサートシス（細胞内への取り込み）を40%減少させる。

図4a：FV I I Iを加える前に、実施例のDCをそれらだけ、及びマンナンを用いて培養した。LPSの存在下で成熟させてから、DCを自己CD4+Tヘルパー細胞で培養した。マンナンはT細胞の増殖をネガティブな比較対象例の場合によるものとほぼ同等のレベルに減少させた。

10

【実施例6】

【0075】

実施例6：FV I I Iに固有なT細胞の活性化に関するイン・ビトロ・テスト

洗浄後、実施例1のDCを10%FCSを含むDMEM：F12（1：1）培地に再懸濁させ、円形基盤の96ウェル培養プレートの各ウェルに10,000個のDCを入れた。各ウェルにマンナン（1mg/ml）を加えて30分間培養した後、それらのDCを5,000個のD9E9細胞（FV I I Iに固有性を示すT細胞クローン）を用いて、10%のECSと20U/mlのrhl-2を含むDMEM：F12（1：1）培地で、FV I I I及びFV I I I-BDDの量を変えて（10、8、6、4、2µg/ml）、37度Cの温度で20時間培養した。D9E9細胞の場合と同様、EBVで形質変換されたB細胞のLE2E9及びBO2C11系を全FV I I I及びFV I I I-BDDの存在下で培養した。この管理条件は、FV I I I、D9EPあるいはDCが存在しない場合でも維持した。ネガティブな比較対象例として、FV I I Iの等モル濃度で、それらの細胞を用いて培養した。培養期が終了した時点で上澄み液を取り出して、ヒトIFN-γ Duoセット（R&S Systems社のDY285）を用いて、メーカーの指示に従って、IFNγの生産に関するテストを行った。

20

【0076】

結果：

図4b

FV I I IはD9E9細胞を投与量に応じて誘発し、その誘発はマンナンの存在で細大84%まで阻害される（B）。T細胞の増殖は、FIXの存在下で増殖が行われないことで示されるように、固有なものである。（A）

30

マンナンはFV I I I、LE2E9細胞を加えた自己B細胞によるD9E9細胞の活性化を阻止しない（C）。このことは、FV I I Iの免疫源性の低下におけるマンナンの影響力が、FV I I Iに固有性を示すB細胞に対して未だ刺激が与えられていない（つまり、これまで処置を受けていない患者の場合）か、あるいは治療後に阻害因子がまだ形成されていない場合だけ、薬学的に開発可能であることを示している。

【0077】

結論：

マンナンの存在下で誘発されるFV I I Iの取り込みの減少は、CD4+T細胞に対してFV I I Iから誘導されるペプチドの提示を減らし、その結果として、Tリンパ球の活性化を弱めることになる。

40

【実施例7】

【0078】

実施例7：凝固テスト

正常なヒト血漿を同じ量のマンナン（0-4,000mg/ml）を用いて、37度Cの温度で2時間培養した。活性剤としてヒト胎盤プロトロンビン（Date Behring Marburg GmbH）を用い、さらに、基質として、FV I I I枯渇血漿（Date Behring Marburg GmbH）を、そしてフィブリン・タイマ

50

ー (Sysmex CA500, Date Behring) を用いて1段階凝固テストで、残留FV I I I 活性を測定した。希釈はOwren-Koller緩衝液 (Diagnostic Stago, Asniere, France) を用いて行った。

【0079】

結果：

図5a

マンナンはV F V I I I の凝固促進活性を阻止しない。

【実施例8】

【0080】

実施例8：F V I I I のVWFに対するE L I S A法検査

E L I S Aプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) をVWF (VWF, Willefectin, LFB, Les Ulit, France) で1ウェルあたり $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の割合で被覆して、PBS (pH: 7.4) 内で 37°C の温度で1時間培養した。これらのプレートを1%脱脂粉乳と0.1% Tween液を含むPBSで飽和させて 37°C の温度で1時間培養した。F V I I I ($0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$) をそれだけ、マンナン ($0.01-4 \mu\text{g}/\text{ml}$) と共に、あるいは、BO2C11 (ヒト・モノクローナル抗F V I I I IgG) と共に予備培養してから、VWFで被覆したウェルに加えて、 37°C の温度で1時間培養した。マウス・モノクローナル抗F V I I I IgG反応性が、ストレプトアビジン・ペロキシダーゼ (Jackson Laboratories) 及びそれらの基質に結合したウサギ抗マウスIgG抗体で示された。結合値はVFW 20 だけを含むウェル内の非固有結合によって補正し、F V I I I の残留結合によって示した。被覆しないウェルではF V I I I が結合しない場合も観察された。

【0081】

結論：

図5b

マンナンはVWFによるF V I I I の取り込みに干渉しない。

【実施例9】

【0082】

実施例9：脱マンノシル化されたF V I I I の取り込みの検査

第1の段階で、F V I I I -BDDを3つの異なったエンドグリコシダーゼ、つまりE 30 ndoF1、EndoF2、及びEndoF3 (Sigma社) を用いて培養した。未処理のF V I I I -BDDとEndoF1、EndoF2、及びEndoF3で処理したものをSDS-PAGEで分離して、ニトロセルロース膜状に移した。糖類は糖たんぱく質検出キット (Sigma社) を用い、HRPをネガティブ比較対象として用いて検出した。EndoF1はF V I I I -BDD上の糖残基を効果的に切断することができる唯一のエンドグリコシダーゼであった (図6参照)。

第2の段階で、F V I I I -BDDをEndoF1を用いて、製造者の指示に従って脱グリコシル化し、SDS-PAGEで分離して、ウェスタン・ブロッティングで顕在化した。 $37 \mu\text{g}$ のF V I I I -BDDを7.5% SDS-PAGEゲルを入れた各ウェルに 40 負荷し、ニトロセルロース膜上に移した。これらを、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のコンストラクCTL D (4-7) -Fcとアルカリ性ホスファターゼ (左) あるいはプロトゴールド (右) に結合させた抗ヒトIgGを用いて顕在化させた。EndoF1を用いた培養後のF V I I I -BDDの分子量の変動は、EndoF1の効果的な脱グルコシル化を裏付けている。EndoF1を用いたF V I I I -BDDの培養はコンストラクCTL D (4-7) -FcによるF V I I I の認識のロスをもたらし、このことはマンノシル化された残基がなくなったことを示している。

最後に、FITCでラベルした脱マンノシル化F V I I I -BDDの取り込みの阻害を測定した。FITCに結合し、EndoF1 ($0.143 \mu\text{M}$) で処理したF V I I I -BDDと処理しなかったF V I I I -BDDを、血清を含まないX-VIVO培地内で実施例1と同様に (4×10^5 細胞/ $10 \mu\text{l}$ ウェル) で、 37°C あるいは 4°C で培養 50

した。予め、それらの細胞を、適切な場合、マンノン（ 1 mg/ml ）を用いて、 30°C の温度で30分間予備培養した。2時間培養した後、それらの細胞を洗浄して、FACSで中間郷土（ mfi ）を測定した。FV III-BDDの取り込みは、未処理のFV IIIだけが存在している場合で計算された mfi を基準として示した（図8参照）。FV III-BDDの取り込みの障害は脱グリコシルしない場合、マンナンで当初 $45 \pm 7\%$ の割合で障害された。Endo F1で培養したあとは、障害率は $23.5 \pm 14.4\%$ であった。さらに、マンナンが存在するとその割合がさらに32%も低下し、このことはEndo F1で処理されたFV IIIがマンノース受容体に依存する状態で部分的に取り込まれることを示している。

このことは、

－Endo F1だけでFV III-BDDを処理した場合に、マンノシル化された残基を部分的に除去されるという事実、あるいは

－Endo F1がこれもマンノース受容体のリガンドデアルN-アセチルグリコサミン残基を残すという事実によって、説明することができる。

【実施例10】

【0083】

実施例10：マンノース受容体によるFV IIIの認識に関するVWFの影響の調査

ELISAプレートをFV III-BDD（ $5.56\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.033\text{ }\mu\text{M}$ ）で被覆した。VWF（ $0-1\text{ }\mu\text{M}$ ）を $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ のコンストラクトCTLD（4-7）-Fcを用いて室温で30分培養し、不動体化したFV III-BDDに加えた。FV III-BDDに対するコンストラクトの結合はHRPに結合させたマウス抗ヒトFc抗体と基質OPDを用いて顕在化させた（図9参照）。

可溶性VWFを加えると、CTLD（4-7）の不動体化されたFV IIIとの相互作用をある程度阻止し（VWF：FV III比が過剰の場合、43%）し、従って、VWFがマンノース受容体によるFV III上の糖残基の認識に部分的にしか影響を及ぼさないことを示している。

【0084】

[文献リスト]

1. Banchereau, J. 及び R. M. Steinman, 1998、樹状細胞と免疫の制御、Nature 392:245
2. Tronbetta, E. S., 及び I. Mellman, 2005、イン・ビトロ及びイン・ビボでの抗原処理の細胞生物学
3. Sallusto, F., M. Cellia 及び A. Lanzavecchia, 1995、樹状細胞は大型組織適合性複合体クラスIIコンパートメントに巨大分子を濃縮するためにマクロピノサイトーシスとマンノース受容体を利用する：サイトカイン及びバクテリア生成物による下方制御、J. Exp Med 182:389
4. Geitenbeek, T. B. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk 及び V. G. Figdor, 2000、一次免疫応答を促進する新しい樹状細胞固有ICAM-3受容体、Cell 100:575
5. Keler, T., Ramakrishna 及び M. W. Fanger, 2004、マンノース受容体指向性ワクチン、Expert Opin Biol Ther 4:1953
6. Lenting P. J., Neels J. G., van den Berg B. M., Clijsters P. P., Neijerman D. W., Pannekoek H., van Mourik J. A., Mertens K., van Zonneveld A. J., 1999、ファクターVIIIのL鎖は低密度リポタンパク質受容体関連蛋白質、J. Biol Chem. 274-23734
7. Sanberg H., Almstedt A., Brandt J., Gray E., Holmguist L., Oswaldsson U., Mikaelsson

10

20

30

40

50

n M. , B領域決失遺伝子組み換えファクターV I I I 蛋白質、r-V I I I S Q, 2001, Thromb Hoemost. 85:93
 8. Kaufman R. J. , Wasley L. C. , Dörner A. J. , 哺乳動物細胞で発現される組み換えヒトインシV I I I の合成、処理、及び分泌、1988, J Biol Chem 263:6352
 9. Hironaka T. , Furukawa K. , Esmon P. C. , Fournel M. A. , Sawada S. , Kato M. , Minaga T. , Kobata A. , ヒトの血漿及び遺伝子組み換えベビー・ハムスターの腎臓細胞の培地から精製された因子V I I I の糖鎖の比較研究、1992, J Biol Chem. 267:8012

10

【産業上の利用可能性】

【0085】

本発明は、血友病（タイプAまたはB）の治療に適用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0086】

【図1】F V I I I およびD C 膜の受容体の表示図である。

【図2 a】F V I I I - B D D (- ○ -) およびF V I I I 全体 (- ● -) の取り込みの、37℃および4℃での各状態間の差分を測定したグラフである。

【図2 b】F V I I I およびF V I I I - B D D の取り込みを、4℃または37℃での時間の関数として測定したグラフである。

20

【図2 c】培地、E D T A、マンナンまたはガラクトースの存在下におけるF V I I I の相対的取り込み(%)を測定したグラフである。

【図2 d】マンナンの存在下またはマンナンが存在しない条件下におけるF V I I I、F V I I I - B D D、デキストランおよびI yの相対的取り込み(%)を測定したグラフである。

【図2 e】F V I I I およびF V I I I - B D D およびデキストランの取り込みの阻害率(%)を、マンナンの増加する濃度の関数として測定したグラフである。

【図2 f】R A Pまたはマンナンの存在下または不存在下におけるα2 Mの取り込みを測定したグラフである。

【図3 a】抗M R および抗D C - S I G N 抗体の存在下におけるF V I I I およびF V I I I - B D D の相対的取り込み(%)を測定したグラフである。

30

【図3 b】H D 4 2 0 細胞によるF V I I I の取り込み(%)をF V I I I の濃度(μ M)の関数として測定したグラフである。

【図3 c】構築物C T L D 1 - 3 およびC T L D 4 - 7 への結合の強度を、F V I I I、F V I I I - B D D およびマンナンの濃度(μ g / m l)の関数として測定したグラフである。

【図3 d】F V I I I およびF V I I I - B D D の構築物C T L D 1 - 3 およびC T L D 4 - 7 への結合の阻害率(%)を、マンナンの濃度(μ g / m l)の関数として測定したグラフである。

【図4 a】C D 4 + T 細胞の増殖(c p m)を、C D 4 + T : D C の比率の関数として測定したグラフである。

40

【図4 b】I F N - γ の産生を測定することによって、ヒト型抗F V I I I T C D 4 + クローンD 9 E 9 の活性を測定したグラフである。

【図5 a】F V I I I のプロ凝固活性の阻害率(%)を測定したグラフである。

【図5 b】マンナンによるF V I I I のV W F への結合の阻害率(%)を測定したグラフである。

【図6】F V I I I 上の糖をウェスタン・ブロット法によって検出した結果を示した図である。

【図7】ウェスタン・ブロット法により、F V I I I をC T L D 4 - 7 - F c によって検出した結果を示す図である。

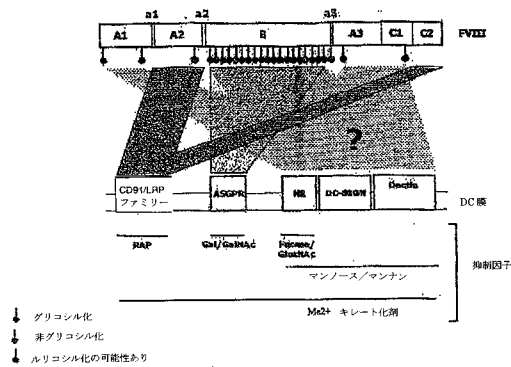
50

【図8】Endo-F1での処理後または処理なしの場合のFVIIの取り込みの阻害率(%)を測定したグラフである。

【図9】CTLD(4-7)-FcのFVII-BDDへの結合(OD 492nm)を、VWFの濃度の関数として測定したグラフである。

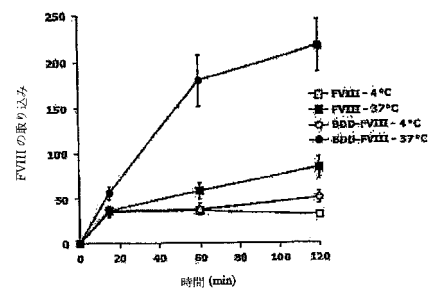
【図1】

Fig. 1



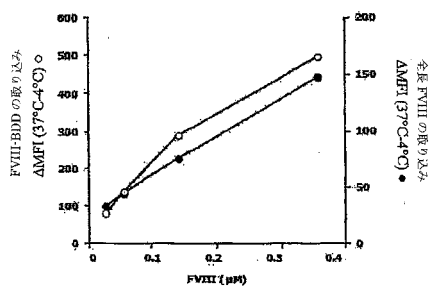
【図2b】

Fig. 2b



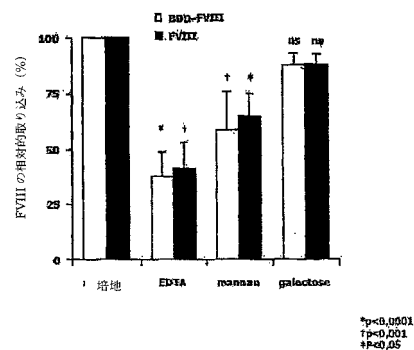
【図2a】

Fig. 2a



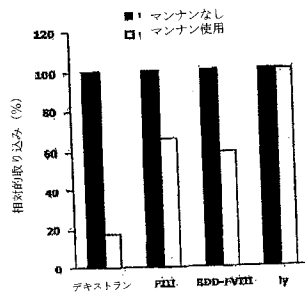
【図2c】

Fig. 2c



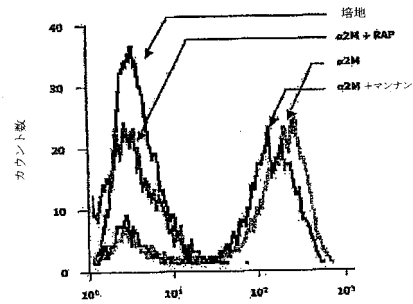
【図 2 d】

Fig. 2d



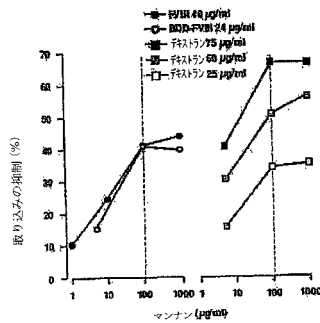
【図 2 f】

Fig. 2f



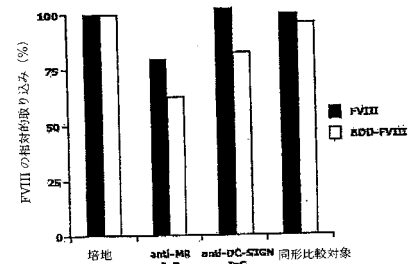
【図 2 e】

Fig. 2e



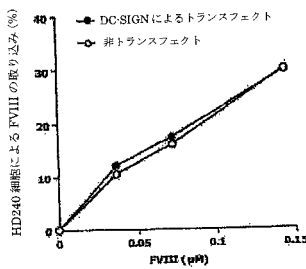
【図 3 a】

Fig. 3a



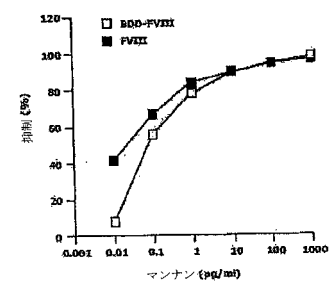
【図 3 b】

Fig. 3b



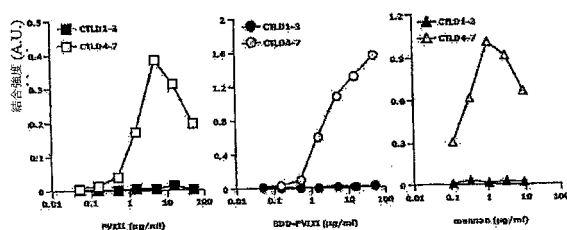
【図 3 d】

Fig. 3d



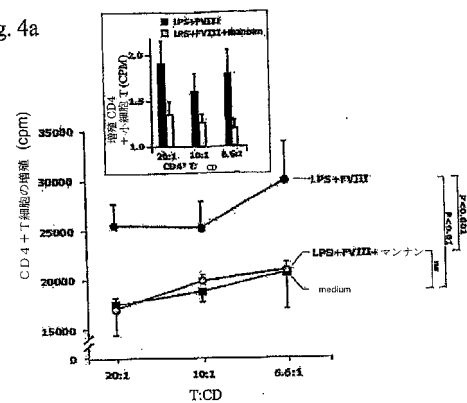
【図 3 c】

Fig. 3c



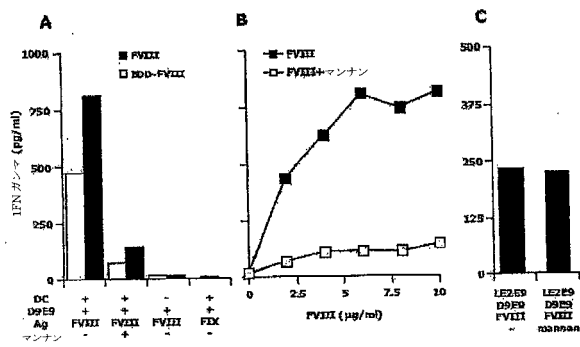
【図 4 a】

Fig. 4a



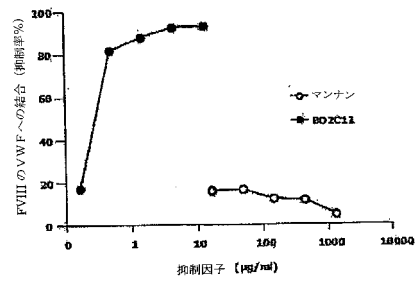
【図 4 b】

Fig. 4b



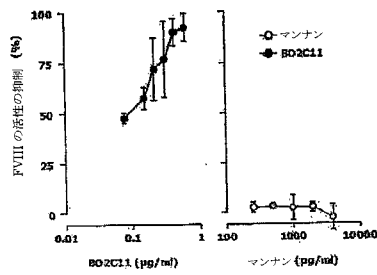
【図 5 b】

Fig. 5b



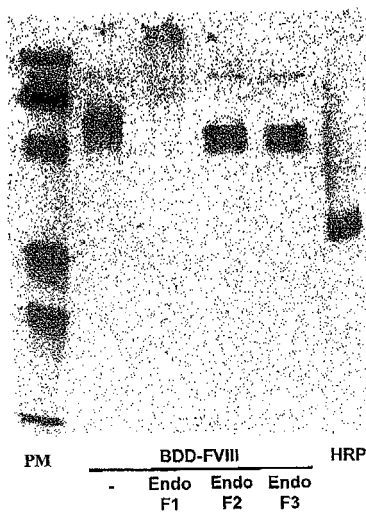
【図 5 a】

Fig. 5a



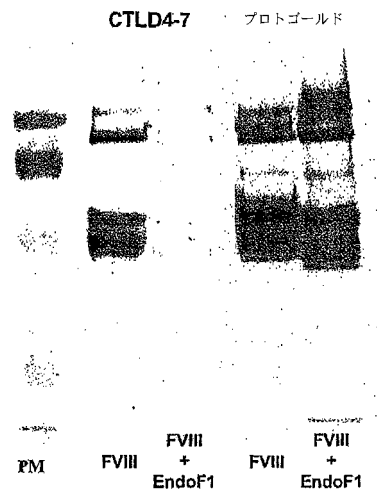
【図 6】

Fig. 6



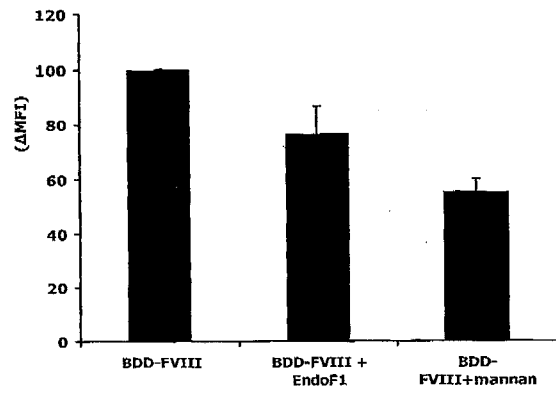
【図 7】

Fig. 7



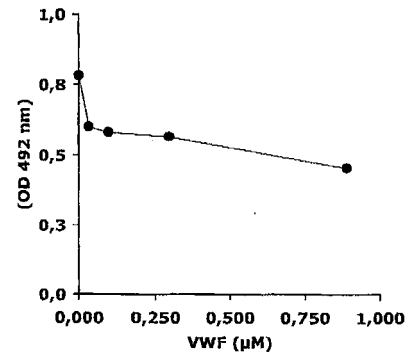
【図 8】

Fig. 8



【図 9】

Fig. 9



フロントページの続き

- (74)代理人 100080056
弁理士 西郷 義美
- (72)発明者 カベリ スリニ ブイ
フランス国 9 2 2 4 0 マラコフ ルー ガーバー 1 5
- (72)発明者 ラクロイクスーデスムゼス セバスチャン
フランス国 9 2 1 3 0 イッシ レ モウリネアウクス プロメナード ロビンソン 5
- (72)発明者 バイリー ジャガデーシュ
フランス国 9 2 1 3 0 イッシ レ モウリネアウクス プロメナード ロビンソン 5
- (72)発明者 ダスグプタ サーヤサラテ
アメリカ合衆国 0 2 1 1 5 マサチュウセッツ州, ボストン ロングウッド アベニュー 1 8
1, ハーバード メディカル スクール, プリングハム アンド ウイメンズ ホスピタル, 第6
フロアー, チャンニング ラボラトリー
- (72)発明者 チョトウロウ アブデスサタ
フランス国 7 8 9 9 0 エランコート アベニュー デ シャトゥ 2 0

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 米国特許第0 4 6 1 4 7 9 5 (US, A)
国際公開第0 0 / 0 6 3 2 5 1 (WO, A 1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07K 14/00-14/825
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
WPI