

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7680442号
(P7680442)

(45)発行日 令和7年5月20日(2025.5.20)

(24)登録日 令和7年5月12日(2025.5.12)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	14/435 (2006.01)	C 0 7 K	14/435
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z N A
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
請求項の数 15 (全41頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-526720(P2022-526720)	(73)特許権者	518315254
(86)(22)出願日	令和2年11月11日(2020.11.11)		ツェー・エス・エル・ペーリング・レン
(65)公表番号	特表2023-500953(P2023-500953 A)		グナウ・アクチエンゲゼルシャフト
(43)公表日	令和5年1月11日(2023.1.11)		スイス国2543ベルン・レングナウ・
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/081698	(74)代理人	100127926
(87)国際公開番号	WO2021/094344		弁理士 結田 純次
(87)国際公開日	令和3年5月20日(2021.5.20)	(74)代理人	100140132
審査請求日	令和5年11月9日(2023.11.9)		弁理士 竹林 則幸
(31)優先権主張番号	19208259.2	(72)発明者	マルコ・ホフマン
(32)優先日	令和1年11月11日(2019.11.11)		ドイツ連邦共和国35094ラーンター
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(72)発明者	アドリアーナ・バズ・モレリィ
			オーストラリア国ビクトリア州3053
			・カールトン・スワンストン・ストリー
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 第V I I I因子に対する寛容を誘導するためのポリペプチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) V W F 部分と (i i) 赤血球結合部分とを含むポリペプチドであって、前記ポリペプチドが血液凝固第V I I I因子 (F V I I I) に結合することができ、前記V W F部分がF V I I Iに結合することができ、前記V W F部分がV W FのD ' D 3ドメインを含む切断型V W Fであり、前記赤血球結合部分が抗体、抗体フラグメント、および単鎖抗原結合ドメイン (s c F v) からなる群から選択され、前記ポリペプチドがヘテロ二量体であり、前記ヘテロ二量体が第1のサブユニットおよび第2のサブユニットを含み、前記第1のサブユニットが第1の前記V W F部分および前記赤血球結合部分を含み、前記第2のサブユニットが第2の前記V W F部分を含み、前記第2のサブユニットが前記赤血球結合部分を含まない、前記ポリペプチド。

【請求項2】

前記V W F部分が、配列番号18に示すような野生型V W Fのアミノ酸配列と比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】

前記少なくとも1つのアミノ酸置換が、アミノ酸番号に関して、配列番号18の配列を参照して、S 7 6 4 G / S 7 6 6 Y、S 7 6 4 P / S 7 6 6 I、S 7 6 4 P / S 7 6 6 M、S 7 6 4 V / S 7 6 6 Y、S 7 6 4 E / S 7 6 6 Y、S 7 6 4 Y / S 7 6 6 Y、S 7 6 4 L / S 7 6 6 Y、S 7 6 4 P / S 7 6 6 W、S 7 6 6 W / S 8 0 6 A、S 7 6 6 Y / P 7 6 9 K、S 7 6 6 Y / P 7 6 9 N、S 7 6 6 Y / P 7 6 9 R、S 7 6 4 P / S 7 6 6 L

、および S 7 6 4 E / S 7 6 6 Y / V 1 0 8 3 A からなる組み合わせの群から選択される、請求項 2 記載のポリペプチド。

【請求項 4】

前記赤血球結合部分が、赤血球上の膜タンパク質に結合することができる、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと、場合により薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 6】

治療に使用するためのまたは薬剤として使用するための、請求項 5 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 7】

血液凝固障害の処置に使用するための、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記処置が F V I I I の投与を含む、請求項 7 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 9】

ポリペプチドおよび F V I I I が共投与される、請求項 8 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 10】

F V I I I の *in vivo* 半減期の増加に使用するための、請求項 5 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 11】

F V I I I による処置の過程におけるインヒビター形成の防止または減少に使用するための、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする核酸。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の核酸を含むプラスミドまたはベクター。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のプラスミドまたはベクターを含む、宿主細胞。

30

【請求項 15】

VWF と赤血球結合部分とを含むポリペプチドを製造する方法であって、(i) VWF と赤血球結合部分とを含むポリペプチドが発現するような条件下で請求項 14 の宿主細胞を培養することと、(ii) 場合により宿主細胞または培養液から VWF と赤血球結合部分とを含むポリペプチドを回収することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、第 V I I I 因子の抗体の形成を減少させるために有用なポリペプチドに関する。

40

【背景技術】

【0002】

血友病 A は、凝固第 V I I I 因子 (F V I I I) の血漿欠乏を特徴とする遺伝性出血性障害である。血友病 A 患者は、現在、F V I I I 補充療法で処置されている。30% の患者における主要な合併症は、F V I I I 活性を不活性化し、補充療法を無効化し得る同種抗体 (インヒビター) の発生である。検出可能なインヒビターを有する患者は、F V I I I バイパス療法 (F I I a 複合体濃縮製剤、r F V I I a、エミシズマブ) ならびに F V I I I (I T I) および / または免疫抑制剤の反復投与で処置される。このような処置はコストが高く、輸液が繰り返し必要であり、60% の成功率しかない。

【0003】

50

免疫寛容は新生児期に確立され、成人期の間は様々な生理学的機序によって維持されて自己組織に対して免疫反応が起きないようにしている。血友病男児においては、F V I I I は f 8 遺伝子座の様々な変異により発現しないか、または誤って発現されるため、F V I I I に対する寛容が十分に確立されておらず、そのため自己タンパク質として認識されない。成人期には、抗原特異的な B および／または T 細胞の排除または抑制により、免疫寛容が誘導および維持される。この過程に関与する主な機序は、免疫寛容の誘導に特化した細胞（肝臓または脾臓のマクロファージ）による抗原提示、内在性制御性 T 細胞（T r e g）の拡大、または抗原特異的 T r e g の誘導が含まれる。

【0004】

本発明者らは、インヒビターを有する患者において、F V I I I に対する寛容を積極的に誘導することができるように F V I I I を製剤化し、投与することを目指した。非特許文献 1 は、アポトシス赤血球を標的とした抗原が脾臓および肝臓で除去され、C D 4 および C D 8 T 細胞における抗原特異的な寛容原性応答を誘導することを実証した。グリコフォリン A は赤血球（R B C）の表面で多く発現され、R B C 表面に抗原（A g）をターゲティングするのに用いることができる。しかし、F V I I I および赤血球ターゲティング部分を含む融合タンパク質は、インヒビターの形成の低減において限定された効果しか有していないことがわかった。

【0005】

血友病 A の処置において、インヒビター形成を減少させることが引き続き必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【文献】K o n t o s S . ら，2012；P N A S；110（1）：E 60－E 68

【発明の概要】

【0007】

本願の発明者らは、驚くべきことに、フォンウィルブランド因子（V W F）の D ' D 3 ドメインおよび赤血球ターゲティング部分を含む融合タンパク質が、インヒビター形成を低減することを見出した。

【0008】

従って、本発明は、以下の項目 [1] ～ [60] に定義された主題に関する。

[1] (i) V W F 部分と (i i) 赤血球結合部分とを含むポリペプチドであって、上記ポリペプチドが血液凝固第 V I I I 因子（F V I I I）に結合することができる、ポリペプチド。

[2] 上記 V W F 部分が F V I I I に結合することができる、項目 [1] に記載のポリペプチド。

[3] 上記 V W F 部分が、V W F またはそのフラグメント、好ましくはヒト V W F またはそのフラグメントである、項目 [1] に記載のポリペプチド。

[4] 上記 V W F 部分が、V W F の D ' D 3 ドメインを含む、上記項目のいずれか 1 つに記載のポリペプチド。

[5] 上記 V W F 部分が、V W F のフラグメントを含むか、または実質的にそれらからなる、上記項目のいずれか 1 つに記載のポリペプチド。

[6] 上記 V W F 部分が、実質的に切断型 V W F からなる、上記項目のいずれか 1 つに記載のポリペプチド。

[7] V W F 部分が、配列番号 18 のアミノ酸 776 から 805 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；または配列番号 18 のアミノ酸 764 から 1242 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、上記項目のいずれか 1 つに記載のポリペプチド。

[8] V W F 部分が、配列番号 18 のアミノ酸 1243 から 2813 を欠いている、上記項目のいずれか 1 つに記載のポリペプチド。

[9] V W F 部分が、(a) 配列番号 18 のアミノ酸 764 から 1242、(b) 配列番

10

20

30

40

50

号18のアミノ酸764から1242に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または(c)(a)もしくは(b)のフラグメントからなる、上記項目のいずれか1つに記載のポリペプチド。

[10] 上記VWF部分が、配列番号18に示されるような野生型VWFのアミノ酸配列と比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、上記項目のいずれか1つに記載のポリペプチド。

[11] 上記少なくとも1つのアミノ酸置換が、上記少なくとも1つのアミノ酸置換を除いて同じ配列を有する対照ポリペプチドと比較して、ポリペプチドのFVIIIへの結合親和性を増加させる、項目[10]に記載のポリペプチド。

[12] 上記少なくとも1つのアミノ酸置換が、アミノ酸の番号付けに関して、配列番号18の配列を参照して、S764G/S766Y、S764P/S766I、S764P/S766M、S764V/S766Y、S764E/S766Y、S764Y/S766Y、S764L/S766Y、S764P/S766W、S766W/S806A、S766Y/P769K、S766Y/P769N、S766Y/P769R、S764P/S766L、およびS764E/S766Y/V1083Aからなる組み合わせの群から選択される、項目[10]または[11]に記載のポリペプチド。

[13] 上記少なくとも1つのアミノ酸置換が、組み合わせS764E/S766YまたはS764E/S766Y/V1083Aのいずれかである、項目[10]～[12]のいずれか1つに記載のポリペプチド。

[14] 上記ポリペプチドが、1μMまたはそれ以下の解離定数KDで上記FVIIIに結合する、上記項目のいずれか1つに記載のポリペプチド。

[15] 上記ポリペプチドが、1nMまたはそれ以下の解離定数KDで上記FVIIIに結合する、上記項目のいずれか1つに記載のポリペプチド。

[16] 上記ポリペプチドが、0.1nMまたはそれ以下の解離定数KDで上記FVIIに結合する、上記項目のいずれか1つに記載のポリペプチド。

[17] 上記ポリペプチドが、半減期延長部分(HLEM)を含む、上記項目のいずれか1つに記載のポリペプチド。

[18] HLEMが、VWF部分に融合された異種アミノ酸配列である、項目[17]に記載のポリペプチド。

[19] 上記異種アミノ酸配列が、トランスフェリンおよびそのフラグメント、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのC末端ペプチド、XTEN配列、ホモアミノ酸リピート(HAP)、プロリン-アラニン-セリンリピート(PAS)、アルブミン、アフアミン(afamin)アルファ-フェトプロテイン、ビタミンD結合タンパク質、アルブミンまたは免疫グロブリン定常領域に生理的条件下で結合することができるポリペプチド、新生児Fc受容体(FcRn)、特に免疫グロブリン定常領域およびその部分、好ましくは免疫グロブリンのFc部分に結合することができるポリペプチド、ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択されるタンパク質またはペプチドを含むか、またはそれからなる項目[18]に記載のポリペプチド。

[20] HLEMが、VWF部分を含むポリペプチドにコンジュゲートされている、項目[17]に記載のポリペプチド。

[21] HLEMが、VWF部分を含むポリペプチドのC末端にコンジュゲートされている、項目[20]に記載のポリペプチド。

[22] 上記HLEMが、ヒドロキシエチルスターチ(HES)、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリシアル酸(PSA)、エラスチン様ポリペプチド、ヘパロサンポリマー、ヒアルロン酸および非タンパク質性アルブミン結合リガンド、例えば脂肪酸鎖、ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される、項目[20]または[21]に記載のポリペプチド。

[23] HLEMが、VWF部分を含むポリペプチドに非共有結合している、項目[17]に記載のポリペプチド。

[24] ポリペプチドが、ポリペプチドにコンジュゲートされたHLEMをなんら含まな

10

20

30

40

50

い、項目〔1〕～〔20〕のいずれか1項に記載のポリペプチド。

〔25〕上記ポリペプチドが、N-グリカンを含む糖タンパク質であり、上記N-グリカンの好ましくは少なくとも75%、好ましくは少なくとも85%が、平均して、少なくとも1つのシアル酸部分を含む、上記項目のいずれか1つに記載のポリペプチド。

〔26〕上記ポリペプチドが、二量体として存在するか、または少なくとも高比率の二量体を有する、上記項目のいずれか1つに記載のポリペプチド。

〔27〕上記ポリペプチドの少なくとも50%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%が、二量体として存在する、項目〔26〕に記載のポリペプチド。

〔28〕二量体を形成する2つの単量体が、VWF部分内のシステイン残基によって形成される少なくとも1つまたはそれ以上のジスルフィド架橋を介して互いに共有結合している、項目〔26〕または〔27〕に記載のポリペプチド。

〔29〕1つまたはそれ以上のジスルフィド架橋を形成するシステイン残基が、Cys-1099、Cys-1142、Cys-1222、Cys-1225、Cys-1227およびそれらの組み合わせ、好ましくはCys-1099およびCys-1142からなる群から選択され、アミノ酸の番号付けは配列番号18を指す、項目〔28〕に記載のポリペプチド。

〔30〕上記二量体のFVIIIIに対する親和性が、単量体ポリペプチドのFVIIIIに対する親和性よりも大きく、上記単量体ポリペプチドが、二量体ポリペプチドの単量体サブユニットと同じアミノ酸配列を有する、項目〔26〕～〔29〕のいずれか1つに記載のポリペプチド。

〔31〕ポリペプチドの二量体：単量体の比率が、少なくとも1.5、好ましくは少なくとも2、より好ましくは少なくとも2.5、または少なくとも3、または少なくとも4、または少なくとも5、または少なくとも10、または少なくとも20であり；またはポリペプチドがポリペプチドの単量体および／または多量体の形態を含まないか；またはポリペプチドがポリペプチドの単量体および／または多量体を本質的に含まない、項目〔26〕～〔30〕のいずれか1つに記載のポリペプチド。

〔32〕二量体ポリペプチドが、1 μ M未満、好ましくは1 nM未満、より好ましくは500 pM未満、200 pM未満、100 pM未満、90 pM未満または80 pM未満の解離定数 K_D を特徴とするFVIIII結合親和性を有する、項目〔26〕～〔31〕のいずれか1つに記載のポリペプチド。

〔33〕 K_D が、0.1 pM～500 pM、0.5 pM～200 pM、0.75 pM～100 pM、または最も好ましくは1 pM～80 pMの範囲である、項目〔32〕に記載のポリペプチド。

〔34〕ポリペプチドがヘテロ二量体である、項目〔26〕～〔33〕のいずれか1つの項目に記載のポリペプチド。

〔35〕ヘテロ二量体が第1のサブユニットおよび第2のサブユニットを含み、第1のサブユニットが、上記項目のいずれか1つに定義された第1のVWF部分および赤血球結合部分を含み、第2のサブユニットが、上記項目のいずれか1つに定義された第2のVWF部分を含む、項目〔34〕に記載のポリペプチド。

〔36〕上記第1のVWF部分および上記第2のVWF部分が同一である、項目〔35〕に記載のポリペプチド。

〔37〕上記第2のサブユニットが赤血球結合部分を含まない、項目〔35〕または〔36〕に記載のポリペプチド。

〔38〕上記第2のサブユニットが、実質的に第2のVWF部分からなる、項目〔35〕～〔37〕のいずれか1つに記載のポリペプチド。

〔39〕上記赤血球結合部分が、ヒト赤血球に結合することができる、上記項目のいずれか1つに記載のポリペプチド。

〔40〕、上記赤血球結合部分が、赤血球上の膜タンパク質、好ましくはヒト赤血球上のヒト膜タンパク質に結合することができる、上記項目のいずれか1つに記載のポリペプチ

10

20

30

40

50

ド。

〔４１〕上記赤血球結合部分が、ペプチドリガンド、抗体、抗体フラグメント、および単鎖抗原結合ドメイン（s c F v）からなる群から選択される、上記項目のいずれか１つに記載のポリペプチド。

〔４２〕上記赤血球結合部分が、バンド３（C D 2 3 3）、アクアポリンー１、G l u t－１、キッド抗原、R h A g / R h 5 0（C D 2 4 1）、R h（C D 2 4 0）、R h 3 0 C E（C D 2 4 0 C E）、R h 3 0 D（C D 2 4 0 D）、K x、グリコフォリン A（C D 2 3 5 a）、グリコフォリン B（C D 2 3 5 b）、グリコフォリン C（C D 2 3 5 c）、グリコフォリン D（C D 2 3 5 d）、K e i l（C D 2 3 8）、D u f f y / D A R C i（C D 2 3 4）、C R 1（C D 3 5）、D A F（C D 5 5）、グロボシド（G l o b o s i d e）、C D 4 4、I C A M－４（C D 2 4 2）、L u / B－C A M（C D 2 3 9）、X G 1 / X G 2（C D 9 9）、E M M P R I N / ニューロセリン（C D 1 4 7）、J M H、グルコシルトランスフェラーゼ、カートライト（C a r t w r i g h t）、ドンブロック（D o m b r o c k）、C 4 A / C A B、S c i m m a、M E R 2、ストマチン、B A－I（C D 2 4）、G P I V（C D 3 6）、C D 1 0 8、C D 1 3 9 および H 抗原（H a n t i g e n）（C D 1 7 3）からなる群から選択される生体分子に特異的に結合することができる、上記項目のいずれか１つに記載のポリペプチド。

〔４３〕上記項目のいずれか１つに記載のポリペプチドと、場合により薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤とを含む、医薬組成物。

〔４４〕組成物中のポリペプチドの二量体：単量体の比率が、少なくとも１．５、好ましくは少なくとも２、より好ましくは少なくとも２．５または少なくとも３、または少なくとも４、または少なくとも５、または少なくとも１０、または少なくとも２０であるか；または組成物がポリペプチドの単量体および／または多量体の形態を含まないか；または組成物がポリペプチドの単量体および／または多量体の形態を本質的に含まない、項目〔４３〕の医薬組成物。

〔４５〕治療における使用のための、項目〔１〕～〔４２〕のいずれか１つに記載のポリペプチド、または項目〔４３〕もしくは〔４４〕に記載の医薬組成物。

〔４６〕医薬品として使用するための、項目〔１〕～〔４２〕のいずれか１つに記載のポリペプチド、または項目〔４３〕もしくは〔４４〕に記載の医薬組成物。

〔４７〕血液凝固障害の処置に使用するための、項目〔１〕～〔４２〕のいずれか１つに記載のポリペプチド、または項目〔４３〕もしくは〔４４〕に記載の医薬組成物。

〔４８〕上記血液凝固障害が血友病 A である、項目〔４７〕に記載の使用のためのポリペプチド、または項目〔４７〕に記載の使用のための医薬組成物。

〔４９〕上記処置が、対象に F V I I I を投与することを含む、項目〔４７〕もしくは〔４８〕に記載の使用のためのポリペプチド、または項目〔４７〕もしくは〔４８〕に記載の使用のための医薬組成物。

〔５０〕ポリペプチドおよび F V I I I が共投与される（c o－a d m i n i s t e r e d）、項目〔４９〕に記載の使用のためのポリペプチド、または項目〔４９〕に記載の使用のための医薬組成物。

〔５１〕上記共投与（c o－a d m i n i s t r a t i o n）が、（i）ポリペプチドおよび F V I I I を含む単一組成物において一緒に投与することによって、または（i i）それぞれ別々の組成物に提供されたポリペプチドおよび F V I I I の投与により、ポリペプチドが F V I I I の前、後またはそれと同時に投与されることによって達成される、項目〔５０〕に記載の使用のためのポリペプチド、または項目〔５０〕に記載の使用のための医薬組成物。

〔５２〕F V I I I に対するポリペプチドの比率が少なくとも１、または少なくとも２、または少なくとも４、または少なくとも１０、または少なくとも２０、または少なくとも５０、または少なくとも１００である、項目〔４９〕～〔５１〕のいずれか１項に記載の使用のためのポリペプチド、または項目〔４９〕～〔５１〕のいずれか１項に記載の使用のための医薬組成物。

10

20

30

40

50

〔53〕インヒビター形成の防止または低減に使用するための、項目〔1〕～〔42〕のいずれか1つに記載のポリペプチド、または項目〔43〕もしくは〔44〕に記載の医薬組成物。

〔54〕上記のインヒビター形成の防止または低減が、(i) 上記ポリペプチドまたは上記医薬組成物および(ii) FVⅡⅡⅡを対象に投与することを含む、項目〔53〕に記載の使用のためのポリペプチド、または項目〔53〕に記載の使用のための医薬組成物。

〔55〕項目〔1〕～〔42〕のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードする核酸。

〔56〕項目〔55〕に記載の核酸を含む、プラスミドまたはベクター。

〔57〕項目〔56〕に記載のプラスミドまたはベクターを含む宿主細胞。

〔58〕VWFおよび赤血球結合部分を含むポリペプチドを製造する方法であって、(i) VWFおよび赤血球結合部分を含むポリペプチドが発現するような条件下で項目〔57〕の宿主細胞を培養することと、(ii) 場合により、宿主細胞または培養液からVWFおよび赤血球結合部分を含むポリペプチドを回収することを含む、方法。

〔59〕FVⅡⅡⅡに対する寛容を誘導する方法であって、それを必要とする対象に、項目〔1〕～〔42〕のいずれか1つに記載のポリペプチドの有効量を投与することを含む、方法。

〔60〕FVⅡⅡⅡに対する寛容の誘導に使用するための、項目〔1〕～〔42〕のいずれか1つに記載のポリペプチド、または項目〔43〕もしくは〔44〕に記載の医薬組成物。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】D' D3-TER119scFv二量体のスキーム。VWF-D' D3 FVⅡⅡⅡ結合ドメインは、C末端でヒトアルブミン(HSA)およびTER119scFvと融合している。D' D3はD1D2、VWFプロペプチド(図示せず)と並んで発現される。D1D2は、同じ発現細胞株中のPACE/フューリンの共発現により切断される。C1099およびC1142での2つの鎖間ジスルフィドを介して二量体が形成される(点線により例示した)。

【図2】発現中の二量体および単量体の形成。(F) CSL626から誘導され精製されたD' D3-FP二量体および単量体の混合物、(T) CHO培養上清中のD' D3-TER119ホモ二量体、(M) マーカーのウェスタンブロット。トリスグリシン(Tris Glycin) 8-16%。検出: 抗ヒト血清アルブミン抗体(AP標識化)。

【図3】D' D3-TER119scFvのin vitroでのマウスRBCへの結合。フローサイトメトリー。マウスRBC(1:100全血)を抗TER119-PE MA bで染色し、単一細胞分析(SSC/FSC)のためにゲートを規定した。次に、マウスRBCを、(A) PBS+1%BSA、(B) D' D3-TER119二量体、50μg/ml、(C) D' D3-TER119単量体、50μg/ml、(D) D' D3-TER119単量体、50μg/ml、および抗ヒトアルブミンMA b、20μg/ml、(E) PBS+1%BSAおよび(F) 抗ter119-PE mAb、0.2μg/mlと共にインキュベートした。

【図4】二重特異性D' D3-TER119ヘテロ二量体のスキーム。第一のVWF-D' D3 FVⅡⅡⅡ結合ドメインは、C末端でヒトアルブミン(HSA)およびTER119scFvと融合している。第2のD' D3はC末端でタグ付けされている。D' D3は、D1D2、VWFプロペプチド(図示せず)と並んで発現される。D1D2は同じ発現細胞株中のPACE/フューリンの共発現により切断される。C1099およびC1142の2つの鎖間ジスルフィド結合により2量体が形成される(点線により例示した)。

【図5】D' D3-TER119scFvヘテロ二量体の発現。ヘテロ二量体は、(A) 安定的にトランスフェクトされた細胞株(配列番号3および配列番号5)におけるD' D3-TER119scFvおよびD' D3の共発現により生成した。(B) サブユニット(配列番号7および配列番号9)の両方に対して、D' D3の高親和性バリエーション、D' D3(EYA)を用いて同じ発現戦略を適用した。Capture Select™ Human

10

20

30

40

50

Albumin、Ni Sepharose、Superdex-200ステップでのタンパク質のSDS-PAGE (Commassie, トリスグリシン)。M: See Blueマーカー, TH: D'D3-TER119ヘテロ二量体。F: 対照D'D3-FP、単量体および二量体。

【図6】in vitroでのD'D3-TER119ヘテロ二量体を介したマウスRBCへのrVIIII-SingleChain結合。(A) D'D3-TER119構築物を滴定し、12.5 IU/mlヒトrVIIII-SingleChainと共にインキュベーションした。ヒトVWF (12.5 IU/ml) を、所定の場所で添加した。洗浄したマウスRBC (1:100全血) を、37℃でタンパク質混合物に添加した。フローサイトメトリー。SSC/FSCおよびTER119-PE MAbによりゲーティングされたRBC。検出: ポリクローナルマウス抗ヒトFVIIII-FITC、20 µg/ml。D'D3WT-TER119: n=1; D'D3EYA-TER119: n=3 (独立した実験、2バッチ)。(B) バッチ#2を用いたD'D3EYA-TER119±VWFのKMを計算するためのミカエリスメンテン動態の例示的な適合。

10

【図7】in vivo試験計画のスキーム。FVIIII koマウスの予防処置。FVIIII KOマウス (n=10)、毎週、5回静脈内注射。処置群: rVIIII-SingleChain (2000 IU/kg; 160 µg/kg) をD'D3EYA-TER119ヘテロ二量体 (840 µg/kg、バッチ#1またはバッチ#2) と共投与した。

【図8】FVIIII koマウスの予防処置。rVIIII-SingleChainをD'D3EYA-TER119と共にまたはなしで投与した後のFVIIII koマウスの抗FVIIII-抗体生成およびその抑制効果の結果。対照FVIIII koマウスはrVIIII-SingleChainのみで処置した。試験群は、rVIIII-SingleChainをD'D3EYA-TER119と共投与して処置した。(A) FVIIII koマウスにおいて、rVIIII-SingleChainをD'D3EYA-TER119と共にまたはなしで投与した (バッチ1またはバッチ2) 後の抗FVIIII-抗体生成 (ELISA ODの減衰 (extinction) の和) および (B) その抑制効果 (ベセスダ単位)。(C) FVIIII koマウスにおいて、rVIIII-SingleChainをD'D3EYA-TER119と共にまたはなしで投与した後の抗FVIIII-抗体生成およびその抑制効果の比較。

20

【図9】FVIIII koマウスにおける長期寛容を調査するための治療戦略の模式表示。処置: (a) 1700 IU/kgのrVIIII-SingleChainおよび (b) D'D3EYA-TER119ヘテロ二量体、672 µg/kgとの共投与。4回の注射、i.v. 毎週。28日目に中間出血。49日目および56日目に120 IU/kgで再チャレンジ。63日目に終末出血および試験終了予定。

30

【図10】rFVIIIIと組み合わせたD'D3EYA-TER119処置の効果を示すグラフ表示。中間 (28日目) および終末 (63日目) 出血時の対照 (rVIIII-SingleChain単独) および処置群 (rVIIII-SingleChain+D'D3-TER119): 1700 IU/kg rVIIII-SingleChain単独およびD'D3EYA-TER119ヘテロ二量体、672 µg/kgと共投与。抗FVIIII抗体は、(A) FVIIII ADA ELISAにより測定した。各滴定に適合した1/200希釈時のODに対応するOD₂₀₀ (標準) に対するOD₂₀₀ (サンプル) 予測比に基づいて解釈を行った。統計解析には、Kruskal-Wallis検定とDunnの多重比較検定を使用した; *p<0.05, ***p=0.0005, ns=有意ではない。

40

【図11-1】FVIIII koマウスにおける血漿 (A) およびペレット (B) のFVIIIIレベル。血漿または全血から遠心分離して再懸濁させたペレットで測定したFVIIII発色活性。マウスの3つの群に、200 IU/kgのrVIIII-SingleChainを単独で、またはFVIIIIとその結合パートナーD'D3との等しいモル比1~4でD'D3EYA-FP (100 µg/kg、CSL629) またはD'D3EYA-TER119ヘテロ二量体 (84 µg/kg) と共投与し、投与後5分、3、8、16、24、48、72および96時間でサンプルを採取した。N=3。データは、平均値およびモデ

50

ル化された曲線として与えられる。

【図 11-2】図 11-1 の続き。

【0010】

詳細な説明

本発明は、(i) VWF 部分と (ii) 赤血球結合部分とを含むポリペプチドであって、上記ポリペプチドは血液凝固第 V 因子 (FV) に結合することができる、ポリペプチドに関する。

【0011】

VWF 部分

本明細書で使用される用語「フォンウィルブランド因子」(VWF) は、自然発生の (天然) VWF だけでなく、そのバリエーション、例えば 1 つまたはそれ以上の残基が挿入、削除、または置換されている配列バリエーションも含む。

【0012】

一実施形態では、VWF は、配列番号 18 に示されるアミノ酸配列によって表されるヒト VWF である。配列番号 18 をコードする cDNA は、配列番号 17 に示される。

【0013】

ヒト天然 VWF をコードする遺伝子は、9 kb の mRNA に転写され、これは、推定分子量 310,000 Da の 2813 個のアミノ酸のプレプロポリペプチド (pre-pro polypeptide) に翻訳される。プレプロポリペプチドは、N 末端の 22 個のアミノ酸のシグナルペプチド、それに続く 741 個のアミノ酸のプロポリペプチド (配列番号 18 のアミノ酸 23-763)、および成熟サブユニット (配列番号 18 のアミノ酸 764-2813) を含む。N 末端から 741 個のアミノ酸のプロポリペプチドが切断されると、2050 個のアミノ酸からなる成熟 VWF が得られる。ヒト天然 VWF プレプロポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 18 に示されている。特に明記しない限り、本願における VWF 残基のアミノ酸番号付けは、VWF 分子、特に切断型 VWF が配列番号 18 の全ての残基を含んでいなくても、配列番号 18 を参照する。

【0014】

天然 VWF のプロポリペプチドは、複数のドメインを含む。異なるドメインアノテーションは、文献 (例えば、Zhou ら (2012) Blood 120 (2): 449-458) に見出すことができる。本願では、VWF 天然プレプロポリペプチドの以下：

D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-C7

のドメインアノテーションを適用する。

【0015】

配列番号 18 を参照すると、D' ドメインは、アミノ酸 764~865 からなり；そして D3 ドメインは、アミノ酸 866~1242 からなる。

【0016】

本明細書で使用される用語「VWF 部分」は、配列番号 18 に示されるヒト VWF とアミノ酸配列類似性を有するペプチドもしくはポリペプチド、またはそのフラグメントを指す。配列類似性は、配列同一性が少なくとも 50%、または少なくとも 60%、または少なくとも 70%、または少なくとも 80%、または少なくとも 90%、または少なくとも 95%、または少なくとも 99% となるようなものであることが好ましい。

【0017】

一実施形態では、VWF 部分は、切断型 VWF を含むか、または実質的にそれからなる。本発明の用語における特徴「切断型」は、ポリペプチドが成熟 VWF の全アミノ酸配列 (例えば、配列番号 18 のアミノ酸 764~2813) を含んでいないことを意味する。この実施形態によれば、VWF 部分は、配列番号 18 の全アミノ酸 764~2813 を含んでいるわけではなく、典型的にはそのフラグメントのみを含む。切断型 VWF は、VWF フラグメント、または複数形でも VWF フラグメントと呼ばれる。

【0018】

10

20

30

40

50

典型的には、VWF部分は、第VII因子と結合することができる。好ましくは、VWF部分は、ヒト天然第VII因子の成熟形態に結合することができる。別の実施形態では、VWF部分は、組換えFVII、例えば、Bドメイン欠失または単鎖FVIIに結合することができる。VWF部分のFVIIへの結合は、WO2010/087271A1の実施例2に記載されるような結合アッセイによって決定することができる。

【0019】

本発明のポリペプチドは、FVIIに結合することができる。好ましくは、本発明のポリペプチドは、ヒト天然第VII因子の成熟形態に結合することができる。別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、Bドメイン欠失または単鎖FVIIなどの組換えFVIIに結合することができる。本発明のポリペプチドのFVIIへの結合は、WO2010/087271A1の実施例2に記載されるような結合アッセイによって決定することができる。

【0020】

本発明のVWF部分は、好ましくは、配列番号18のアミノ酸776～805に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、FVIIに結合することができる。好ましい実施形態では、VWF部分は、配列番号18のアミノ酸776～805に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、FVIIに結合することができる。一実施形態では、VWF部分は、配列番号18のアミノ酸776～805を含むか、またはそれらからなる。本明細書において特に明記しない限り、配列同一性は、参照配列（例えば、配列番号18のアミノ酸776～805）の全長にわたって決定される。

【0021】

本発明のVWF部分は、好ましくは、配列番号18のアミノ酸766～864に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、FVIIと結合することができる。好ましい実施形態では、VWF部分は、配列番号18のアミノ酸766～864に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、FVIIに結合することができる。一実施形態では、VWF部分は、配列番号18のアミノ酸766～864を含むか、またはそれらからなる。

【0022】

別の好ましい実施形態では、VWF部分は、(a) 配列番号18のアミノ酸764～1242に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または(b) VWF部分が依然としてFVIIと結合することができるならば、そのフラグメントからなる。より好ましくは、VWF部分は、(a) 配列番号18のアミノ酸764～1242に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または(b) VWF部分が依然としてFVIIに結合することができるならば、そのフラグメントからなる。一実施形態では、VWF部分は、(a) 配列番号18のアミノ酸764～1242、または(b) VWF部分が依然としてFVIIに結合することができるならば、そのフラグメントからなる。

【0023】

以下に、より詳細に説明するように、本発明のポリペプチドは、VWF部分を含むポリペプチドをコードする核酸を含む細胞を使用する方法によって調製することができる。核酸は、それ自体知られている技術により、適切な宿主細胞に導入される。

【0024】

好ましい実施形態では、宿主細胞中の核酸は、(a) 配列番号18のアミノ酸1～1242に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または(b) VWF部分が依然としてFVIIに結合できるならば、そのフラグメントをコードする。より好ましくは、核酸は、(a) 配列番号18のアミノ酸1～1242に対して少なくとも9

10

20

30

40

50

5%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または(b) VWF部分が依然としてFVIEEEに結合することができるならば、そのフラグメントをコードする。一実施形態では、核酸は、(a) 配列番号18のアミノ酸1~1242、または(b) VWF部分が依然としてFVIEEEに結合することができるならば、そのフラグメントをコードする。特に、本発明によるポリペプチドが二量体である場合、核酸は、ポリペプチド中のVWF部分がVWF(例えば配列番号18)のアミノ酸1~763を含んでいなくても、VWFのアミノ酸1~763をコードする配列も含むことになる。

【0025】

好ましい実施形態による本発明のポリペプチドのVWF部分は、配列番号18のVWFのアミノ酸配列1~763を含まなくてもよい。

【0026】

さらなる好ましい実施形態によれば、VWF部分は、それぞれ配列番号18を参照して、以下のアミノ酸配列のうちの1つを含むか、またはそれからなる：

776-805；766-805；764-805；776-810；766-810；
 764-810；776-815；766-815；764-815；
 776-820；766-820；764-820；776-825；766-825；
 764-825；776-830；766-830；764-830；
 776-835；766-835；764-835；776-840；766-840；
 764-840；776-845；766-845；764-845；
 776-850；766-850；764-850；776-855；766-855；
 764-855；776-860；766-860；764-860；
 776-864；766-864；764-864；776-865；766-865；
 764-865；776-870；766-870；764-870；
 776-875；766-875；764-875；776-880；766-880；
 764-880；776-885；766-885；764-885；
 776-890；766-890；764-890；776-895；766-895；
 764-895；776-900；766-900；764-900；
 776-905；766-905；764-905；776-910；766-910；
 764-910；776-915；766-915；764-915；
 776-920；766-920；764-920；776-925；766-925；
 764-925；776-930；766-930；764-930；
 776-935；766-935；764-935；776-940；766-940；
 764-940；776-945；766-945；764-945；
 776-950；766-950；764-950；776-955；766-955；
 764-955；776-960；766-960；764-960；
 776-965；766-965；764-965；776-970；766-970；
 764-970；776-975；766-975；764-975；
 776-980；766-980；764-980；776-985；766-985；
 764-985；776-990；766-990；764-990；
 776-995；766-995；764-995；776-1000；766-1000；
 0；764-1000；776-1005；766-1005；764-1005；
 776-1010；766-1010；764-1010；776-1015；766-1015；
 764-1015；776-1020；766-1020；764-1020；
 776-1025；766-1025；764-1025；776-1030；766-1030；
 764-1030；776-1035；766-1035；764-1035；
 776-1040；766-1040；764-1040；776-1045；766-1045；
 764-1045；776-1050；766-1050；764-1050；
 776-1055；766-1055；764-1055；776-1060；766-1060；
 764-1060；776-1065；766-1065；764-1065；

10

20

30

40

50

776-1070; 766-1070; 764-1070; 776-1075; 766-1075; 764-1075; 776-1080; 766-1080; 764-1080; 776-1085; 766-1085; 764-1085; 776-1090; 766-1090; 764-1090; 776-1095; 766-1095; 764-1095; 776-1100; 766-1100; 764-1100; 776-1105; 766-1105; 764-1105; 776-1110; 766-1110; 764-1110; 776-1115; 766-1115; 764-1115; 776-1120; 766-1120; 764-1120; 776-1125; 766-1125; 764-1125; 776-1130; 766-1130; 764-1130; 776-1135; 766-1135; 764-1135; 776-1140; 766-1140; 764-1140; 776-1145; 766-1145; 764-1145; 776-1150; 766-1150; 764-1150; 776-1155; 766-1155; 764-1155; 776-1160; 766-1160; 764-1160; 776-1165; 766-1165; 764-1165; 776-1170; 766-1170; 764-1170; 776-1175; 766-1175; 764-1175; 776-1180; 766-1180; 764-1180; 776-1185; 766-1185; 764-1185; 776-1190; 766-1190; 764-1190; 776-1195; 766-1195; 764-1195; 776-1200; 766-1200; 764-1200; 776-1205; 766-1205; 764-1205; 776-1210; 766-1210; 764-1210; 776-1215; 766-1215; 764-1215; 776-1220; 766-1220; 764-1220; 776-1225; 766-1225; 764-1225; 776-1230; 766-1230; 764-1230; 776-1235; 766-1235; 764-1235; 776-1240; 766-1240; 764-1240; 776-1242; 766-1242; 764-1242; 764-1464; 764-1250; 764-1041; 764-828; 764-865; 764-1045; 764-1035; 764-1128; 764-1198; 764-1268; 764-1261; 764-1264; 764-1459; 764-1463; 764-1464; 764-1683; 764-1873; 764-1482; 764-1479; 764-1672; および 764-1874。

【0027】

他の実施形態では、VWF 部分は、VWF 部分が F V I I I に結合できるならば、前の段落で記載されたアミノ酸配列の 1 つに対して少なくとも 90%、または少なくとも 91%、または少なくとも 92%、または少なくとも 93%、または少なくとも 94%、または少なくとも 95%、または少なくとも 96%、または少なくとも 97%、または少なくとも 98%、または少なくとも 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【0028】

特定の実施形態では、VWF 部分は、成熟野生型 VWF と比較して内部欠失を有する。例えば、A1、A2、A3、D4、C1、C2、C3、C4、C5、C6、CK ドメインまたはそれらの組み合わせは欠失されてもよく、D' ドメインおよび／または D3 ドメインは保持される。さらなる実施形態によれば、VWF 部分は、ドメイン A1、A2、A3、D4、C1、C2、C3、C4、C5、C6 または CK のうちの 1 つまたはそれ以上を欠いている。さらなる実施形態によれば、VWF 部分は、配列番号 4 のアミノ酸 1243～2813、すなわち、ドメイン A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK を欠いている。

【0029】

さらなる実施形態では、本発明の VWF 部分またはポリペプチドは、血小板糖タンパク質 I b α (G P I b α)、コラーゲンおよび／またはインテグリン α I I b β I I I (C1 ドメイン内の R G D S 配列) に対する結合部分を含まない。他の実施形態では、本発明の VWF 部分またはポリペプチドは、VWF の中心 A2 ドメインに位置する A D A M T S

13の切断部位(Tyr1605-Met1606)を含まない。さらに別の実施形態では、本発明のVWF部分またはポリペプチドは、GPIb α に対する結合部分を含まず、かつ／またはコラーゲンに対する結合部分を含まず、かつ／またはインテグリン α IIb β IIIに対する結合部分を含まず、かつ／またはVWFの中心A2ドメインに位置するADAMTS13の切断部分(Tyr1605-Met1606)を含まない。好ましい実施形態では、VWF部分または本発明のポリペプチドは、配列番号18のアミノ酸1691~1905を含まない。別の好ましい実施形態では、VWF部分または本発明のポリペプチドは、UniProtKB-P04275として寄託されたアミノ酸配列のアミノ酸1691~1905を含まない。別の好ましい実施形態では、VWF部分または本発明のポリペプチドは、ヒトVWFのアミノ酸1691~1905を含まない。

10

【0030】

別の実施形態では、ポリペプチドは、VWFドメインA1およびA3またはその一部を含まず、コラーゲンI型およびIII型に対する親和性が低い、または本質的に親和性がなく、上記親和性が低いまたは本質的にないということは、ポリペプチドのコラーゲンI型およびIII型への結合に関する解離定数 $K_D > 10 \mu M$ を特徴とする。

【0031】

本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの2つの単量体が共有結合している場合、本発明において「二量体」と称する。好ましくは、共有結合は、本発明のポリペプチドのVWF部分内に位置する。好ましくは、2つの単量体サブユニットは、少なくとも1つのジスルフィド架橋を介して、例えば1、2、3または4個のジスルフィド架橋により共有結合されている。少なくとも1つのジスルフィド架橋を形成するシステイン残基は、好ましくは、本発明のポリペプチドのVWF部分内に位置する。一実施形態では、これらのシステイン残基は、Cys-1099、Cys-1142、Cys-1222、Cys-1225、もしくはCys-1227、またはそれらの組み合わせである。好ましくは、本発明の二量体ポリペプチドは、ポリペプチドのVWF部分内に位置する上記共有結合に加えて、単量体を連結するさらなる共有結合をなんら含んでおらず、特にポリペプチドのHLEMまたはHLEP部分内に位置するさらなる共有結合をなんら含まない。しかしながら、代替の実施形態によれば、本発明の二量体ポリペプチドは、単量体を連結するポリペプチドのHLEMまたはHLEP部分内に位置する共有結合を含んでもよい。

20

【0032】

二量体は、好ましくはヘテロ二量体である。本発明のポリペプチドが二量体である場合、各単量体は、好ましくは独立して、配列番号18のアミノ酸764~1099、アミノ酸764~1142、アミノ酸764~1222、アミノ酸764~1225、アミノ酸764~1227またはアミノ酸764~1242に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、FVIIに結合することができる。好ましい実施形態では、各サブユニット中のVWF部分は、配列番号18のアミノ酸764~1099、アミノ酸764~1142、アミノ酸764~1222、アミノ酸764~1225、アミノ酸764~1227またはアミノ酸764~1242に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を独立して含むか、または実質的にそれからなり、FVIIに結合することができる。一実施形態では、各単量体のVWF部分は、配列番号18のアミノ酸764~1099、アミノ酸764~1142、アミノ酸764~1222、アミノ酸764~1225、アミノ酸764~1227またはアミノ酸764~1242を含むか、または実質的にそれからなる。

30

40

【0033】

VWF部分は、WO2013/106787A1、WO2014/198699A2、WO2011/060242A2またはWO2013/093760A2に開示されたVWFフラグメントのいずれか1つであってもよいし、または実質的にそれからなってもよく、これらの開示は、参照により本書に組み込まれる。

【0034】

50

さらなる好ましい実施形態によれば、上記開示されたようなVWF部分は、WO2016/000039A1またはWO2017/117631A1に開示されたようなアミノ酸置換の少なくとも1つを含んでもよい。VWF部分のそれらの改変バージョンは、配列番号18による野生型VWFのD'ドメインのアミノ酸配列と比較して、そのD'ドメイン内に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。VWF部分の改変バージョンのアミノ酸配列は、それぞれの野生型配列と比較して1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を有することができる。改変型VWF部分のD'ドメインのアミノ酸配列は、好ましくは配列番号18のD'ドメインに対して1または2または3個のアミノ酸置換を有する。配列番号20の位置1に対応する配列番号18の位置764のSが、G、P、V、E、Y、AおよびLからなる群から選択されるアミノ酸で置換されていることが好ましい。また、配列番号20の位置3に対応する、配列番号18の位置766のSが、Y、I、M、V、F、H、RおよびWからなる群から選択されるアミノ酸で置換されていることも好ましい。配列番号18の位置1083のVがアミノ酸アラニン(A)で置換されていることがさらに好ましい。好ましい置換の組み合わせとしては、配列番号18の配列を参照して、S764G/S766Y、S764P/S766I、S764P/S766M、S764V/S766Y、S764E/S766Y、S764Y/S766Y、S764L/S766Y、S764P/S766W、S766W/806A、S766Y/P769K、S766Y/P769N、S766Y/P769R、S764P/S766L、S764G/S766Y/V1083A(GYA)、S764E/S766Y/V1083A(EYA)およびS766Y/V1083A(YA)が含まれる。最も好ましいのは、配列番号18の配列を参照し、置換S764E/S766Y/V1083A(EYA)の組み合わせである。

【0035】

本発明のポリペプチドのFVIIIに対する結合親和性は、上記置換の導入によって、上記改変を除いて同じアミノ酸配列を有する参照ポリペプチドの結合親和性と比較してさらに増加し得る。VWF部分内の上記置換は、共投与されたFVIIIの半減期、または共投与されたFVIIIの安定性の増加に寄与し得る。

【0036】

赤血球結合部分

「赤血球(erythrocyte)」、「赤血球(red blood cell)」および「RBC」という用語は、同じ意味を有し、本明細書において互換的に使用される。

【0037】

赤血球結合部分は、好ましくは、赤血球、好ましくはヒト赤血球の表面に露出した分子に結合することができるペプチドまたはポリペプチドである。好ましくは、赤血球の表面に露出した分子は、赤血球、好ましくはヒト赤血球の表面上の膜タンパク質である。より好ましくは、赤血球、好ましくはヒト赤血球の表面に露出した分子は、Band3(CD233)、アクアポリン-1、Glut-1、Kidd抗原、RhAg/Rh50(CD241)、Rh(CD240)、Rh30CE(CD240CE)、Rh30D(CD240D)、Kx、グリコフォリンA(CD235a)、グリコフォリンB(CD235b)、グリコフォリンC(CD235c)、グリコフォリンD(CD235d)、Keil(CD238)、Duffy/DARCI(CD234)、CR1(CD35)、DAF(CD55)、グロボシド、CD44、ICAM-4(CD242)、Lu/B-CAM(CD239)、XG1/XG2(CD99)、EMMPRIN/ニューロセリン(CD147)、JMH、グリコシルトランスフェラーゼ、カートライト(Cartwright)、ドンブロック(Dombrock)、C4A/CAB、Scimma、MER2、ストマチン、BA-I(CD24)、GPIV(CD36)、CD108、CD139およびH抗原(Hantigen)(CD173)からなる群から選択される。

【0038】

好ましくは、赤血球結合部分は、グリコフォリンA(CD235a)、グリコフォリンB(CD235b)、グリコフォリンC(CD235c)、およびグリコフォリンD(CD235d)からなる群から選択される分子に特異的に結合することができるペプチドま

10

20

30

40

50

たはポリペプチドである。最も好ましくは、グリコフォリンA（CD235a）に特異的に結合することができる赤血球結合部分。

【0039】

適切な赤血球結合部分は、WO2019/075523A1、WO2014/135528A1、WO2018/093766A1、WO2013/121296A1およびWO2012/021512A2に記載されており、これらの開示は、その全体が本明細書に組み込まれる。ヒト赤血球に結合する赤血球結合部分の例には、配列番号21もしくは配列番号23を含む、または本質的にそれからなるポリペプチドが含まれる。配列番号21は、WO2014/135528A1に開示されたIH4と称するVHHナノボディの例示的なアミノ酸配列を示す。配列番号23は、ハイブリドーマG26.4.1C3/86 [RAT 1C3/86] (ATCC^(R) HB-9893TM) から得られるscFv 1C3を示す。

10

【0040】

適切な赤血球結合部分は、ファージディスプレイ（例えば、WO2018/093766A1に記載されているような、およびハイブリドーマ技術によって提供することができる。

【0041】

好ましくは、本発明のポリペプチドは、VWF部分および赤血球結合部分が、場合によりリンカー配列を介して融合されている、融合タンパク質である。

【0042】

20

半減期延長部分（HLEM）

VWF部分および赤血球結合部分に加えて、本発明のポリペプチドは、ある好ましい実施形態において、半減期延長部分をさらに含んでもよい。半減期延長部分は、VWF部分に融合された異種アミノ酸配列であってもよい。あるいは、半減期延長部分は、ペプチド結合とは異なる共有結合によって、VWF部分を含むポリペプチドに化学的にコンジュゲートされていてもよい。好ましくは、半減期延長部分は、二量体化または多量体化を誘導しない。好ましくは、半減期延長部分は、二量体または多量体を形成することができない。

【0043】

本発明の特定の実施形態では、本発明のポリペプチドの半減期は、化学修飾、例えば、ポリエチレングリコール（PEG化）、グリコシル化PEG、ヒドロキシルエチルスターチ（HES化）、ポリシアル酸、エラスチン様ポリペプチド、ヘパロサンポリマーまたはヒアルロン酸などの半減期延長部分の付加によって延長される。別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、化学的リンカーを介してアルブミンのようなHLEMにコンジュゲートされる。このコンジュゲーション技術の原理は、ConjuChem LLCによって例示的に記載されている（例えば、米国特許第7,256,253号参照）。

30

【0044】

他の実施形態では、半減期延長部分は、半減期増強ポリペプチド（HLEP）である。好ましくは、HLEPは、アルブミンまたはそのフラグメントである。アルブミンのN末端は、VWF部分のC末端に融合されてもよい。あるいは、アルブミンのC末端は、VWF部分のN末端に融合されてもよい。VWF部分のFVIIへの結合能力を妨害または消失させないならば、1つまたはそれ以上のHLEPがVWF部分のN末端またはC末端に融合されてもよい。

40

【0045】

組換えポリペプチドは、好ましくは、VWF部分とHLEMとの間に位置する共有結合、またはVWF部分とHLEPの間に位置するリンカー配列をさらに含む。

【0046】

上記リンカー配列は、1つまたはそれ以上のアミノ酸、特に1~50個、1~30個、1~20個、1~15個、1~10個、1~5個または1~3個（例えば1、2または3個）のアミノ酸からなり、互いに同等または異なってもよいペプチドリンカーであり得る。好ましくは、リンカー配列は、野生型VWFの対応する位置には存在しない。上記

50

リンカー配列に存在する好ましいアミノ酸としては、G l yおよびS e rが含まれる。リンカー配列は、非免疫原性でなければならない。好ましいリンカーは、グリシン残基とセリン残基を交互にして構成されてもよい。適切なリンカーは、例えば、WO 2 0 0 7 / 0 9 0 5 8 4 A 1に記載されている。

【0047】

本発明の別の実施形態では、V W F部分とH L E Pとの間のペプチドリンカーは、ヒトタンパク質における天然ドメイン間リンカーまたは配列として機能するペプチド配列からなる。好ましくは、このようなペプチド配列は、その自然環境において、この配列に対する自己寛容を担うことができるように、タンパク質表面の近くに位置し、免疫系にアクセス可能である。例は、WO 2 0 0 7 / 0 9 0 5 8 4 A 1に示されている。切断可能なリンカー配列は、例えば、WO 2 0 1 3 / 1 2 0 9 3 9 A 1に記載されている。

10

【0048】

組換えポリペプチドの好ましい実施形態では、V W F部分とH L E Pとの間のリンカーは、配列番号2のアミノ酸配列480～510を有するかまたはそれからなるグリシン／セリンペプチドのリンカーである。

【0049】

一実施形態では、ポリペプチドは、以下の構造を有する。

V W F M - L 1 - H - L 2 - E B M、[式1]

式中、V W F MはV W F部分であり、L 1は化学結合またはリンカー配列であり、HはH L E M、特にH L E Pであり、L 2は化学結合またはリンカー配列であり、E B Mは赤血球結合部分である。

20

【0050】

L 1およびL 2は、独立して化学結合、または1つまたはそれ以上のアミノ酸、例えば1～50個、1～30個、1～20個、1～15個、1～10個、1～5個もしくは1～3個（例えば1、2もしくは3個）のアミノ酸からなり、互いに同等または異なってもよいリンカー配列であってもよい。通常、リンカー配列は、野生型V W Fの対応する位置には存在しない。L 1および／またはL 2に存在する適切なアミノ酸の例としては、G l yおよびS e rが含まれる。リンカーは非免疫原性でなければならない、切断不可能なまたは切断可能なリンカーであってもよい。切断不可能なリンカーは、WO 2 0 0 7 / 0 9 0 5 8 4 A 1に例示されているように、グリシン残基とセリン残基を交互にして構成されてもよい。本発明の別の実施形態では、V W F部分とアルブミン部分との間のペプチドリンカーは、ヒトタンパク質における天然ドメイン間リンカーまたは配列として機能するペプチド配列からなる。好ましくは、このようなペプチド配列は、その自然環境において、この配列に対する自己寛容を担うことができるように、タンパク質表面の近くに位置し、免疫系にアクセス可能である。例は、WO 2 0 0 7 / 0 9 0 5 8 4 A 1に示されている。切断可能なリンカー配列は、例えば、WO 2 0 1 3 / 1 2 0 9 3 9 A 1に記載されている。

30

【0051】

好ましいH L E P配列は、下に記載されている。同様に本発明に包含されるのは、それぞれのH L E Pの正確な「N末端アミノ酸」もしくは正確な「C末端アミノ酸」への融合、またはH L E Pの1つもしくはそれ以上のアミノ酸のN末端欠失を含む、それぞれのH L E Pの「N末端部」もしくは「C末端部」への融合である。ポリペプチドは、1つより多いH L E P配列、例えば2つまたは3つのH L E P配列を含んでもよい。これらの複数のH L E P配列は、タンデムに、例えば連続した繰り返しとして、V W FのC末端部に融合されてもよい。

40

【0052】

半減期増強ポリペプチド（H L E P）

好ましくは、半減期延長部分は、半減期増強ポリペプチド（H L E P）である。より好ましくは、H L E Pは、アルブミン、アルブミンファミリーのメンバーまたはそのフラグメント、大きな流体力学的体積を有する溶媒和ランダム鎖（例えば、X T E N（S c h e l l e n b e r g e rら、2009；Nature Biotechnol. 27:1

50

186-1190)、ホモアミノ酸リピート(HAP)またはプロリン-アラニン-セリンリピート(PAS)、アフアミン、アルファ-フェトプロテイン、ビタミンD結合タンパク質、トランスフェリンまたはそのバリエーションもしくはフラグメント、ヒト絨毛性ゴナドトロピン-βサブユニットのカルボキシル末端ペプチド(CTP)、新生児Fc受容体(FcRn)に結合することができるポリペプチド、特に免疫グロブリン定常領域およびその一部、例えば、Fcフラグメント、アルブミンに、アルブミンファミリーのメンバーもしくはそのフラグメントに、または免疫グロブリン定常領域もしくはその一部に生理学的条件下で結合することができるポリペプチドまたは脂質からなる群から選択される。免疫グロブリン定常領域またはその一部は、好ましくは、免疫グロブリンG1のFcフラグメント、免疫グロブリンG2のFcフラグメントまたは免疫グロブリンAのFcフラグメントである。

10

【0053】

好ましくは、HLEPは、二量体化または多量体化を誘導しない。好ましくは、HLEPは、二量体または多量体を形成することができない。

【0054】

本明細書で使用される半減期増強ポリペプチドは、本明細書に記載された全長半減期増強タンパク質、または凝固因子の治療活性もしくは生物学的活性を安定化もしくは延長することができる、特に本発明のポリペプチドの*in vivo*半減期を増加させることができる、その1つまたはそれ以上のフラグメントであってもよい。このようなフラグメントは、10個またはそれ以上のアミノ酸の長さであってもよいし、またはHLEP配列から少なくとも約15個、少なくとも約20個、少なくとも約25個、少なくとも約30個、少なくとも約50個、少なくとも約100個、もしくはそれ以上の連続したアミノ酸を含んでもよいし、またはHLEPフラグメントが、HLEPを含まないそれぞれのポリペプチドと比較して少なくとも25%の機能半減期延長を提供する限り、それぞれのHLEPの特定のドメインの一部または全部を含んでもよい。

20

【0055】

本発明のポリペプチドのHLEP部分は、野生型HLEPのバリエーションであってもよい。用語「バリエーション」は、保存的または非保存的のいずれかの挿入、欠失および置換を含み、このような変化はVWF部分のFVII結合活性を実質的に変化させない。

【0056】

特に、本発明の提案されたVWF部分-HLEP融合構築物は、HLEPの天然に存在する多型バリエーションおよびHLEPのフラグメントを含んでもよい。HLEPは、あらゆる脊椎動物、特にあらゆる哺乳動物、例えばヒト、サル、ウシ、ヒツジ、またはブタに由来してもよい。非哺乳動物のHLEPには、雌鶏およびサケが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

30

【0057】

本開示の特定の実施形態によれば、本発明の組換えポリペプチドのHLEM、特にHLEP部分は、代替用語「FP」により特定されてもよい。好ましくは、用語「FP」は、ヒトアルブミンを表す。

【0058】

特定の好ましい実施形態によれば、組換えポリペプチドは、融合タンパク質である。本発明に関する融合タンパク質は、VWF部分およびHLEPをコードする少なくとも2つのDNA配列のインフレーム結合によって作成されたタンパク質である。当業者は、融合タンパク質DNA配列の翻訳が単一タンパク質配列になることを理解する。さらなる好ましい実施形態によるペプチドリンカーをコードするDNA配列のインフレーム挿入の結果として、VWF部分、適切なリンカーおよびHLEPを含む融合タンパク質を得ることができる。

40

【0059】

いくつかの実施形態によれば、合剤化された(*co-formulated*)FVIIは、本明細書に記載されたHLEMまたはHLEP構造をいずれも含まない。特定の他

50

の実施形態によれば、合剤化されたF V I I Iは、本明細書に記載されたH L E MまたはH L E P構造の少なくとも1つを含んでもよい。

【0060】

H L E Pとしてのアルブミン

用語、「ヒト血清アルブミン」(H S A)および「ヒトアルブミン」(H A)は、本出願において互換的に使用される。用語「アルブミン」および「血清アルブミン」はより広く、ヒト血清アルブミン(ならびにそのフラグメントおよびバリエント)、および他の種からのアルブミン(ならびにそのフラグメントおよびバリエント)を包含する。

【0061】

本明細書で使用する場合、「アルブミン」は、アルブミンの1つまたはそれ以上の機能的特性(例えば、生物学的機能)を有する、アルブミンポリペプチドもしくはアミノ酸配列、またはアルブミンフラグメントもしくはバリエントを総称して指す。特に、「アルブミン」は、ヒトアルブミンまたはそのフラグメント、特に本明細書の配列番号19に示されるようなヒトアルブミンの成熟形態、または他の脊椎動物からのアルブミンもしくはそのフラグメント、またはこれらの分子もしくはそのフラグメントの類似体もしくはバリエントを指す。

【0062】

本開示の特定の実施形態によれば、代替用語「F P」は、H L E Pを特定するために、特にアルブミンをH L E Pとして定義するために使用される。

【0063】

特に、本発明の提案されたポリペプチドは、ヒトアルブミンの自然発生の多型バリエントおよびヒトアルブミンのフラグメントを含んでもよい。一般に、アルブミンフラグメントまたはバリエントは、少なくとも10個、好ましくは少なくとも40個、最も好ましくは70個またはそれ以上のアミノ酸長となる。

【0064】

本発明の好ましい実施形態は、F c R n受容体への結合が強化された本発明のポリペプチドのH L E Pとして使用されるアルブミンバリエントを含む。このようなアルブミンバリエントは、野生型アルブミンとのV W F部分の融合と比較して、V W F部分アルブミンバリエント融合タンパク質のより長い血漿半減期を誘導し得る。

【0065】

本発明のポリペプチドのアルブミン部分は、H Aの少なくとも1つのサブドメインもしくはドメイン、またはその保存的修飾を含んでもよい。

【0066】

H L E Pとしての免疫グロブリン

免疫グロブリンG(I g G)定常領域(F c)は、治療用タンパク質の半減期を増加させることが当技術分野で知られている(Dumont J Aら、2006、BioDrugs 20:151-160)。重鎖のI g G定常領域は、3つのドメイン(C H 1-C H 3)およびヒンジ領域からなる。免疫グロブリン配列は、いずれかの哺乳動物、またはそれぞれサブクラスI g G 1、I g G 2、I g G 3もしくはI g G 4由来であってもよい。抗原結合ドメインを持たないI g GおよびI g Gフラグメントも、H L E Pとして使用され得る。治療用ポリペプチド部分は、好ましくは抗体のヒンジ領域またはペプチドリンカーを介してI g GまたはI g Gフラグメントに連結され、それらは切断可能であってもよい。いくつかの特許および特許出願は、治療用タンパク質のi n v i v o半減期を増強するために、治療用タンパク質を免疫グロブリン定常領域に融合させることを記載している。U S 2 0 0 4 / 0 0 8 7 7 7 8およびW O 2 0 0 5 / 0 0 1 0 2 5 A 2は、F cドメインまたは免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部と、ペプチドの半減期を増加させるが、そうでない場合は、迅速に体内で除去される生物学的活性ペプチドとの融合タンパク質を記載している。F c-I F N-β融合タンパク質により、生物学的活性の増強、循環半減期の延長、および溶解度の増加が達成されたことが記載されている(W O 2 0 0 6 / 0 0 0 4 4 8 A 2)。血清半減期が延長され、i n v i v oでの効力が増加したF c

10

20

30

40

50

－EPOタンパク質（WO2005／063808A1）、ならびにG-CSF（WO2003／076567A2）、グルカゴン様ペプチド－1（WO2005／000892A2）、凝固因子（WO2004／101740A2）およびインターロイキン10（米国特許第6,403,077号）とのFc融合物は、すべて半減期の増強性を有することが開示された。

【0067】

好ましくは、HLEPとして使用される免疫グロブリンまたはFc部分は、二量体化または多量体化を誘導しない。好ましくは、HLEPとして使用される免疫グロブリンまたはFc部分は、二量体または多量体を形成することができない。

【0068】

本発明により使用することができる様々なHLEPは、WO2013／120939A1に詳細に記載されている。

【0069】

二量体

本発明のポリペプチドは、二量体を高い比率で有してもよい。したがって、本発明のポリペプチドは、好ましくは二量体として存在する。一実施形態では、ポリペプチドの少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%、または少なくとも98%が、二量体として存在する。最も好ましくは、本発明の本質的に全てのポリペプチドが二量体として存在する。二量体は、好ましくはヘテロ二量体である。

【0070】

さらに好ましいのは、本発明のポリペプチドが多量体を含まないことである。二量体は単量体と比較して第VII因子への改善された親和性を有するため、二量体の使用が好ましい。本発明のポリペプチドの二量体含有量および二量体と単量体との比率は、例えばWO2010／087271A1の第56頁、第6～10行目に記載されているように、サイズ排除クロマトグラフィーまたはHPLCにより決定することができる。あるいは、二量体含有量および二量体と単量体との比率は、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットによって決定することができ、本出願の実施例を参照のこと。

【0071】

特に明記しない限り、本明細書に記載された本発明のポリペプチドのあらゆるモル濃度は、実際にホモ二量体またはヘテロ二量体として存在するかどうかに関わらず、本発明のポリペプチドの二量体のモル濃度を指す。

【0072】

一実施形態では、本発明のポリペプチドの第VII因子への親和性は、同じ第VII因子分子に対するヒト天然VWFのものよりも大きい。ポリペプチドの第VII因子親和性は、ヒト天然の、血漿由来または組換えのいずれかの第VII因子、特に切断型または欠失Bドメインを有する組換え第VII因子分子を指すこともあり得る。

【0073】

二量体の比率が高い本発明のポリペプチドの調製物は、第VII因子に対して増加した親和性を有することが見出されている。また、増加した二量体の比率の代わりに、またはそれと組み合わせて、第VII因子結合ドメイン内に変異を有する本発明によるポリペプチドも、第VII因子への親和性を増加させる本発明の好ましい実施態様である。適切な変異は、例えば、WO2013／120939A1に開示されている。

【0074】

好ましくは、本発明のポリペプチドはヘテロ二量体である。一実施形態では、ヘテロ二量体は、第1のサブユニットと第2のサブユニットとを含み、第1のサブユニットは本明細書に定義された第1のVWF部分と赤血球結合部分とを含み、第2のサブユニットは本明細書に定義された第2のVWF部分を含み、第2のサブユニットは赤血球結合部分を含まない。第1および第2のサブユニット（単量体）中のVWF部分は、好ましくは同一である。

【0075】

一実施形態では、第2サブユニットは、実質的に第2のVWF部分からなる。

【0076】

別の実施形態では、二量体を形成する2つの単量体は、VWF部分内のシステイン残基によって形成される少なくとも1つのジスルフィド架橋を介して互いに共有結合されている。1つまたはそれ以上のジスルフィド架橋を形成するシステイン残基は、Cys-1099、Cys-1142、Cys-1225、Cys-1227およびそれらの組み合わせ、好ましくはCys-1099およびCys-1142からなる群から選択されてもよく、アミノ酸番号付けは配列番号18を参照のこと。

【0077】

ポリペプチドの調製

本発明のポリペプチドをコードする核酸は、当技術分野で知られた方法に従って調製することができる。ヒト天然VWFのプレプロ形態 (pre-pro form) のcDNA配列 (配列番号17) に基づいて、上記のVWF部分構築物または本発明のポリペプチドをコードする組換えDNAを設計および産生することができる。

【0078】

宿主細胞から分泌されるポリペプチドが、ヒトVWFのプレプロ形態のアミノ酸1~763を含まない場合であっても、ポリペプチドの細胞内前駆体をコードする核酸は (例えば、DNA) は、配列番号18のアミノ酸23~763または好ましくはアミノ酸1~763に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列を含むことが好ましい。最も好ましくは、ポリペプチドの細胞内前駆体をコードする核酸 (例えば、DNA) は、配列番号18のアミノ酸23~763、または配列番号18のアミノ酸1~763をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0079】

DNAが、発現プラスミドに正しい方向で挿入されたオープンリーディングフレーム全体を含む構築物は、タンパク質の発現に使用することができる。典型的な発現ベクターは、プラスミドを持つ細胞において、挿入された核酸に対応する大量のmRNAの合成を指示するプロモーターを含んでいる。また、宿主生物内でその自律的な複製を可能にする複製配列の起点、および合成されたmRNAが翻訳される効率を高める配列が含まれていてもよい。安定な長期ベクターは、例えばウイルスの制御要素 (例えば、Epstein Barr VirusゲノムのOriP配列) を用いることにより、自由に複製する実体として維持され得る。また、ベクターをゲノムDNAに組み込んだ細胞株を製造してもよく、このやり方では、遺伝子産物が連続的に生成される。

【0080】

通常、提供される細胞は、本発明のポリペプチドをコードする核酸を哺乳類宿主細胞に導入することにより得られる。

【0081】

細胞培養、および糖タンパク質の発現に感受性のあるあらゆる宿主細胞は、本発明により利用され得る。特定の実施形態では、宿主細胞は哺乳類である。本発明により使用され得る哺乳類細胞の非限定的な例としては、BALB/cマウス骨髄腫株 (NSO/1、EACC番号: 85110503) ; ヒト網膜芽細胞 (PER.C6 (CruCell, Leiden, オランダ)) ; SV40によって形質転換されたサル腎CV1株 (COS-7、ATCC CRL 1651) ; ヒト胚性腎株 (293または懸濁培養において増殖のためにサブクロニングされた293細胞, Grahamら, J. Gen Virol., 36:59, 1977) ; ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK, ATCC CCL10) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞+/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. 米国, 77:4216, 1980) ; マウスセルトリ細胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod, 23:243-251, 1980) ; サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL 70) ; アフリカ

10

20

30

40

50

ミドリザル腎臓細胞（VERO-76、ATCC CRL-1587）；ヒト頸部癌細胞（HeLa、ATCC CCL 2）；イヌ腎臓細胞（MDCK、ATCC CCL 34）；バッファローラット肝細胞（BRL 3A、ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138、ATCC CCL 75）；ヒト肝細胞（Hep G2、HB 8065）；マウス乳腺腫瘍（MMT 060562、ATCC CCL 51）；TRI細胞（Mathersら、Annals NY Acad. Sci., 383:44-68, 1982）；MRC5細胞；PS4細胞；ヒト羊膜細胞の細胞（CAP）；およびヒト肝細胞がん細胞株（Hep G2）。好ましくは、細胞株は、齧歯類細胞株、特にCHOまたはBHKなどのハムスター細胞株、またはヒト細胞株である。

【0082】

目的の糖タンパク質の発現を達成するのに十分な核酸を哺乳類宿主細胞に導入するのに適した方法は、当技術分野で知られている。例えば、Gettlingら、Nature, 293:620-625, 1981；Manteiraら、Nature, 281:40-46, 1979；Levinsonら、EP0117060；およびEP0117058を参照のこと。哺乳類細胞については、遺伝物質を哺乳類細胞に導入する一般的な方法として、Graham and van der Erbのリン酸カルシウム沈殿法（Virology, 52:456-457, 1978）またはHawley-NelsonのリポフェクタミンTM（Gibco BRL）Method（Focus 15:73, 1993）が含まれる。哺乳類細胞宿主系形質転換の一般的な態様は、Axelによって米国特許第4399216号に記載されている。哺乳類細胞に遺伝物質を導入するための様々な技術については、Keownら、Methods in Enzymology, 185:527-537, 1990、およびMansourら、Nature, 336:348-352, 1988を参照のこと。

【0083】

細胞は、ポリペプチドの発現が可能な条件下で培養される。ポリペプチドは、当業者に知られた方法を用いて回収および精製することができる。

【0084】

治療的使用

本発明のポリペプチドは、血友病Aを含む凝固障害の処置に有用である。用語「血友病A」は、機能的凝固FVIIIIにおける欠損のことであり、これは通常、遺伝する。

【0085】

本発明のさらなる態様は、血液凝固障害を処置する方法であって、それを必要とする患者に、本明細書において上記定義されるようなポリペプチドの有効量を投与することを含む方法である。

【0086】

疾患の処置には、いずれかの臨床段階または症状において疾患のいずれかの形態を有すると既に診断された患者の処置；疾患の症状または徴候の発症または進展または憎悪または悪化の遅延；ならびに疾患の重症度の予防および／または軽減が包含される。

【0087】

本発明のポリペプチドが投与される「対象」または「患者」は、好ましくはヒトである。特定の態様において、ヒトは小児患者である。他の態様では、ヒトは成人患者である。

【0088】

本発明のポリペプチドを含む組成物を本明細書に記載する。この組成物は、典型的には、薬学的に許容される担体を含む、無菌の医薬組成物の一部として供給される。この組成物は、（患者にそれを投与する所望の方法に応じて）いずれかの適切な形態をとることができる。

【0089】

本発明のポリペプチドは、皮下、皮内または筋肉内などの様々な血管外経路によって患者に投与することができる。いずれか所定の場合における最も適切な投与経路は、特定のポリペプチド、対象、ならびに疾患の性質および重症度ならびに対象の身体状態に依存す

10

20

30

40

50

ることになる。好ましくは、本発明のポリペプチドは、皮下投与されることになる。

【0090】

一実施形態では、処置は、本発明のポリペプチドを唯一の有効成分として投与することを含む。別の実施形態では、処置は、本発明のポリペプチドを、少なくとも1つのさらなる有効成分と組み合わせて投与することを含む。本発明のポリペプチドおよび少なくとも1つのさらなる有効成分は、同時に、別々にまたは順次に投与することができる。

【0091】

好ましくは、さらなる有効成分はFVIIである。したがって、本発明の方法は、好ましくは、有効量のFVIIを患者に投与することを含む。本発明のポリペプチドおよびFVIIは、好ましくは皮下に共投与される。

【0092】

本発明のポリペプチドおよびFVIIによる総投与回数および処置の長さの決定は、十分に当業者の能力の範囲内にある。本発明のポリペプチドの投与量および投与されるFVIIは、投与されるFVIIの濃度に依存する。また、血液凝固障害の重症度の程度も、本発明のポリペプチドおよび投与されるFVIIの適切な投与量を決定するために考慮され得る。FVIIの典型的な投与量は、約20IU/kg体重～約1000IU/kg体重、好ましくは約20IU/kg体重～約500IU/kg体重、さらに好ましくは約20IU/kg体重～約400IU/kg体重、より好ましくは約20IU/kg体重～約300IU/kg体重の範囲であり得る。

【0093】

本発明によれば、本発明のポリペプチドで処置される患者は、血液凝固第VII因子でも処置される。本発明のポリペプチドおよび第VII因子は、好ましくは同時に、すなわち一緒に投与され得るが、逐次的な様式での投与も原則的に実施することができ、投与の両方の様式は、用語「併用療法 (combination therapy)」および「共投与 (co-administration)」によって包含される。本発明のポリペプチドおよび第VII因子は、混合物として、すなわち同じ組成物内で投与してもよいし、または別々に、すなわち別々の組成物として投与してもよい。組換えポリペプチドおよびFVIIタンパク質の共投与は、好ましくは、組換えポリペプチドおよびFVIIタンパク質を含む単一の組成物において一緒に投与することによって達成される。さらなる好ましい実施形態によれば、組換えポリペプチドおよびFVIIタンパク質の共投与は、単一の組成物中に配合された組換えポリペプチドおよびFVIIを含む配合製品を提供することによって、または投与前に混合されるように準備された少なくとも2つの別々の製品のセットもしくはキットを提供し、それによって第1の製品が組換えポリペプチドを含み、第2の製品がFVIIを含むことによって達成される。特に、組換えポリペプチドおよびFVIIタンパク質が、共投与の前に混合される別々の組成物または製品で提供される場合、混合物は、投与前に、少なくとも上記組換えポリペプチドの比率が上記FVIIに結合可能となるような方法で、投与前に処置され得る。例えば、混合物は、一定の時間インキュベートしてもよい。このようなインキュベーションは、周囲温度または、必要に応じて高められた温度のいずれかで、しかし、好ましくは40℃未満の温度で、1分未満、または5分未満で実施され得る。このような迅速なインキュベーションステップは、単一の組成物中に配合された組換えポリペプチドおよびFVIIを含む配合製品についての再構成中にも適切であり得る。

【0094】

使用される組成物中の第VII因子の濃度は、典型的には、10～10,000IU/mLの範囲である。異なる実施形態において、本発明の組成物中のFVIIの濃度は、10～8,000IU/mL、または10～5,000IU/mL、または20～3,000IU/mL、または50～1,500IU/mL、または3,000IU/mL、または2,500IU/mL、または2,000IU/mL、または1,500IU/mL、または1,200IU/mL、または1,000IU/mL、または800IU/mL、または750IU/mL、または600IU/mL、または500IU/mL、また

10

20

30

40

50

は400IU/mL、または300IU/mL、または250IU/mL、または200IU/mL、または150IU/mL、または125IU/mL、または100IU/mL、または62.5mL、または50IU/mLの範囲であるが、但し、本明細書に定義された本発明のVWFポリペプチドに関する比率に関する要件を満たすものとする。

【0095】

「国際単位」または「IU」は、国際標準標本に対して「IU」で較正された標準を用いた一段階凝固アッセイまたは発色基質FVII活性アッセイなどのFVII活性アッセイによって測定されるFVIIの血液凝固活性（効力）の測定単位である。一段階凝固アッセイは、例えば、N Lee, Martin Lら, An Effect of Predilution on Potency Assays of FVII Concentrates, Thrombosis Research (Pergamon Press Ltd.) 30, 511-519 (1983)に記載されたように当業者に知られている。一段階アッセイの原理：試験は、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）アッセイの改良版として実施される：血漿をリン脂質および表面活性化剤とインキュベートすることにより、内在性凝固系の因子の活性化が誘導される。カルシウムイオンの添加により、凝固カスケードが開始される。測定可能なフィブリン塊が形成されるまでの時間を測定する。このアッセイは第VII因子欠損血漿の存在下で実施される。凝固第VII因子欠損血漿の凝固能は、試験するサンプル中に含まれる凝固第VII因子によって回復される。凝固時間の短縮は、サンプル中に含まれる第VII因子の量に比例する。凝固第VII因子の活性は、国際単位で第VII因子の既知の活性を有する標準製剤と直接比較することにより定量される。もう1つの標準アッセイは、発色基質アッセイである。発色アッセイは、Coamatic^(R) FVII検査キット（Chromogenic Instrumentation Laboratory SpA V. le Monza 338-20128 ミラノ、イタリア）のように商業的に購入してもよい。発色アッセイの原理：カルシウムおよびリン脂質の存在下で、第X因子は、第IXa因子から第IXa因子の活性化される。この反応は補因子として第VIIa因子によって刺激される。FVIIaは、測定されるサンプル中のFVIIから、反応混合物中の少量のトロンビンによって生成される。

【0096】

最適な濃度のCa²⁺、リン脂質および第IXa因子ならびに過剰量の第X因子を使用した場合、第X因子の活性化は第VII因子の効力に比例する。活性化された第X因子は発色基質S-2765から発色団pNAを放出する。したがって、405nmで測定されるpNAの放出量は、形成されたFXaの量に比例し、そのためサンプルの第VII因子活性にも比例する。

【0097】

本発明のポリペプチドおよびFVIIを併用療法で使用する場合、投与されるポリペプチドとFVIIとの比率は、以下の「比率」の項において定義されるようないずれかの比率であり得る。別の態様において、本発明は、in vivoでのFVIIの半減期の増加に使用するための本発明のポリペプチドに関する。本発明のさらに別の態様は、対象におけるFVIIの半減期を増加させる方法であって、有効量の本発明のポリペプチド、または本発明の医薬組成物を対象に投与することを含む、方法である。本発明のポリペプチドおよびFVIIは、対象に同時に、別々にまたは順次に共投与することができる。

【0098】

さらに別の態様では、本発明は、in vivoでのインヒビター形成の防止および／または低減に使用するための本発明のポリペプチドに関する。本発明のさらに別の態様は、FVIIで処置される対象におけるインヒビター形成を低減および／または防止する方法であって、上記方法は、有効量の本発明のポリペプチドを対象に投与することを含む方法である。

【0099】

第ⅤⅠⅠⅠ因子

本明細書で使用する場合、用語「第ⅤⅠⅠⅠ因子」または「FⅤⅠⅠⅠ」は、ヒト天然第ⅤⅠⅠⅠ因子の凝固活性の少なくとも一部を有する分子を指す。ヒトFⅤⅠⅠⅠは、2351個のアミノ酸（シグナルペプチドを含む）および2332個のアミノ酸（シグナルペプチドを含まない）からなる。「ヒト天然FⅤⅠⅠⅠ」とは、配列番号20に示すような全長配列（アミノ酸1～2332）を有するヒト血漿由来のFⅤⅠⅠⅠ分子である。詳細なドメイン構造、A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2は、対応するアミノ酸残基（配列番号20参照）：A1（1-336）、a1（337-372）、A2（373-710）、a2（711-740）、B（741-1648）、a3（1649-1689）、A3（1690-2020）、C1（2021-2173）およびC2（2174-2332）を有する。本明細書で言及されるFⅤⅠⅠⅠは、血漿由来FⅤⅠⅠⅠ（pdFⅤⅠⅠⅠ）または組換え産生されたFⅤⅠⅠⅠ（リコンビナントFⅤⅠⅠⅠ）であってもよい。

【0100】

FⅤⅠⅠⅠ分子の凝固活性は、一段階凝固アッセイ（例えば、Leeら、Thrombosis Research 30、511-519（1983）に記載の通り）または発色基質アッセイ（例えば、coamatic FⅤⅠⅠⅠ検査キット、Chromogenix-Instrumentation Laboratory製 SpA V. le Monza 338-20128 ミラノ、イタリア）を用いて決定することができる。これらの活性アッセイのさらなる詳細を、以下に記載する。

【0101】

好ましくは、本発明により使用されるFⅤⅠⅠⅠ分子は、ヒト天然FⅤⅠⅠⅠの比モル活性の少なくとも10%を有する。用語「比モル活性」は、FⅤⅠⅠⅠ1モル当たりの凝固活性を指し、例えば「IU／モル」FⅤⅠⅠⅠまたは一より簡便には「IU／ピコモル」FⅤⅠⅠⅠで表示される。

【0102】

好ましい実施形態において、FⅤⅠⅠⅠ分子は、非自然発生のFⅤⅠⅠⅠ分子である。好ましくは、非自然発生のFⅤⅠⅠⅠ分子は、組換え的に産生されている。別の実施形態では、FⅤⅠⅠⅠ分子は、細胞培養において産生されている。別の好ましい実施形態において、非自然発生のFⅤⅠⅠⅠ分子は、血漿由来のFⅤⅠⅠⅠのものとは異なるグリコシル化パターンを有する。さらに別の実施形態では、FⅤⅠⅠⅠ分子は、（i）Bドメイン欠失または切断型FⅤⅠⅠⅠ分子、（ii）単鎖FⅤⅠⅠⅠ分子、（iii）組換え産生二鎖FⅤⅠⅠⅠ分子、（iv）保護基または半減期延長部分を有するFⅤⅠⅠⅠ分子、（v）異種アミノ酸配列に融合されたFⅤⅠⅠⅠアミノ酸配列を含む融合タンパク質および（vi）それらの組み合わせからなる群から選択される。

【0103】

用語「第ⅤⅠⅠⅠ因子」および「FⅤⅠⅠⅠ」は、本明細書において同義的に使用される。本発明の意味での「第ⅤⅠⅠⅠ因子組成物」は、FⅤⅠⅠⅠおよびFⅤⅠⅠⅠaを含む組成物を含む。FⅤⅠⅠⅠaは、典型的には、組成物中のFⅤⅠⅠⅠタンパク質の総量を基準として、少量、例えば約1～2%のFⅤⅠⅠⅠaで存在し得る。タンパク質分解的に切断されたFⅤⅠⅠⅠは、典型的には、組成物中のFⅤⅠⅠⅠタンパク質の総量を基準にして、少量から中量、例えば、約1～50%で存在してもよい。「FⅤⅠⅠⅠ」は、ある個体から別の個体へと存在し発生し得るFⅤⅠⅠⅠの天然対立遺伝子変異を含む。FⅤⅠⅠⅠは、血漿由来であるか、または周知の産生および精製方法を用いて、組換え的に産生されてもよい。グリコシル化、チロシン硫酸化および他の翻訳後修飾の程度および位置は、選択された宿主細胞およびその増殖条件に依存して変化し得る。

【0104】

用語FⅤⅠⅠⅠは、FⅤⅠⅠⅠ類似体を含む。本明細書で使用する「FⅤⅠⅠⅠ類似体」という用語は、配列番号20と比較して1つまたはそれ以上のアミノ酸が置換または欠失されたFⅤⅠⅠⅠ分子（全長またはBドメイン切断型／欠失）、またはBドメイン切断

10

20

30

40

50

型／欠失F V I I分子については配列番号20の対応部分を指す。F V I I I類似体は自然には存在しないが、人為的な操作によって得られる。

【0105】

また、本発明により使用される第V I I I因子分子は、残りのドメインが配列番号20のアミノ酸番号1～740および1649～2332に示されるような配列に対応するBドメイン切断型／欠失F V I I I分子であってもよい。Bドメイン欠失F V I I I分子の他の形態は、さらにそのa3ドメインにおける部分欠失を有し、これは単鎖F V I I I分子をもたらす。

【0106】

このことから、これらのF V I I I分子は、好ましくは哺乳動物由来の形質転換宿主細胞において産生される組換え分子ということになる。しかしながら、Bドメイン欠失F V I I Iにおける残りのドメイン（すなわち、3つのAドメイン、2つのCドメイン、およびa1、a2およびa3領域）は、配列番号20（アミノ酸1～740および1649～2332）に示されるそれぞれのアミノ酸配列からわずかに例えば約1%、2%、3%、4%または5%異なってもよい。

【0107】

本発明により使用されるF V I I I分子は、二鎖F V I I I分子または単鎖F V I I I分子であってもよい。また、本発明により使用されるF V I I I分子は、F V I I Iの生物学的に活性なフラグメント、すなわち、Bドメイン以外のドメインが欠失または切断されているが、欠失／切断された形態のF V I I I分子が血餅の形成を支援する能力を保持しているF V I I Iであってもよい。F V I I I活性は、当技術分野でよく知られた技術を用いて*in vitro*で評価することができる。本発明によるF V I I I活性を決定するための好ましい試験は、発色基質アッセイまたは一段階アッセイ（以下を参照）である。例えば、フォンウィルブランド因子（vWF）、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質（LPR）、種々の受容体、他の凝固因子、細胞表面などのような種々の他の成分との第V I I I因子の結合能力を改変するために、またはグリコシル化部分などを導入および／または消失させるために、残りのドメインにアミノ酸修飾（置換、欠損など）を導入してもよい。また、F V I I I活性を消失させない他の変異を、本発明の組成物において使用するためのF V I I I分子／類似体に収容することができる。

【0108】

F V I I I類似体はまた、親ポリペプチドの1つまたはそれ以上のアミノ酸残基が欠失されているか、または他のアミノ酸残基で置換されている、および／または追加のアミノ酸残基が親F V I I Iポリペプチドに付加されている、F V I I I分子を含む。

【0109】

さらに、第V I I I因子分子／類似体は、例えば切断型Bドメインにおいておよび／または分子の他のドメインの1つもしくはそれ以上において他の修飾を含んでもよい（「F V I I I誘導体」）。これらの他の修飾は、例えば高分子化合物、ペプチド化合物、脂肪酸由来化合物などのような、第V I I I因子分子に結合した様々な分子の形態であってもよい。

【0110】

用語F V I I Iは、保護基または半減期延長部分を有するF V I I I分子を含む。用語「保護基」／「半減期延長部分」は、本明細書では、-SH、-OH、-COOH、-CONH₂、-NH₂などの1つもしくはそれ以上のアミノ酸部位鎖官能基、または1つもしくはそれ以上のN-および／またはO-糖鎖構造に結合し、これらのタンパク質／ペプチドにコンジュゲートされると多数の治療タンパク質／ペプチドの*in vivo*循環半減期を増加することができる1つまたはそれ以上の化学基を指すものと理解される。保護基／半減期延長部分の例としては、以下が：生体適合性脂肪酸およびその誘導体、ヒドロキシアルキルスターチ（HAS）、例えばヒドロキシエチルスターチ（HES）、ポリ（Gly_x-Ser_y）_n（ホモアミノ酸ポリマー（HAP））、ヒアルロン酸（HA）、ヘパロサンポリマー（HEP）、ホスホリルコリン系ポリマー（PCポリマー）、Flex

10

20

30

40

50

imer^(R)ポリマー (Mersana Therapeutics, MA, 米国)、デキストラン、ポリシアル酸 (PSA)、ポリエチレングリコール (PEG)、Fcドメイン、トランスフェリン、アルブミン、エラスチン様ペプチド、XTEN^(R)ポリマー (Amunix, CA, 米国)、アルブミン結合ペプチド、フォンウィルブランド因子フラグメント (vWFフラグメント)、カルボキシル末端ペプチド (CTPペプチド、Prolor Biotech, IL) およびこれらのいずれかの組み合わせ (例えば、McCormick, C. L., A. B. Lowe, および N. Ayres, Water-Soluble Polymers, in Encyclopedia of Polymer Science and Technology, 2002, John Wiley & Sons, Inc.) が含まれる。誘導体化の方法は重要ではなく、上記から明らかである。

10

【0111】

用語 FV I I I は、グリコペグ化 FV I I I を含む。この文脈において、用語「グリコペグ化 FV I I I」は、1つまたはそれ以上の PEG 基がポリペプチドの多糖側鎖 (グリカン) を介して FV I I I ポリペプチドに結合された第 V I I I 因子分子 (全長 FV I I I および Bドメイン切断型/欠失 FV I I I を含む) を指すものとする。

【0112】

本発明により使用することができる FV I I I 分子は、異種アミノ酸配列、好ましくは半減期延長アミノ酸配列に融合した FV I I I アミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。好ましい融合タンパク質は、Fc 融合タンパク質およびアルブミン融合タンパク質である。用語「Fc 融合タンパク質」は、本明細書では、いずれかの抗体アイソタイプから誘導することができる Fcドメインに融合された FV I I I を包含することを意味する。IgG Fcドメインは、IgG 抗体の比較的長い循環半減期のため、しばしば好まれるであろう。Fcドメインはさらに、例えば補体結合および/または特定の Fc 受容体への結合のような特定のエフェクター機能を調節するために修飾され得る。FcRn 受容体に結合する能力を有する Fcドメインとの FV I I I の融合は、一般に、wt FV I I I の半減期と比較して融合タンパク質の循環半減期を延長させることになるであろう。これにより、本発明で使用するための FV I I I 分子はまた、例えば、FV I I I 類似体の融合タンパク質、PEG 化もしくはグリコPEG 化 FV I I I 類似体、またはヘパロサンポリマーにコンジュゲートされた FV I I I 類似体のような FV I I I 類似体の誘導体であり得るということになる。用語「アルブミン融合タンパク質」は、本明細書において、アルブミンアミノ酸配列またはそのフラグメントもしくは誘導体に融合した FV I I I を包含することを意味する。異種アミノ酸配列は、FV I I I の N 末端もしくは C 末端に融合されてもよく、または FV I I I アミノ酸配列内に内部挿入されてもよい。異種アミノ酸配列は、WO 2008/077616 A1 に記載されたいずれかの「半減期延長ポリペプチド」であってもよく、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

【0113】

本発明により使用され得る FV I I I 分子の例は、例えば、WO 2010/045568 A1、WO 2009/062100 A1、WO 2010/014708 A2、WO 2008/082669 A2、WO 2007/126808 A1、US 2010/0173831、US 2010/0173830、US 2010/0168391、US 2010/0113365、US 2010/0113364、WO 2003/031464 A2、WO 2009/108806 A1、WO 2010/102886 A1、WO 2010/115866 A1、WO 2011/101242 A1、WO 2011/101284 A1、WO 2011/101277 A1、WO 2011/131510 A1、WO 2012/007324 A2、WO 2011/101267 A1、WO 2013/083858 A1 および WO 2004/067566 A1 に記載された FV I I I 分子を含む。

40

【0114】

本発明に従って使用することができる FV I I I 分子の例には、Advate^(R)、Helixate^(R)、Kogenate^(R)、Xyntha^(R)、Adynovate^(R)、Kovaltry^(R)、Novo 8^(R)、Nuwiq^(R)、Novoeight^(R)、Elocta

50

te^(R)の有効成分、ならびにWO2008/135501A1、WO2009/007451A1に記載のFVII分子およびWO2004/067566A1の「dBN(64~53)」と表された構築物が含まれる。この構築物は、配列番号5に示されたアミノ酸配列を有する。

【0115】

「国際単位」または「IU」は、「IU」で較正された国際標準標本に対して較正された標準を用いた一段階凝固アッセイまたは発色基質FVII活性アッセイなどのFVII活性アッセイによって測定されるFVIIの血液凝固活性(効力)の測定単位である。一段階凝固アッセイは、例えば、N Lee, Martin Lら, An Effect of Predilution on Potency Assays of FVII Concentrates, Thrombosis Research (Pergamon Press Ltd.) 30, 511-519 (1983)に記載されたように当業者に知られている。一段階アッセイの原理:試験は、活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)アッセイの改良版として実施される:血漿をリン脂質および表面活性化剤とインキュベートすることにより、内在性凝固系の因子の活性化が誘導される。カルシウムイオンの添加により、凝固カスケードが開始される。測定可能なフィブリン塊が形成されるまでの時間を測定する。このアッセイは第VII因子欠損血漿の存在下で実施される。凝固第VII因子欠損血漿の凝固能は、試験するサンプル中に含まれる凝固第VII因子によって回復される。凝固時間の短縮は、サンプル中に含まれる第VII因子の量に比例する。凝固第VII因子の活性は、国際単位で第VII因子の既知の活性を有する標準製剤と直接比較することにより定量される。もう1つの標準アッセイは、発色基質アッセイである。発色アッセイは、Coamatic FVII検査キット(Chromogenix-Instrumentation Laboratory SpA V.le Monza 338-20128 ミラノ, イタリア)のように商業的に購入してもよい。発色アッセイの原理:カルシウムおよびリン脂質の存在下で、第X因子は、第IXa因子から第Xa因子の活性化される。この反応は補因子として第VIIa因子によって刺激される。FVIIaは、測定されるサンプル中のFVIIから、反応混合物中の少量のトロンビンによって生成される。

【0116】

最適な濃度のCa²⁺、リン脂質および第IXa因子ならびに過剰量の第X因子を使用した場合、第X因子の活性化は第VII因子の効力に比例する。活性化された第X因子は発色基質S-2765から発色団pNAを放出する。したがって、405nmで測定されるpNAの放出量は、形成されたFXaの量に比例し、そのためサンプルの第VII因子活性にも比例する。

【0117】

本発明のポリペプチドおよびFVIIを併用療法で使用する場合、投与されるポリペプチドとFVIIとの比率は、以下の「比率」の項において定義されるようないずれかの比率であり得る。別の態様において、本発明は、in vivoでのFVIIの半減期の増加に使用するための本発明のポリペプチドに関する。本発明のさらに別の態様は、対象におけるFVIIの半減期を増加させる方法であって、有効量の本発明のポリペプチド、または本発明の医薬組成物を対象に投与することを含む、方法である。本発明のポリペプチドおよびFVIIは、対象に同時に、別々にまたは順次に共投与することができる。

【0118】

医薬組成物

本発明の別の態様は、本発明のポリペプチドと、場合により薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤とを含む医薬組成物である。第1の実施形態において、医薬組成物は、本発明のポリペプチドを唯一の有効成分として含む。第2の実施形態では、医薬組成物は、本発明のポリペプチドと少なくとも1つのさらなる有効成分とを含む。好ましくは、さらなる有効成分は、上述したようなFVII分子である。医薬組成物中の本発明のポ

リペプチドとF V I I Iとの比率は、後述の「比率」の項で定義されるようないずれかの比率とすることができる。

【0119】

本発明のポリペプチドの治療用製剤は、所望の純度を有する本発明のポリペプチドを、当技術分野において典型的に使用される場合により薬学的に許容される担体、賦形剤または安定剤（これらはすべて本明細書において「担体」と称する）、すなわち緩衝剤、安定化剤、保存剤、等張化剤、非イオン性洗剤、抗酸化剤および他の様々な添加剤と混合することにより凍結製剤または水性溶液として貯蔵するために調製することができる。Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版 (Osol編, 1980) を参照。このような添加剤は、使用する投与量および濃度において、対象に対して無毒でなければならない。

10

【0120】

緩衝剤は、生理学的に許容される条件に近い範囲にpHを維持するのに役立つ。それは、典型的には約2mMから約100mMの範囲の濃度で存在することができる。適切な緩衝剤には、有機酸および無機酸の両方、ならびにそれらの塩、例えば、クエン酸緩衝液（例えば、クエン酸－ナトリウム－クエン酸二ナトリウム混合物、クエン酸－クエン酸三ナトリウム混合物、クエン酸－クエン酸－ナトリウム混合物など）、コハク酸緩衝液（例えば、コハク酸－コハク酸－ナトリウム混合物、コハク酸－水酸化ナトリウム混合物、コハク酸－コハク酸二ナトリウム混合物など）、酒石酸緩衝液（例えば、酒石酸－酒石酸ナトリウム混合物、酒石酸－酒石酸カリウム混合物、酒石酸－水酸化ナトリウム混合物など）、フマル酸緩衝液（例えば、フマル酸－フマル酸－ナトリウム混合物、フマル酸－フマル酸二ナトリウム混合物、フマル酸－ナトリウム－フマル酸二ナトリウム混合物など）、グルコン酸緩衝液（グルコン酸－グリコン酸ナトリウム混合物、グルコン酸－水酸化ナトリウム混合物、グルコン酸－グルコン酸カリウム混合物など）、シュウ酸緩衝液（例えば、シュウ酸－シュウ酸ナトリウム混合物、シュウ酸－水酸化ナトリウム混合物、シュウ酸－シュウ酸カリウム混合物など）、乳酸緩衝液（乳酸－乳酸ナトリウム混合物、乳酸－水酸化ナトリウム混合物、乳酸－乳酸カリウム混合物など）、および酢酸緩衝液（酢酸－酢酸ナトリウム混合物、酢酸－水酸化ナトリウム混合物など）が含まれる。さらに、リン酸塩緩衝液、ヒスチジン緩衝液、Trisのようなトリメチルアミン塩を用いることができる。

20

【0121】

保存剤は、微生物の成長を遅らせるために添加することができ、典型的には0.2%～1% (w/v) の範囲の量で添加することができる。適切な保存剤としては、フェノール、ベンジルアルコール、メタクレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ベンザルコニウムハライド（例えば、塩化物、臭化物、ヨウ化物）、ヘキサメトニウムクロリド、およびメチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノールならびに3－ペンタノールが含まれる。

30

【0122】

浸透圧調節剤は、しばしば「安定剤」として知られており、液体組成物の薬学的に許容される浸透圧、好ましくは等張性を確保するために加えることができ、多価糖アルコール、好ましくは三価またはそれ以上の糖アルコール、例えばグリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトールおよびマンニット、ならびに塩化ナトリウムなどの無機塩が含まれる。安定剤は、増量剤から、治療薬を可溶化するか、または変性もしくは容器壁への付着の防止を助ける添加物までの機能に及ぶことができる賦形剤の広いカテゴリーを指す。典型的な安定剤は、多価糖アルコール（上に列挙された）；アミノ酸、例えばアルギニン、リジン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、オルニチン、L－ロイシン、2－フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニンなど、有機糖または糖アルコール、例えば乳糖、トレハロース、スタキオース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、リビトール、ミオイニシトール、ガラクトシトール、グリセロールおよび、イノシトールなどのシクリトールを含む同様のもの；ポリエチレング

40

50

リコール；アミノ酸ポリマー；硫黄含有還元剤、例えばグルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、 α -モノチオグリセロールおよびチオ硫酸ナトリウム；低分子量ポリペプチド（例えば、10残基またはそれ以下のペプチド）；タンパク質、例えばヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン、単糖類、例えばキシロース、マンノース、フルクトース、グルコース；二糖類、例えばラクトース、マルトース、スクロースおよび三糖類、例えばラフィノース；ならびに多糖類、例えばデキストランであることができる。安定剤は、本発明のポリペプチド1重量部あたり0.1~10,000重量部の範囲で存在することができる。非イオン性界面活性剤または洗剤（「湿潤剤」としても知られている）は、治療剤の可溶化を助けるだけでなく、治療タンパク質を攪拌誘発性凝集から保護するために添加することができ、これはまた、タンパク質の変性を引き起こすことなく製剤をせん断表面応力に曝すことを可能にする。適切な非イオン性界面活性剤には、ポリソルベート（20、80など）、ポリオキサマー（184、188など）、プルロニックポリオール、ポリオキシエチレンソルビタンモノエーテル（TWEEN^(R)-20、TWEEN^(R)-80など）が含まれる。非イオン性界面活性剤は、約0.05mg/ml~約1.0mg/mlの範囲、または約0.05mg/ml~約0.2mg/mlの範囲で存在することができる。

【0123】

追加の様々な賦形剤には、増量剤（例えば、デンプン）、キレート剤（例えば、EDTA）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メチオニン、ビタミンE）、および共溶媒が含まれる。

【0124】

凍結乾燥（Freeze-drying）または凍結乾燥（Lyophilization）は、それが現れる文脈によって特に明記されない限り、物質（すなわち、医薬有効成分および種々の製剤添加剤または「賦形剤」）の溶液を固体に変換する乾燥工程を示すために使用されるものとする。一般的な凍結乾燥工程は、3段階、「凍結」、「一次乾燥」および「二次乾燥」からなる。凍結段階では、ほぼ全ての含有水を氷に、溶質を固体（結晶または非晶質）に変換する。一次乾燥段階では、水分子（氷）と周囲の大気との間に良好な圧力勾配を維持することにより、直接昇華によって製品から氷を除去する。二次乾燥段階では、脱着により製品から残留水分を除去する。

【0125】

凍結乾燥組成物の濃度（w/v）が示される場合、それは凍結乾燥直前の体積のことである。

【0126】

特に明記しない限り、パーセントの用語は重量/重量パーセントを表し、温度は摂氏を表す。

【0127】

比率

以下に、より詳細に記載するように、本発明のポリペプチドは、単量体、二量体、またはそれらの混合物であってもよい。本発明によるいずれかのモル比は、実際にホモ二量体またはヘテロ二量体として存在するかどうかにかかわらず、本発明のポリペプチドの二量体のモル濃度の比率を指している。

【0128】

本出願におけるFVIIに対する本発明のポリペプチドのあらゆる比率は、特に明記しない限り、好ましくはヘテロ二量体として存在する、本発明のポリペプチドに含まれる二量体の量（モルで）をFVIIの量（モルで）で割ったものを指している。非限定的な例として、200 μ Mの単量体サブユニットからなる100 μ Mの本発明のヘテロ二量体ポリペプチドの、1 μ MのFVIIを含む合剤（co-formulation）は、100の比率を意味する。

【0129】

F V I I I に対する本発明のポリペプチドのモル比は、少なくとも 1、好ましくは少なくとも 2、より好ましくは少なくとも 4、または少なくとも 10、または少なくとも 20、または少なくとも 25、または少なくとも 50、または 50 より大きい、または少なくとも 100、または少なくとも 150、または少なくとも 200、または少なくとも 250、または少なくとも 300、または少なくとも 350、または少なくとも 400、または少なくとも 450、または少なくとも 500、または少なくとも 1,000、または少なくとも 1,500、または少なくとも 2,500、または少なくとも 4,000、または最大 5,000 であってもよい。F V I I I に対する本発明のポリペプチドのモル比は、特定の実施形態によれば、5,000 の比率、2,500 の比率、1,250 の比率、または 1,000 の比率を超えなくてもよい。

10

【0130】

F V I I I に対する本発明のポリペプチドのモル比は、約 1～5,000、または 2～2,500、または 4～2,000、または 10～1,500、または 25～1,000、または 50～500 の範囲であってよい。好ましくは、F V I I I に対する本発明のポリペプチドのモル比は、1～1,250、または 2～1,000、または 4～750、または 10～500 の範囲である。

【0131】

上記の比率は、併用処置の過程で投与される比率、または医薬組成物中の両有効成分の比率のことである。

【0132】

配列表に示されたヌクレオチドおよびアミノ酸配列を表 1 にまとめる。

20

【0133】

30

40

50

【表 1】

表 1 :

配列番号:	備考
1	クローニングベクター: pMARES-neo (MCS)
2	hygroR をコードする DNA 配列
3	D1D2D'D3-HSA-TER119scFv (ID 3260)のアミノ酸配列
4	D1D2D'D3-HSA-TER119scFv (ID 3260)をコードする DNA 配列
5	D1D2D'D3 8His-tag (ID 3748)のアミノ酸配列
6	D1D2D'D3 8His-tag (ID 3748)をコードする DNA 配列
7	D1D2D'D3(EYA)-HSA-TER119scFv (ID 3794)のアミノ酸配列
8	D1D2D'D3(EYA)-HSA-TER119scFv (ID 3794) をコードする DNA 配列
9	D1D2D'D3(EYA) 8His-tag (ID 3795)のアミノ酸配列
10	D1D2D'D3(EYA) 8His-tag (ID 3795) をコードする DNA 配列
11	フューリン(ID 863)のアミノ酸配列
12	フューリン(ID 863) をコードする DNA 配列
13	D1D2D'D3-HSA (CSL626) のアミノ酸配列
14	D1D2D'D3(EYA)-HSA (CSL629) のアミノ酸配列
15	分泌された rVIII-SingleChain (CSL627) のアミノ酸配列
16	抗 TER119 単鎖フラグメント可変のアミノ酸配列
17	ヒト天然 VWF のプレープロ形態をコードする DNA 配列
18	配列番号 17 によってコードされたアミノ酸配列
19	成熟型ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列
20	ヒト天然 FVIII のアミノ酸配列
21	WO 2014/135528 A1 に開示された IH4 と称する VHH ナノボディの アミノ酸配列
22	scFv 1C3 をコードする DNA 配列、ハイブリドーマ G26.4.1C3/86 [RAT 1C3/86] (ATCC® HB-9893™)から入手可能
23	配列番号 22 によってコードされたアミノ酸配列

【0134】

次に、本発明の特定の実施形態を、以下の実施例を参照して説明するが、これらは例示のみを目的とし、本明細書に記載された概念の範囲を限定することを意図するものではない。

【0135】

実施例

結果

D'D3-TER119二量体は *in vitro* でネズミRBCを架橋する。

【0136】

10

20

30

40

50

血友病Aの処置のために共投与されるFVIIの半減期を延長するために、組換えVWF D'D3アルブミン融合タンパク質(rD'D3-FP)を予め作成した(参考論文、A245)。本発明者らは、D'D3-FPとTER119scFv(TER119特異的単鎖Fv; マウスグリコフォリンAに対する特異性を有する抗体フラグメント)との融合体が、生体内原位置でその二重特異性によりFVIIをRBCにターゲッティングするメディエーターとして機能しうると考えた。TER119scFvと融合したrD'D3-FP(D'D3-FP-TER119scFv, 配列番号3)を、D'D3ドメインの効率的二量化に不可欠なVWFプロペプチド(D1D2)に沿って安定発現させた(図1)。CHO発現細胞株は、予想通りD'D3-FP-TER119scFvの単量体およびホモ二量体を分泌した(図2)。両種を別々に精製した。FVII(rVII-Single Chain, CSL Behring, Marburg, ドイツ)は、5 µg/ml FVIIの存在下で、D'D3-FP-TER119scFvの単量体およびホモ二量体の両方を滴下したRBCの表面上で実際に検出することができた。RBCはホモ二量体を用いたポリクロナル抗FVII-FITCによって効率的に染色されたが、単量体ではそうならなかった(データは示さず)。しかし、*in vitro*での生理的に適切な濃度(> 5 µg/ml)では、RBCは単量体ではなくホモ二量体を用いて目に見える凝集塊を形成することが観察された。驚くべきことに、単量体はヒトアルブミンに対する検出抗体の存在下でしかRBCを架橋しなかった(図3)。本発明者らは、この知見を、*in vivo*応用における潜在的な安全性のリスクと考えた。

【0137】

FVIIがD'D3二量体によって効率的に結合されるが、単量体のD'D3によって結合されないことは以前に実証されている。単量体D'D3は、D'D3二量体と比較して、その天然リガンド、FVIIに対する親和性が著しく低下している(WO2018/087271A1)。FVII-RBC相互作用は、*in vivo*でのシナリオにおいて内因的に循環するVWFによってさらに阻害されるであろう。本発明者らは、以前に、二量体D'D3-FPが、血漿中の内因性VWFのモル濃度と競合し、それを超える用量で投与された場合にしか、FVIIの半減期を延長しないことを実証している。D'D3単量体はFVIIに対する親和性が低いため、D'D3二量体よりもかなり高い用量で注射する必要があるであろう。したがって、単量体のD'D3-FP-TER119scFvの開発を通して架橋RBCの問題を克服することは、本発明者らの選択肢ではなかった。二重特異性分子のサブユニットとして二量体化D'D3が好ましかった。

【0138】

D'D3-TER119ヘテロ二量体は*in vitro*で架橋されることなくFVIIのマウスRBCへの結合を促進する。

【0139】

驚くべきことに、安定にトランスフェクトされた細胞株で共発現したD'D3-FP-TER119scFv(配列番号3)およびD'D3(アルブミンおよびTER119scFv融合パートナーなし、配列番号5)はヘテロ二量体として分泌され、ヒトアルブミンおよび非融合D'D3のc末端のタグに対する2回の親和性ステップを使用して精製できた(図4および図5)。同じ発現戦略を、「D'D3 EYA」またはCSL629(WO2017/117630A1、WO2017/117631A1; 配列番号14)として知られる、以前に公開されたD'D3_{WT}-FP-TER119scFv(配列番号7)およびD'D3_{WT}(配列番号9)の高親和性バリエーションを用いて適用した。図6は、D'D3-FP-TER119scFvが、野生型(WT)および高親和性バリエーション(EYA)の両方として、*in vitro*でマウスRBCへのヒトFVIIの結合を濃度依存的な様式で促進することを示している。簡潔に説明すると、一定濃度のrVII-Single Chain(12.5 IU/ml、約6 nM、CSL Behring Marburg)を、精製した両ヘテロ二量体構築物、D'D3_{WT}-TER119およびD'D3_{WT}-FP-TER119の濃度を増加させてインキュベートした後、1:100希釈された新鮮血からの洗浄マウスRBCを加え、分析した。マウスRBC表面のFVIIは、ポリク

10

20

30

40

50

ローナル抗ヒトFVIIIFITC標識抗体によって特異的に検出された。重要なことは、D'D3-TER119ヘテロ二量体の二重特異性であるが一価のデザインは、マウスRBCの凝集または架橋を、可視的にもSSC/FSC（単一細胞）分析に基づいても示さなかった。ヒト血漿由来のVWF（12.5IU/ml、約250nM、CSL Behring、Marburg）を、示したとおり添加した。このように、血漿単位の定義に従って、FVIIIFITCとVWFのモル比は1対35であり、生理学的に適切であると仮定された。D'D3-TER119ヘテロ二量体構築物を滴定しながら、FVIIIFITCおよびVWFの等しく固定された標準血漿単位濃度（12.5IU/ml）を選択し、D'D3-TER119および内因性VWFの両者の共通リガンド、FVIIIFITCに対する競合を*in vitro*でシミュレートした。興味深いことに、D'D3_{WT}-TER119を用いるとVWFはマウスRBCへのFVIIIFITC結合を阻害するが、D'D3_{EYA}-TER119では阻害しなかった。それは、ヒトVWFおよびD'D3_{WT}-TER119は、そのFVIIIFITC結合サブユニット、D'D3の同じアミノ酸配列を有しているため、FVIIIFITCに対する親和性が等しいためである（WO2017/117630A1、WO2017/117631A1）。D'D3_{WT}-TER119は、ヒトVWFの存在下でマウスRBCに対するFVIIIFITCの結合を促進しない場合、D'D3_{EYA}-TER119は、VWFのものよりも低いモル数であってもFVIIIFITCをターゲティングすることが可能である。この観察は、FVIIIFITCに対する野生型D'D3-FP（CSL626）またはVWFと比較して、D'D3（EYA）-FP（CSL629）バリエーションの30倍高い親和性により説明できる（WO2017/117630A1、WO2017/117631A1）。

【0140】

【表2】

表2

D'D3EYA-TER119滴定におけるマウスRBCへのFVIIIFITC結合の

KM計算値 ミカエリスメンテン動態

構築物	バッチ	<i>in vitro</i> 試験 (a)		<i>in vitro</i> 試験 (b)	
			+ VWF		+ VWF
D'D3 _{EYA} -TER119	#1	17.8 nM ± 0.5%	32.4 nM ± 0.7%	3.7 nM ± 5.7%	3.6 nM ± 0.2%
	#2			9.3 nM ± 8.3%	9.9 nM ± 2.0%
D'D3 _{WT} -TER119		77.6 nM ± 1.2%	n/a		

【0141】

D'D3EYA-TER119に結合したFVIIIFITCのマウスRBCに対する結合動態の見かけのKMは、ミカエリスメンテン動態を仮定して計算した（図6B）。2つの独立した*in vitro*実験のKM計算値の要約を、表2に提供する。*in vitro*実験の1つは、VWFを加えなかったデータ（17.8nM ± 0.5%）と比較して、VWFの存在がD'D3_{EYA}-TER119を用いたRBCへのFVIIIFITC結合のKM（32.4nM ± 0.7%）を増加させることを示唆した。この観察では、定性的な傾向が見られることは確認されなかった（図6A）。さらに、2つのバッチのD'D3_{EYA}-TER119を用いて実験を繰り返したところ、VWF非存在下でも、または存在下でもKMに有意差は見られなかった（3.7nM ± 5.7%および3.6nM ± 0.2%）。D'D3_{EYA}-TER119の第2バッチは、VWF有りまたはなしの両方において、第1バッチの材料と比較してKMが増加した（9.3nM ± 8.3%および9.9nM ± 2.0%）ことが観察された。しかし、滴定曲線（102nMまで）の傾向は、その観察を表してい

なかった。

【0142】

D' D₃W_T-TER119の滴定は、VWF無しのD' D₃Y_A-TER119のKMと比較して増加したKM(25.6 nM±4%)を示すが、再び図6Aの傾向は、この観察を反映していない。興味深いことに、VWF有りのD' D₃Y_A-TER119は既に最大結合を示す場合、RBC上のFVII結合はD' D₃W_T-TER119の高濃度(4~12.5 nM)においてのみ弱く検出され、VWF有りのD' D₃W_T-TER119のKMは算出することができなかった。これらの*in vitro*実験では、共通の結合パートナーFVIIに対してD' D₃-TER119バリエーションと競合する約250 nMの固定過剰モルVWF濃度を使用したため、本発明者らのフローサイトメトリ結合研究は、二重特異性ヘテロ二量体の高親和性バリエーション、D' D₃Y_A-TER119を用いてRBCにFVIIをターゲティングすることの有益な効果を明確に示した。

10

【0143】

D' D₃-TER119ヘテロ二量体で処置されたFVII k.o.マウスにおけるFVII抗体の低減

rFVIIの週1回の投与は、抗薬物抗体(ADA)形成をもたらすことが知られており、典型的には、FVII k.o.マウスにおける阻害抗体(ベセスダ単位で測定)であることが示されている。この実施例では、rFVII、rVII-Single Chainに対するADAの発生におけるD' D₃Y_A-TER119ヘテロ二量体の効果を、非赤血球結合対照、D' D₃(EYA)-FPと比較して調べた。

20

【0144】

リコンビナントFVII(rVII-Single Chain、200 IU/kg、約16 µg/kg)を、CSL629として以前に発表されたD' D₃(EYA)-FP(CSL629)100 µg/mlと共に共投与すると、*in vivo*で注入されたFVIIの半減期が延長されることが報告された(WO2018/087271A1)。作用機序の1つの説明として、FVIIとその高親和性シャペロン、D' D₃(EYA)-FP(CSL629)とのモル比が少なくとも1対4であれば、注入されたFVII分子の大半を循環中に取り込むのに十分であったことが議論されている。したがって、注入されたFVIIのごく一部が内因性VWFに結合し、CSL629には結合しなかったが、これによって出血モデルにおけるFVII k.o.マウスを依然として救うことができることが示された(データは示さず)。本発明者らは、同じモル比(1対4)であるが、約10倍多い投与量を*in vivo*で適用してFVIIに対する寛容を誘導した。初期投与レジメンについては、アナフィラキシーを回避するために、ヒト異種タンパク質を1 mg/kg未満で注射することも考えた。

30

【0145】

rVII-Single Chain(2000 IU/kg)をD' D₃Y_A-TER119ヘテロ二量体(840 µg/kg)と共にまたはなしで、0、7、14、21および28日目に、n=10のFVII k.o.マウス/群に投与すると(図7参照)、抗FVII-ADAおよびFVII活性を中和する阻害抗体の生成が誘導された。抗FVII ADA値は、減衰の和として与えられ、個々の値および平均±SDとして示される(図8A)。2000 IU/kgの用量のrVII-Single ChainをFVII k.o.マウスに単独投与すると、35日目に6.61±1.14のADAの生成が誘導された。D' D₃EYA-TER119ヘテロ二量体を840 µg/kgの用量で2種類のバッチを使用して共投与すると、減衰の和は2.88±1.04(バッチ1)および3.04±0.82(バッチ2)に有意に減少した。2つの共投与D' D₃Y_A-TER119ヘテロ二量体バッチ間に有意差はなかった(図8A)。

40

【0146】

FVIIに対する生成されたADAは、それぞれ個々の動物および平均±SD(図8B)についてプロットするとわかるように、ベセスダ単位で定量化され、概ね同じ応答を示す阻害性であることが示された。さらに、各個体のADA値(減衰の和)をベセスダ単

50

位で定量化した阻害電位と比較し、すべての値にわたって線形回帰を計算し、0.55の r^2 値を得た（図8C）、それによって抗FVIIIIのADA減衰の和とベセスダ単位として測定したその阻害電位との直接相関が支持された。

【0147】

結論として、2つの独立したバッチのD'D3EYA-TER119ヘテロ二量体は、FVIIII k.o. マウスのrVIIII-SingleChainの免疫原性を低下させた。

【0148】

D'D3EYA-TER119はFVIIII k.o. マウスのFVIIIIに対する長期寛容を誘導する。

【0149】

また、本発明者らは、D'D3EYA-TER119ヘテロ二量体がFVIIIIに対する長期寛容の誘導に有効かどうかに関心があった。そこで、FVIIIIノックアウトマウスに、1700IU/kg FVIIII (AFSTYLA^(R)), 約136μg/kg CSL Behring, Marburg, ドイツ)を、D3EYA-TER119 (672μg/kg, FVIIIIと比べて約4倍のモル過剰)と共にまたはなしで、1週間に1回、4週間静脈内に注射(i.v.)した。4回目の注射の1週間後に中間出血を行い、ELISAによって血漿を抗FVIIII抗体について分析した。さらに4週間後、マウスにFVIIII単独(120IU/kg, i.v.)を2週間注射して再チャレンジさせた。FVIIIIの最後の注射の7日後に、終末血漿の採取のためマウスを安楽死させて、ELISAによって血漿を抗FVIIII抗体について分析した。驚くべきことに、D'D3EYA-TER119ヘテロ二量体をFVIIIIと組み合わせて投与すると、FVIIIIに対する抗体形成が著しく低下し、再チャレンジ後も抗FVIIII抗体レベルが有意に上昇することとはなかった。

【0150】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3

F V I I I k. o. マウスにおける血漿中F V I I I レベルのPKパラメータ

FVIII ko マウスの 血漿 FVIII レベル の PK パラメータ	CSL627 200 IU/kg		CSL627 200 IU/kg + rD'D3-FP(EYA) 0.1 mg/kg		CSL627 200 IU/kg + rD'D3-FP(EYA)-FP- ter119 (ヘテロ二量体) 84 µg/kg	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
AUC _{inf} (h*IU/mL)	53.5	0.5	112.2	13.1	30.2	5.3
AUC _{last} (h*IU/mL)	52.0	0.5	110.6	13.1	25.5	3.8
%外挿(extrapol)	2.9	0.2	1.4	0.6	15.7	8.2
クリアランス (mL/kg/h)	3.7	<0.1	1.8	0.2	6.6	4.1
MRT (h)	13.5	0.2	22.5	2.0	50.8	16.3
半減期(h)	9.4	0.2	15.6	1.6	37.4	13.2
V _c (mL/kg)	50.6	1.2	40.1	9.7	270.8	27.5
V _{ss} (mL/kg)	50.6	1.2	40.1	7.1	336.6	86.6
V _z (mL/kg)	50.6	1.2	40.1	8.7	357.7	111.3
C _{max} (IU/mL)	4.0	<0.1	5.0	<0.1	0.7	<0.1
IVR (%)	79.1	<0.1	99.7	<0.1	14.8	<0.1

【 0 1 5 1 】

【表 4】

表 4

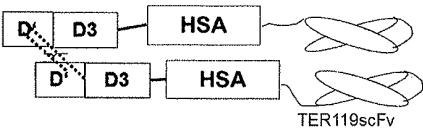
F V I I I k. o. マウスにおけるペレット中のF V I I I レベルの
PKパラメータ

	CSL627 200 IU/kg		CSL627 200 IU/kg + rD'D3-FP(EYA) 0.1 mg/kg		CSL627 200 IU/kg + rD'D3-FP(EYA)-FP- ter119 (ヘテロ二量体) 84 µg/kg	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
AUC _{inf} (h*IU/mL)	43.2	5.6	67.1	15.5	109.1	9.3
AUC _{last} (h*IU/mL)	32.0	4.2	14.3	0.5	98.4	7.4
%外挿(extrapol)	25.8	7.6	78.7	13.8	9.9	2.3
クリアランス (mL/kg/h)	4.6	3.0	3.0	1.9	1.8	0.2
MRT (h)	52.9	13.9	357.2	99.9	41.4	4.1
半減期(h)	39.4	11.5	259.4	72.1	28.7	2.9
V _c (mL/kg)	184.8	81.9	386.0	82.1	75.9	7.8
V _{ss} (mL/kg)	245.1	54.9	1064.1	148.7	75.9	6.9
V _z (mL/kg)	263.1	61.9	1114.7	155.2	75.9	7.2
C _{max} (IU/mL)	1.1	0.0	0.5	0.0	2.6	0.0
IVR (%)	21.6	0.0	10.1	0.0	52.7	0.0

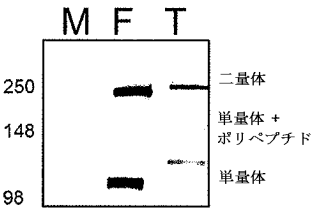
na = 該当なし

【図面】

【図 1】

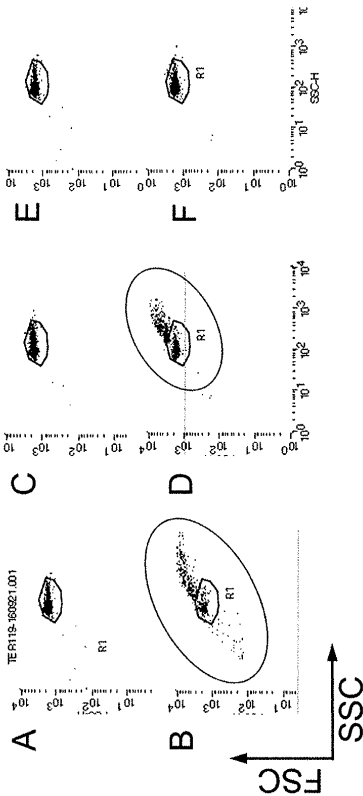


【図 2】



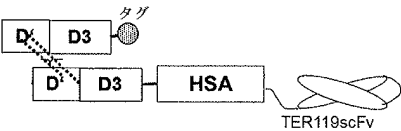
10

【図 3】



20

【図 4】

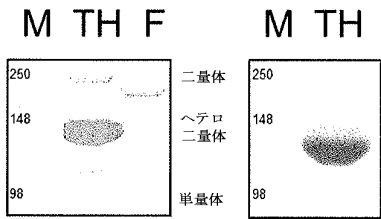


30

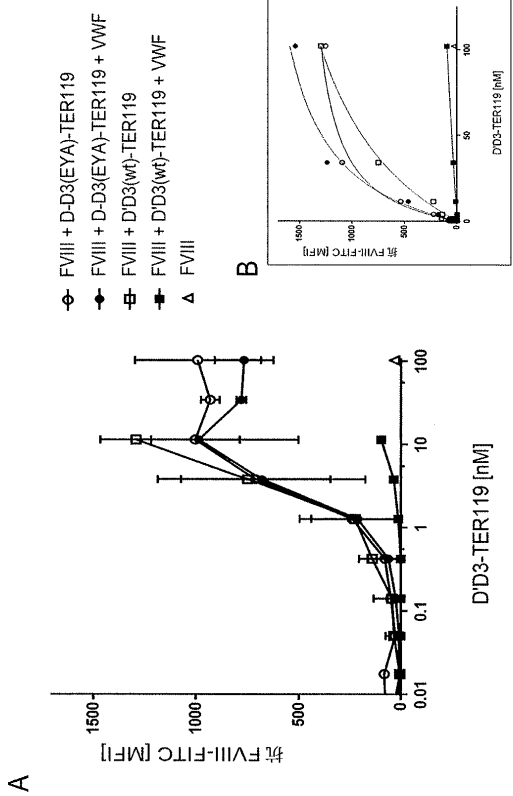
40

50

【図 5】



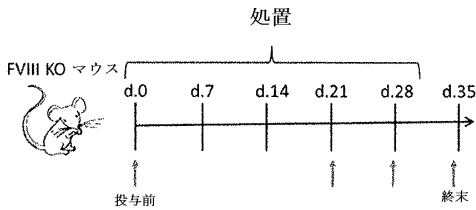
【図 6】



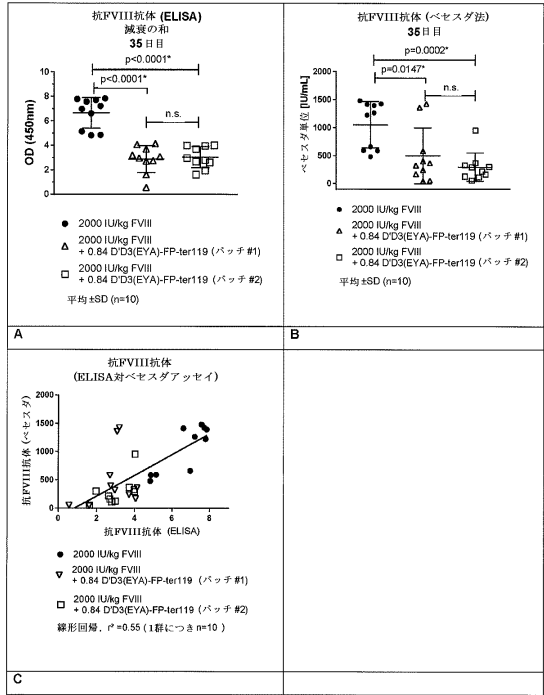
10

20

【図 7】



【図 8】

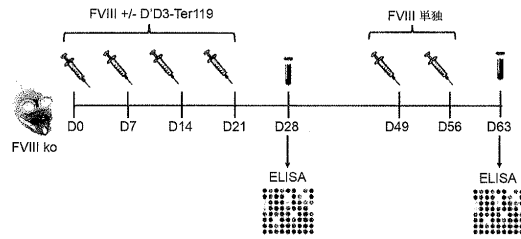


30

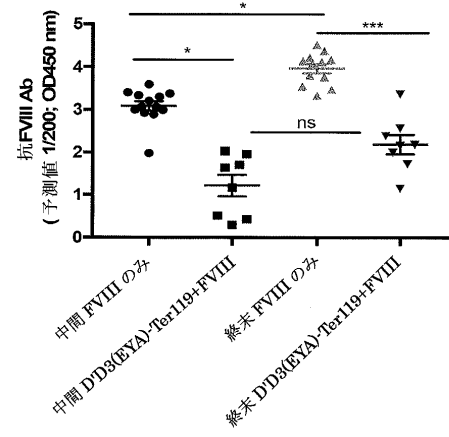
40

50

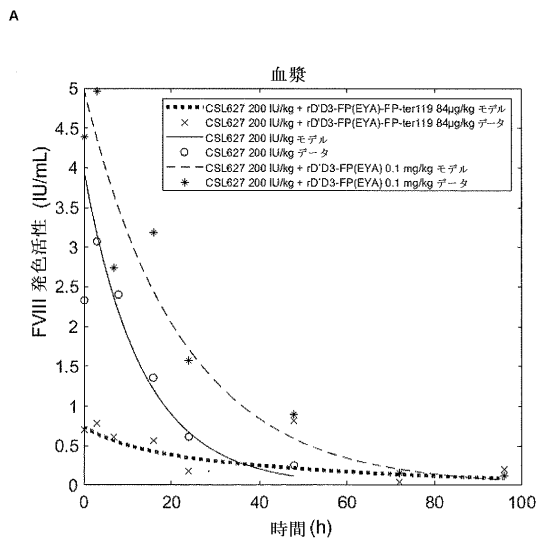
【図 9】



【図 10】

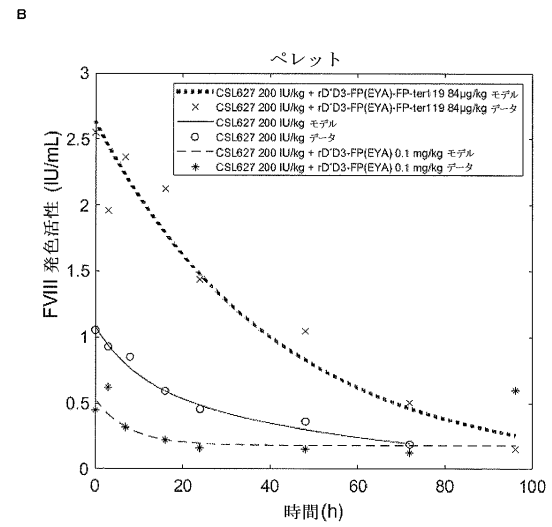


【図 11-1】



【図 11-2】

(続き)



【配列表】

0007680442000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

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	5/10	
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 K	38/37 (2006.01)	A 6 1 K	38/37	

ト 1 1 0 6 / 6 0 4

(72)発明者

インゲラ・ヴィクストレーム

オーストラリア国ビクトリア州 3 0 7 2 . プレストン . ローブソン・ストリート 5 7

(72)発明者

トーマス・ヴァイマー

ドイツ連邦共和国 3 5 0 7 5 グラーデンバッハ . リヒャルト・ヴァーグナー・シュトラッセ 8

審査官

白井 美香保

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 8 / 2 3 4 5 1 8 (WO, A 1)

特表 2 0 1 3 - 5 4 1 5 0 4 (JP, A)

国際公開第 2 0 1 8 / 0 9 3 7 6 6 (WO, A 1)

特表 2 0 1 7 - 5 2 1 0 7 0 (JP, A)

特表 2 0 1 8 - 5 1 0 2 1 2 (JP, A)

Scientific Reports, 2018年, Vol.8, Article No.10945, p.1-15

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

Pubmed

UniProt / GeneSeq

C i N i i

CAPLUS / BIOSIS / MEDLINE / EMBASE (STN)