

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7626514号
(P7626514)

(45)発行日 令和7年2月7日(2025.2.7)

(24)登録日 令和7年1月27日(2025.1.27)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z Z N A
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 K	38/36 (2006.01)	A 6 1 K	38/36	
A 6 1 K	38/37 (2006.01)	A 6 1 K	38/37	
A 6 1 K	38/55 (2006.01)	A 6 1 K	38/55	
請求項の数 43 (全45頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2018-561024(P2018-561024)	(73)特許権者	500050402	
(86)(22)出願日	平成29年4月26日(2017.4.26)		オクタファルマ アクチェン ゲゼルシャ フト	
(65)公表番号	特表2019-522962(P2019-522962 A)		スイス、ラッヘン ツェーハー - 8 8 5 3、ザイデンシュトラッセ 2	
(43)公表日	令和1年8月22日(2019.8.22)	(74)代理人	110000109	
(86)国際出願番号	PCT/EP2017/059976		弁理士法人特許事務所サイクス	
(87)国際公開番号	WO2017/198435	(72)発明者	カンニヒト クリストフ	
(87)国際公開日	平成29年11月23日(2017.11.23)		ドイツ連邦共和国 1 0 9 6 7 ベルリン	
審査請求日	令和2年3月12日(2020.3.12)	(72)発明者	ディーフェンバッハシュトラッセ 3 3	
審判番号	不服2022-19973(P2022-19973/J 1)	(72)発明者	ゾレッカ ヴィテュルスカ パルバラ	
審判請求日	令和4年12月9日(2022.12.9)		ドイツ連邦共和国 1 2 1 6 7 ベルリン	
(31)優先権主張番号	16170690.8	(72)発明者	バイメシュトラッセ 1 3	
(32)優先日	平成28年5月20日(2016.5.20)	(72)発明者	ヴィンゲ ステファン	
(33)優先権主張国・地域又は機関			スウェーデン 1 2 0 5 0 オールスタ	
最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 改善された薬物動態を有する、グリコシル化VWF融合タンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

メインプロテイン(main protein)と少なくとも2つのコピーの延長ペプチド(extension peptides)を含む融合タンパク質であって、メインプロテインのアミノ酸配列が、ヒト血液タンパク質またはその断片のアミノ酸配列を有し、および前記延長ペプチドが、少なくとも3つのO-グリコシル化アミノ酸を含むO-グリコシル化アミノ酸のクラスター(cluster)を含み且つ配列番号1に対して、少なくとも90%の配列同一性を有し、並びに融合タンパク質が、延長ペプチドのないメインプロテインと比較して、増加した半減期を有する、融合タンパク質。

【請求項2】

メインプロテインと少なくとも2つのコピーの延長ペプチドを含む融合タンパク質であって、メインプロテインのアミノ酸配列が、VWF(配列番号2)およびFVIIII(配列番号13)から選択されるヒト血液タンパク質またはその断片のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%の配列同一性を有し、前記延長ペプチドが少なくとも3つのO-グリコシル化アミノ酸を含むO-グリコシル化アミノ酸のクラスターを含み且つ配列番号1に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、並びに

10

融合タンパク質が延長ペプチドを有さないメインプロテインと比較して増加した半減期を有する、融合タンパク質。

【請求項 3】

延長ペプチドの、O - グリコシル化アミノ酸のクラスターが、少なくとも 4 つの O - グリコシル化されたアミノ酸を含有する、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

O - グリコシル化部位のクラスターが、スレオニンとセリンの両方を、O - グリコシル化アミノ酸として含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

一つ以上の延長ペプチドが、配列番号 1 に対して、少なくとも 95 % の配列同一性を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 6】

延長ペプチドが、メインプロテインの C 末端に直接的または間接的に融合している、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

延長ペプチドが、融合タンパク質の C 末端を形成する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

前記延長ペプチドの C 末端のアミノ酸が、親和性タグ融合ペプチドに結合している、請求項 6 または 7 に記載の融合タンパク質。

20

【請求項 9】

メインプロテインが、O - グリコシル化アミノ酸の少なくとも 1 つのクラスターを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

メインプロテインが二量体化ドメインを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

ヒト血液タンパク質が、凝固因子またはプロテアーゼ阻害剤である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 12】

ヒト血液タンパク質が、VWF、プロトロンビン、フィブリノーゲン、FII、FV、FVII、FVIII、FIX、FX、FXI、FXII、FXIII、ADAMTS13、アンチトロンビン、α-1 抗トリプシン、C1-インヒビター、抗キモトリプシン、PAI-1、PAI-3、2-マクログロブリン、TFPI、ヘパリン補因子IIプロテインZ、プロテインCおよびプロテインSからなる群から選択される、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 13】

メインプロテインが、配列番号 2 のアミノ酸 764 ~ 1268 に対して、少なくとも 90 % の配列同一性を有する、請求項 2 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 14】

メインプロテインが、配列番号 2 のアミノ酸 764 ~ 1268 に対して、少なくとも 98 % の配列同一性を有する、請求項 2 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 15】

融合タンパク質が、メインプロテインと比較して、少なくとも 4 の追加の O - グリカンを含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

融合タンパク質が、メインプロテインと比較して、少なくとも 8 の追加の O - グリカンを含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 17】

融合タンパク質のアミノ酸配列が、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6

50

、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 14 または配列番号 21 から選択される配列に対して、少なくとも 90% の同一性を有する、請求項 2 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 18】

融合タンパク質のアミノ酸配列が、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 14 または配列番号 21 から選択される配列に対して、少なくとも 95% を有する、請求項 2 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 19】

融合タンパク質が、哺乳動物細胞株における発現によって産生される、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 20】

哺乳動物細胞株が、ヒト細胞株である、請求項 19 に記載の融合タンパク質。

【請求項 21】

ヒト細胞株が、HEK293 細胞株である、請求項 20 に記載の融合タンパク質。

【請求項 22】

第 1 のタンパク質および第 2 のタンパク質の組成物であって、前記第 1 のタンパク質が、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質であり、および前記第 2 のタンパク質に結合することが可能であり、および前記第 2 のタンパク質が、第 2 のヒト血液タンパク質またはその断片のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む治療タンパク質である、組成物。

20

【請求項 23】

第 1 のタンパク質に結合された第 2 のタンパク質の半減期が、前記第 2 のタンパク質の遊離の形態と比較して増加し、および/または、第 1 のタンパク質に結合された第 2 のタンパク質の半減期が、天然のヒト血液タンパク質または融合ペプチドのないメインプロテインに結合した前記第 2 のタンパク質と比較して、増加する、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

第 2 のタンパク質に対する第 1 のタンパク質のモル比が、0.5 ~ 50 の範囲である、請求項 22 または 23 に記載の組成物。

【請求項 25】

モル比が、2 ~ 10 の範囲である、請求項 24 に記載の組成物。

30

【請求項 26】

第 2 のタンパク質に対する第 1 のタンパク質の結合親和性が、0.05 ~ 3 nM の範囲である、請求項 22 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 27】

第 2 のタンパク質が、凝固因子である、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

第 2 のタンパク質が、
全長 FVII、
少なくとも、B ドメインの一部が欠落している、FVII タンパク質、および
少なくとも、B ドメインの一部が、延長ペプチドで置換されている、FVII タンパク質
から選択される、FVII タンパク質であり、
延長ペプチドは、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載されている、請求項 22 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【請求項 29】

一つ以上の延長ペプチドが、第 1 のタンパク質が第 2 のタンパク質に結合するのを妨害しない、第 1 のタンパク質の折りたたまれた状態の位置に位置する、請求項 22 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 30】

50

第 1 のタンパク質と第 2 のタンパク質のコンプレックスであって、

前記第 1 のタンパク質が、請求項 1 ~ 2.1 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質であり、および

前記第 2 のタンパク質は、第 2 のヒト血液タンパク質またはその断片のアミノ酸配列を有する、コンプレックス。

【請求項 3 1】

第 1 のタンパク質が、第 2 のタンパク質に非共有結合で結合された、請求項 3.0 に記載のコンプレックス。

【請求項 3 2】

2 つのコピーの第 1 のタンパク質および 2 つのコピーの第 2 のタンパク質を含み、2 つのコピーの第 1 のタンパク質が二量体を形成する、請求項 3.0 または 3.1 に記載のコンプレックス。

10

【請求項 3 3】

第 1 のタンパク質が、第 2 のタンパク質に共有結合している、請求項 3.2 に記載のコンプレックスであって、リンカーが、ペプチド結合、化学的リンカー、またはグリコシド結合から選択される、コンプレックス。

【請求項 3 4】

請求項 1 ~ 2.1 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 3 5】

請求項 1.7 に記載されたアミノ酸配列を有する融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

20

【請求項 3 6】

ベクターのバックボーンが、pCDNA3、pCDNA3.1、pCDNA4、pCDNA5、pCDNA6、pCEP4、pCEP-puro、pCET1019、pCMV、pEF1、pEF4、pEF5、pEF6、pExchange、pEXPR、および pIRES から選択される、請求項 3.4 または 3.5 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 3 7】

宿主細胞がヒト細胞である、請求項 3.4 または 3.5 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 3.6 に記載のベクターを含む宿主細胞。

30

【請求項 3 8】

宿主細胞がヒト胚性腎臓細胞株である、請求項 3.7 に記載の宿主細胞。

【請求項 3 9】

ヒト胚性腎臓細胞株が HEK293 細胞株である、請求項 3.8 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 0】

融合タンパク質が、第 2 のタンパク質に結合することができる、第 2 のタンパク質の半減期を増加させるための、請求項 1 ~ 2.1 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質のインビトロでの使用。

【請求項 4 1】

請求項 1 ~ 2.1 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、

40

請求項 2.2 ~ 2.9 のいずれか 1 項に記載の組成物、または請求項 3.0 ~ 3.3 のいずれか 1 項に記載のコンプレックスを含む、出血障害の治療または阻止における使用のための、医薬組成物。

【請求項 4 2】

請求項 4.1 に記載の使用のための医薬組成物であって、出血障害が、PUP (未治療の患者: Previously Untreated Patients) の血友病の治療または ITI (免疫寛容導入療法: immune tolerance induction) の治療および / または関連する出血障害から選択される、医薬組成物。

【請求項 4 3】

50

使用が、静脈内または皮下注射を含む、請求項 4_1 または 4_2 に記載の使用のための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質、特に、フォン・ウィルブランド因子 (VWF) および第 V I I I 因子 (F V I I I) のようなヒト凝固因子の半減期 (h a l f - l i f e) の延長 (h a l f - l i f e p r o l o n g a t i o n) に関する。

【0002】

(発明の背景)

血友病 (Hemophilia) は、血液の凝固 (c l o t t i n g) または凝固 (c o a g u l a t i o n) を制御する身体的能力を損なう遺伝性遺伝子病 (h e r e d i t a r y g e n e t i c d i s o r d e r s) の一群である。その最も一般的な形態である、血友病 A では、凝固因子 V I I I (F V I I I) が不足している。血友病 A は、5, 000 ~ 10, 000 人の男性の出生の約 1 人に発生する。F V I I I タンパク質は、多機能性を有する血液凝固における必須の補因子である。

F V I I I の欠乏は、F V I I I の血漿由来濃縮物または組換え生産された F V I I I で治療することができる。

F V I I I の濃縮物での処置は、血友病患者の正常化した寿命をもたらす。

血友病 A の患者は、必要に応じて、または週に数回投与される予防的治療として、F V I I I で治療される。予防的治療のために、F V I I I の、15 - 25 IU / k g 体重を、週 3 回投与する。それは、F V I I I の一定の必要性、および、ヒトでは、たった約 11 時間である、血液系におけるその短い半減期 (h a l f - l i f e) のために必須である (E w e n s t e i n ら、2004 年)。

血液中では、正常状態では、F V I I I 分子は、常に、その補因子であるフォン・ビルブランド因子 (VWF) に関連しており、分解の様々な異なる形態から、F V I I I 分子を安定化する。

F V I I I と VWF の非共有結合複合体は、0.2 ~ 0.3 nM と高い結合親和性を有する (V l o t ら、1996 年)。

歴史的に、血友病 A は、ヒト血漿に由来する F V I I I で治療されてきた。しかし、1990 年代以降、組換え生産された異なる F V I I I タンパク質が市販された。しかし、プラズマ由来も、組換え生産された F V I I I タンパク質も、最適な薬物動態学的特性を持っていない。

他の多くの治療的タンパク質と同様に、それらは、ペプチダーゼによって代謝回転 (t u r n o v e r) に付され、それらの i n v i v o での半減期 (h a l f - l i f e) を有意に制限する。

T i e d e ら、によって検討されたように (2015)、F V I I I の半減期 (h a l f - l i f e) を延長させる試みは、Fc 融合 (E l o c t a t e、E l o c t a、e f m o r c t o c o g a l f a)、ポリエチレングリコールの付加 (t u r o c t o c o g a l f a p e g o l [N8 - G P]、B A Y 94 - 9027、B A X 855) および短鎖の構築 (c o n s t r u c t) (C S L 627) を含む。

これらの技術は全て、F V I I I 分子を変化させ、そして、およそ 1.5 倍に半減期 (h a l f - l i f e) の延長された F V I I I を齎す。

【0003】

F V I I I のさらなる半減期 (h a l f - l i f e) の延長は、VWF 半減期 (h a l f - l i f e) に限定される。

Y e e らによって示されているように、ヒト VWF D`D3 ドメインは、血漿中の F V I I I を安定化するのに十分である。

しかし、D`D3 - Fc 融合タンパク質は、VWF - / - マウスでのみ、F V I I I の半減期 (h a l f - l i f e) を延長することができる。

10

20

30

40

50

血友病Aのマウスにおいて、タンパク質断片の、F V I I I 結合に対する、内因性VWFとの、十分でない競争のために、D`D3 - Fcの構築物は(D`D3 - Fc construct)、F V I I Iの半減期(half-life)の延長を齎さない。

【0004】

WO2014/011819A2は、VWFのD`D3ドメイン、IgGのFcドメインおよびXTENを含む、F V I I I 構築物(D`D3 - Fc construct)の半減期(half-life)の延長の成功を報告する。

この構築物は、内因性VWFに結合しないので、同じ半減期(half-life)の延長の効果は、VWF/F V I I I - ダブルノックアウト(DKO)および血友病Aマウスの両方に見られる。しかしながら、インビトロでは、完全に機能的であるが、生体内では、著しく低下した活性を示す。

10

【0005】

治療用タンパク質の半減期(half-life)を高めるための他のアプローチは、治療用タンパク質を、トランスフェリンおよびアルブミンのような、自然に長い半減期(half-life)を有するタンパク質に、または、絨毛性ゴナドトロピン(CG)のC末端ペプチド(CTP)などのタンパク質ドメインに、遺伝子融合することが含まれる。

CGは、黄体形成ホルモン(luteinizing hormone, LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、および甲状腺刺激ホルモン(TSH)を含む糖タンパク質ホルモンファミリーに属する。

これらの糖ホルモン(glycohormones)は、ヘテロ二量体(heterodimeric)であり、そして、共通の α -サブユニットと、様々な活性を与える、ユニークな β -サブユニットからなる。

20

ヒトCG(hCG)の半減期(half-life)は、そのカウンターパートである、LH、FSHおよびTSHの半減期(half-life)よりも、かなり長い。

hCG- β の、O-グリコシル化CTPが、この半減期(half-life)の延長に關与することが示された。

【0006】

CTPは、4つのO-グリコシル化部位(S^* で示される)を有する配列FQSSSS* $KAPPPS^*LPSPS^*RLPGPS^*DTPILPQ$ 、と記載されている(Birkenら、1977年)。

30

Strohlら(2015年)に概説されているように、治療用タンパク質とCTPの異なる融合タンパク質が開発され、そして、現在臨床試験中である。治療用タンパク質には、FSH(Elonva(登録商標))、F V I I a、F I X、I F N - β そしてオキシントモジュリンを含む。

【0007】

発明の概要

本発明は、とりわけ、O-グリコシル化(glycosylated)アミノ酸(全長のヒトVWFに存在する)のクラスターを、VWFの断片に追加することによって、その半減期(half-life)の大幅な増加につながることを見出したことに基づく。

融合タンパク質の半減期(half-life)は、追加のO-グリカンクラスターを含まない、VWF断片と比較して、延長される。

40

このように、第一の態様によれば、本発明は、メインプロテイン(main protein)および少なくとも1つの延長ペプチドを含む融合タンパク質に関し、ここで、メインプロテイン(main protein)のアミノ酸配列は、VWFのような哺乳動物のタンパク質、またはその断片のアミノ酸配列に同一または類似であり、そして、前記延長ペプチドは、O-グリコシル化アミノ酸のクラスターを含む。

興味深いことに、VWFの断片に添加した、O-グリコシル化アミノ酸のクラスターを含む延長ペプチド(extension peptide)は、正にこのタンパク質、すなわちVWFに由来する。したがって、本出願人は、タンパク質の半減期(half-life)を延長するための一般原則を特定した。この一般原則は、タンパク質のO-グリ

50

コシル化アミノ酸の内因性クラスターを前記タンパク質またはその断片に付加することである。

従って、第1の局面における、融合タンパク質の好ましい実施形態によれば、1つまたはそれ以上の延長ペプチド (extension peptide) のアミノ酸配列は、前記哺乳類タンパク質またはその断片、特に前記メインプロテイン (main protein) の非反復アミノ酸配列部分と同一または類似である。

発明者の知見からのさらなる結論は、配列番号1によって、特定されたVWFのO-グリコシル化アミノ酸のクラスターは、半減期 (half-life) 延長ペプチドとして有用である、ということである。

【0008】

10

第1の態様のさらなる好ましい実施形態によれば、半減期 (half-life) の延長特性は、VWFに限定されていないので、1つまたはそれ以上の延長ペプチド (extension peptide) は、VWFのO-グリコシル化ペプチド、特に、配列番号1のペプチドに、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも100%の配列同一性を有する。

【0009】

第2の態様において、本発明は、第1の態様による融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。

【0010】

第3の態様によれば、本発明は、第2の態様による、ポリヌクレオチドを含有するベクターに関する。

20

【0011】

第4の態様によれば、本発明は、第2の態様による、ポリヌクレオチド、または、第3の態様によるベクターを含有する宿主細胞に関する。ここで、宿主細胞は、哺乳動物細胞である。

本発明者らは、VWFの半減期 (half-life) が増加するだけでなく、その結合パートナーである、FVIIの半減期 (half-life) も増加することを見出した。

【0012】

このように、第5の態様では、本発明は、第2のタンパク質の半減期を増加させるための第1の態様の融合タンパク質の使用に関する。ここで、融合タンパク質は、前記第2のタンパク質に結合可能である。

30

したがって、融合タンパク質および第2のタンパク質の、得られたコンプレックスまたは組成物において、第2のタンパク質もまた、増加した半減期 (half-life) を有する。

【0013】

したがって、第6の態様では、本発明は、第1のタンパク質と第2のタンパク質との組成物に関し、ここで、前記第1のタンパク質は、第1の態様による融合タンパク質であり、そして、前記第2のタンパク質に結合することができ、そして、前記第2のタンパク質は、第2の哺乳動物のタンパク質またはその断片のアミノ酸配列と同一または類似である、アミノ酸配列を含む、治療用のタンパク質である。

40

【0014】

そして、第7の態様によれば、本発明は、第1のタンパク質と第2のタンパク質とのコンプレックスに関する。ここで、前記第1のタンパク質が、第1の態様による融合タンパク質であり、そして、前記第2のタンパク質は、第2の哺乳動物のタンパク質またはその断片のアミノ酸配列と同一または類似のアミノ酸配列を有する。

【0015】

最後に、第8の態様において、本発明はまた、第1の態様による融合タンパク質、第6の態様による組成物、または、第7の態様によるコンプレックスを含む医薬組成物に関し、好ましくは、PUPの治療、または、ITIの治療およびその他の関連する出血性疾患

50

の治療から選択される、出血性疾患の治療または予防に使用するための、医薬組成物にも関する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、A) VWF断片のOCTA 11、およびB) メインプロテイン (main protein) として、VWF断片を有する本発明による融合タンパク質：OCTA 12C) メインプロテイン (main protein) として、VWF断片を有する本発明による融合タンパク質：OCTA 14D) メインプロテイン (main protein) として、VWF断片を有する本発明による融合タンパク質：OCTA 15、の概略図を示す。

10

【図2】図2は、FVII/VWFダブルノックアウト (DKO) マウス血漿における、異なるVWFタンパク質または血漿由来の全長VWFと共配合されたFVIIの静脈内投与後のFVII活性のタイムコースを示す。データポイントおよびエラーバーは、5つの値の平均および標準偏差 (SD) を表す。小さなサイズのため、エラーバーのいくつかは識別 (discernible) できない。

【図3】図3は、ミニプタ血漿中のOCTA 12と共配合した、100 U/kgのFVIIの皮下投与後の濃度投与後のOCTA 12の抗原濃度のタイムコースを示す。

【図4】図4は、100 U/kgのFVIIの皮下注射および静脈内注射、または、ミニプタ血漿中の、VWF-タンパク質、OCTA 12と共配合した、100 U/kgのFVIIの皮下注射後の、FVII抗原濃度のタイムコースを示す。

20

【0017】

発明の詳細な説明

明細書および特許請求の範囲、およびそのような用語が与えられる範囲を明確かつ一貫して理解を提供するために、以下の定義が提供される。

【0018】

定義

本明細書で使用される「ペプチド」は、任意の種類の任意の数のアミノ酸、好ましくは天然に存在するアミノ酸から構成され、好ましくはペプチド結合によって連結されていてもよい。特に、ペプチドは、少なくとも3個のアミノ酸、好ましくは、少なくとも5個、少なくとも7個、少なくとも9個、少なくとも12個、または少なくとも15個のアミノ酸を含む。

30

さらに、ペプチドの長さの上限はない。しかし、好ましくは、本発明によるペプチドは、500個のアミノ酸の長さを超えず、より好ましくは、300個のアミノ酸の長さを超えない。さらにより好ましくは、250個のアミノ酸以下である。

したがって、用語「ペプチド」には、通常、2~10個のアミノ酸の長さを有するペプチドを意味する「オリゴペプチド」を含み、および、通常、10個のアミノ酸を超える長さを有するペプチドを指す「ポリペプチド」が含まれる。

本明細書で使用される「タンパク質」は、1つまたはそれ以上のポリペプチド鎖を含み得る。1つ以上のポリペプチド鎖を有するタンパク質は、1つの遺伝子からの1つのポリペプチド鎖として発現され、そして、翻訳後に切断されることが多い。

40

このように、用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は互換的に使用される。

本明細書で使用されるポリペプチドおよびタンパク質には、化学的に合成されたタンパク質ならびに遺伝子によってコードされる天然に合成されたタンパク質が含まれる。

ポリペプチドまたはタンパク質は、ヒトの血液のような天然の供給源から得られ得るか、または組換えタンパク質として細胞培養において産生され得る。

本明細書で使用する用語「治療用タンパク質」は、治療効果を有するタンパク質またはポリペプチド、すなわち、活性医薬成分として使用されるタンパク質に関する。

本発明によれば、用語「タンパク質前駆体」、「プロ-タンパク質」または「プロペプチド」は、翻訳後の修飾、アミノ酸配列の一部の、酵素的切断によって、活性型に変えることができる、不活性タンパク質 (またはペプチド) に関する。

50

2つのアミノ酸配列間または2つのヌクレオチド配列間の関連性は、パラメータ「配列同一性」によって記載される。

【0019】

本発明の目的のために、2つのアミノ酸配列間の配列同一性の程度は、EMBOSSパッケージのNeedleプログラム(EMBOSS:欧州分子生物学オープンソフトウェアスイート、ライスら/2000年、Trends Genet. 16: 276-277)、好ましくは、バージョン3.0.0またはそれ以降)で実施されているように、Needleman-Wunschアルゴリズム(NeedlemanおよびWunsch、1970年、J. Mol. Biol. 48: 443-453)を用いて決定される。

10

使用されるオプションのパラメーターは、10のギャップオープンペナルティ(gap open penalty)0.5のギャップ延長ペナルティ(gap extension penalty)、およびEBLUSUM62(BLUSUM62のEMBOSSバージョンの)置換マトリックスである。

「最長同一性("longest identity")」とラベル付けされたニードルの出力(簡単なオプションの使用することなく得られた)は、パーセント同一性として使用され、そして、以下のように計算される:

(同一残基×100)/(アラインメントの長さ-アラインメントにおけるギャップの総数)。

本発明の目的のために、2つのヌクレオチド配列の間の配列同一性の程度は、EMBOSSパッケージのニードルプログラム(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite、Riceら、2000年、前記)、好ましくはバージョン3.0.0以降、で実施されているように、Needleman-Wunschアルゴリズム(NeedlemanおよびWunsch、1970年、前記)を用いて決定される。

20

【0020】

使用されるオプションのパラメーターは、10のギャップオープンペナルティ、0.5のギャップ延長ペナルティ、およびEDNAFULL(EMBOSSバージョンのNCBI NUC4.4)置換マトリックスである。

「最長同一性」とラベル付けされたNeedleの出力(nobriefオプションを使用して取得された)は、パーセント同一性として使用され、そして、次のように計算される。

30

【0021】

(同一のデオキシリボヌクレオチド×100)/(アラインメントの長さ-アラインメントにおけるギャップの総数)

ペプチドまたはポリヌクレオチドの定義に関して、本明細書で使用される、用語の「類似性(similarity)」および「類似(similar)」は、基準との、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列の配列同一性の特定の程度に関連する。

【0022】

類似のアミノ酸配列は、少なくとも、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%、対象の配列と同一であるアミノ酸配列を含むと解釈される。

40

しかしながら、典型的には、類似の配列は、保存的アミノ酸置換(conservative amino acid substitutions)のいずれをも含むことができるがけれども、活性部位残基またはグリコシル化アミノ酸のような、ペプチドまたはポリヌクレオチドの機能に関連する位置においては、同じ残基を含むであろう。

類似のヌクレオチド配列は、少なくとも、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%でさえ、対象の配列と同一であるヌクレオチド配列を含むと解釈される。

本明細書中で使用される「同一の(identical)」は、対象の配列と、100

50

%の配列同一性の、アミノ酸またはヌクレオチド配列を指す。

「組換え」という用語は、細胞、核酸、タンパク質またはベクターに関して使用される場合、細胞、核酸、タンパク質またはベクターが、異種の核酸またはタンパク質の導入または天然型の核酸またはタンパク質の改変によって修飾されていること、または、細胞がそのように修飾された細胞に由来することを意味する。

【0023】

したがって、たとえば、組換え細胞は、細胞の天然の（非組換えの）形態内には見出されない遺伝子を発現するか、または自然界に見出されるものとは、異なるレベルまたは異なる条件下で天然遺伝子を発現する。

本明細書で使用される用語「半減期（half-life）」は、分布の擬似平衡に到達した後に、血漿/血液濃度が50%減少するのに要する時間である（Toussainら、2005年の定義に従って）。

10

「半減期（half-life）」という用語はまた、「循環半減期（circulatory half-life）」、「終末半減期（terminal half-life）」または「排出半減期（elimination half-life）」とも呼ばれる。

【0024】

本明細書で使用する場合、細胞を参照して使用される、用語「形質転換された」、「安定に形質転換された（stably transformed）」および「トランスジェニック」は、細胞が、そのゲノムに組み込まれているか、または複数の世代を通じて維持されているエピソーム（episome）として運ばれる、非天然の（たとえば、異種）核酸配列を、その細胞が含むことを意味する。

20

【0025】

本明細書で使用する用語「断片」は、天然または野生型タンパク質と比較して一つ以上のアミノ酸のアミノ末端および/またはカルボキシ末端の欠失を有するポリペプチドであって、残りのアミノ酸配列が完全長cDNAから推定されるアミノ酸配列中の対応する位置と同一である、ポリペプチドを意味する。断片は、典型的には少なくとも50アミノ酸長である。

本明細書で使用される「グリコシル化」という用語は、分子、たとえば、タンパク質へのグリカンの結合を指す。グリコシル化は酵素反応であり得る。形成された結合は、共有結合を介してもよい。したがって、本明細書で使用する、グリコシル化ポリペプチドは、1つまたは複数のグリカンが結合しているポリペプチドである。

30

「高度にグリコシル化された」という語句は、利用可能なグリコシル化部位のすべてまたはほとんど全て、たとえば、O-結合型またはN-結合型グリコシル化部位でグリコシル化された酵素のような分子を指す。

本明細書で使用される「グリカン」という用語は、多糖またはオリゴ糖、または糖タンパク質またはグリコシル化ポリペプチドの炭水化物部分を指す。グリカンは、単糖残基のホモポリマーまたはヘテロポリマーであり得る。これらは、直鎖または分枝分子であってもよい。グリカンは、典型的には、少なくとも3つの糖を含み、そして、線状または分枝状であり得る。

40

グリカンは、天然の糖残基を含んでいてもよい（たとえば、グルコース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルノイラミン酸、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、マンノース、フコース、アラビノース、リボース、キシロースなど）および/または修飾された糖（たとえば、2'-フルオロリボース、2'-デオキシリボース、ホスホマンノース、6'-スルホ-N-アセチルグルコサミンなど）。

本明細書で使用される「O-グリカン」という用語は、哺乳動物の糖タンパク質のセリンおよびスレオニン残基に、一般的に、共有結合で結合して見出されるグリカンを指す。O-グリカンは、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）部分を介して、O-グリコシド結合によって、セリンまたはスレオニンの-OHに、 α 結合されていてもよい。

他の結合としては、 α -結合O-フコース、 β -結合O-キシロース、 α -結合O-マン

50

ノース、 β -結合 O-GlcNAc (N-アセチル-グルコサミン)、 α -または β -結合 O-ガラクトース、および、 α -または β -結合 O-グルコースグリカンである。

本発明によれば、用語「O-グリコシレーション クラスタ (O-glycosylation cluster)」、「O-グリカンクラスタ」および「O-グリコシル化アミノ酸のクラスタ」は、互換的に使用され、そして、O-グリコシル化アミノ酸の2つまたはそれ以上に関連している。

本明細書で使用される「シアル化」という用語は、シアル酸またはその誘導体と反応した分子、特に、グリカンを指す。

「含む (including)」、「含有する (containing)」または「によって特徴づけられる (characterized by)」と同義語である「含む (comprising)」というトランジショナルな用語は、包括的またはオープンエンドであり、そして、追加の、列挙されていない要素または方法ステップを排除するものではない。

【0026】

「からなる (consisting of)」というトランジショナルな語句は、請求項に特定されていない、いかなる要素、工程、または成分を、それらに通常付随する不純物を除いて、除外する。用語「からなる」が、プリアンブルの直後ではなく、請求項の本文の句に現れた場合、その句に記載されている要素のみを限定する。他の要素は、全体として請求項から除外されない。

「～から本質的になる (consisting essentially of)」というトランジショナルな語句は、特許請求されている範囲を、特定の材料またはステップ、およびクレームされた発明の基本的かつ新規な特性に重大な影響を与えないそれらに、クレームの範囲を限定する。クレームの「本質的になる (consisting essentially of)」は、「からなる (consisting of)」形式で書かれたクロズド・クレームと、「含む (comprising)」形式で起草された完全なオープンクレームの中間に位置している。

【0027】

本発明の文脈において、実用的な理由のため、融合タンパク質のような用語「グリコシル化タンパク質」は、単数形で使用される。一般的に、実際 (in praxis)、タンパク質は、同じタイプのタンパク質分子の組成物中に存在する。しかし、グリコシル化タンパク質の場合には、グリコシル化は、組成物の全ての分子において同一ではないであろう。たとえば、組成物の個々の分子の全てが、100%で、グリコシル化されるわけではない。さらに、特定のO-グリコシル化部位に結合したグリカンにおいて、相違が生じることがある。

したがって、本出願において、「融合タンパク質」への言及は、また、同一のアミノ酸配列を有するが、O-グリカン構造において相違を有する融合タンパク質分子の組成物にも関する。

本明細書で使用される場合、「結合親和性」または「親和性」という用語は、2つの分子、特にリガンドとタンパク質標的との結合の強さを示す。結合親和性は、水素結合、静電相互作用、疎水性相互作用およびファンデルワールス力のような、2つの分子間の非共有結合性分子間相互作用によって、影響される。

本明細書で使用される免疫応答は、適応性または自然免疫応答に関する。自然免疫応答は、抗原が体内に出現した直後または数時間以内に活性化される非特異的防御機構を指す。これらのメカニズムには、皮膚などの物理的障壁、血液中の化学物質、および、体内の外來細胞を攻撃する免疫系細胞が含まれる。自然免疫応答は、抗原の化学的性質によって活性化される。適応免疫応答は、抗原特異的免疫応答を指す。このためには、抗原は、まず、処理され、そして、認識しなければならない。抗原が一旦、認識されると、適応免疫系は、その抗原を攻撃するように特別に設計された多数の免疫細胞を作り出す。

【0028】

融合タンパク質

10

20

30

40

50

第一の態様によれば、本発明は、メインプロテイン (main protein) および少なくとも1つの延長ペプチドを含む融合タンパク質を提供する。ここで、メインプロテイン (main protein) のアミノ酸配列は、哺乳動物のタンパク質またはその断片のアミノ酸配列と同一または類似し、そして、前記延長ペプチド (extension peptide) は、O - グリコシル化アミノ酸のクラスターを含む。

本発明者らは、半減期 (half-life) の増加、すなわちO - グリコシル化アミノ酸のクラスターを含む延長ペプチド (extension peptide) の添加をもたらすタンパク質の改変を特定した。

実施例に示されるように、延長ペプチド (extension peptide) として、ヒトVWFのO - グリコシル化クラスター1のVWFの断片に対する融合は、VWF断片 (OCTA 11) 単独と比較して、増加した半減期 (half-life) を有する融合タンパク質 (OCTA 12) を齎す。

10

半減期 (half-life) ($t_{1/2}$) は、個々の血漿濃度 - 時間曲線の対数 - 直線部分の線形回帰分析により、または1相指数関数的減衰モデルを用いた非線形回帰によって計算することができる。計算のための例示的なソフトウェアプログラムは、Graph Pad Prismバージョン6.07 (La Jolla、CA92037 米国) およびWinNonlinバージョン6.4 (Pharsight社、Mountain View、CA、米国) である。

計算は次の式に基づく。

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_{el}} \quad [h]$$

20

$$\frac{dc}{dt} = K_{el} \cdot c \quad [h]$$

K_{el} = 排除速度定数 (elimination rate constant)

$t_{1/2}$ = 排出半減期 (elimination half-life)

c = 濃度

30

t = 時間

【0029】

したがって、一実施形態によれば、融合タンパク質は、延長ペプチド (extension peptide) を有さないメインプロテイン (main protein) と比較して、増加した半減期 (half-life) を有する。

VWFに由来するグリコシル化アミノ酸のクラスターを有するVWF断片の半減期 (half-life) を増加させることが可能であったので、本発明者らは、半減期 (half-life) を延長するための新規な原理を特定した。

40

すなわち、天然に存在するタンパク質中にも存在する、O - グリコシル化アミノ酸のクラスターの添加による、タンパク質またはタンパク質の断片の半減期 (half-life) の増加である。

したがって、融合タンパク質の一実施形態によれば、1つまたそれ以上の延長ペプチド (extension peptide) のアミノ酸配列は、前記哺乳類タンパク質の一部と同一または類似である。

哺乳類タンパク質のこの一部 (section) は、特に、非反復アミノ酸配列である。

本明細書中で使用される、非反復アミノ酸配列は、本発明による天然に存在する哺乳類タンパク質において、1コピーにのみ見出される配列である。

したがって、非反復アミノ酸配列は、明示的に、天然のタンパク質において生じる任意

50

の反復配列を除外する。

配列が20を超えるアミノ酸、好ましくは15を超えるアミノ酸、より好ましくは10を超えるアミノ酸からなり、そして、哺乳動物タンパク質がこの配列の1つ以上を含む場合、特に、配列は、反復していると考えられる。反復配列は、いわゆる可変数 (variable number) タンデムリピートから得ることができる。可変数 (variable number) タンデムリピート (VNTR) は、短いヌクレオチド配列が「タンデムリピート」として編成されているゲノム内の場所である。

1つまたはそれ以上のヌクレオチドのパターンが繰り返され、その繰り返しが互いに直接隣接している場合、「タンデムリピート」がDNA中に生じる。VNTRは、多くの染色体上に発見され、そして、多くの場合、個人間で、長さの変化を示す。

タンデムリピート配列が、DNA配列をコードするタンパク質中に位置する場合、これらはアミノ酸配列の反復を齎す。

例は、ムチンタンパク質ファミリーの全てのメンバーに見られる縦列反復 (tandem repeats) である。ムチンは、動物界のほとんどの生物の上皮組織によって産生される、高分子量の、高度にグリコシル化されたタンパク質のファミリーである。

【0030】

本発明による非反復アミノ酸配列は、そのようなアミノ酸配列タンデムリピート、特にムチンタンデムリピートを明白に排除する。延長ペプチド (extension peptide) は、メインプロテイン (main protein) と同じ哺乳動物タンパク質に由来するだけでなく、より具体的には、メインプロテイン (main protein) にも存在する一部 (section) を含み得る。

したがって、一実施形態によれば、1つまたはそれ以上の延長ペプチド (extension peptide) のアミノ酸配列は、前記メインプロテイン (main protein) の非反復アミノ酸配列の一部 (a non-repeated amino acid sequence section of said main protein) と同一または類似である。好ましくは、一つまたはそれ以上の延長ペプチドは、絨毛性 (chorionic) ゴナドトロピンβ-サブユニット (CG-β) に由来しない。絨毛性ゴナドトロピンβ-サブユニットのC末端ペプチド (CTP) は、FSH、FVIIa、およびFIXなどの他のタンパク質の半減期 (half-life) を増加させることが示された。

しかし、hCGが追加のCTPと一緒に記載された場合、すなわち、1つ以上のCTPコピーを有する場合、このタンパク質は本発明の主題から特に排除される。したがって、特に、延長ペプチド (extension peptide) は、CG-βのCTPと同一でもなく類似もしない。

【0031】

本発明によれば、アミノ酸配列のすぐ近くにある、2つまたはそれ以上のO-グリコシル化アミノ酸はクラスターと考えられる。したがって、融合タンパク質の一実施形態によれば、少なくとも1つの延長ペプチド (extension peptide) のO-グリコシル化アミノ酸のクラスターは、少なくとも2つO-グリコシル化アミノ酸を含む。クラスターは、たとえば、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14、または15個のO-グリコシル化アミノ酸を含み得る。

理論によれば、半減期 (half-life) 延長効果は、O-グリカンの負電荷に基づく。従って、半減期 (half-life) 延長の効果は、クラスター中のO-グリコシル化アミノ酸の数とともに増加するはずである。したがって、クラスターは、好ましくは、少なくとも3つのO-グリコシル化アミノ酸を含有する。

実施例に示すように、顕著な半減期 (half-life) 普及効果 (propagation effect) は、4つのO-グリコシル化アミノ酸のクラスターを有する延長ペプチドで達成された。したがって、好ましい実施形態によれば、クラスターは、少なくとも4つのO-グリコシル化アミノ酸を含む。

クラスターのO-グリコシル化アミノ酸に加えて、また、N-グリコシル化アミノ酸が

10

20

30

40

50

存在してもよい。好ましくは、O - グリコシル化クラスター中に、N - グリコシル化アミノ酸は存在しない。複数の延長ペプチドが存在する場合には、延長ペプチド (e x t e n s i o n p e p t i d e) のクラスターは、異なる数のO - グリコシル化されたアミノ酸を有していてもよい。たとえば、融合タンパク質は、2つのO - グリコシル化アミノ酸を有する1つのクラスターおよび4つのO - グリコシル化アミノ酸を有する第2のクラスターを含んでいてもよい。さらに、1つのクラスターは、3つのO - グリコシル化部位および他の4つのO - グリコシル化部位を含み得る。

【0032】

延長ペプチドのO - グリコシル化アミノ酸は、ムチン型の、O - グリコシル化アミノ酸、セリン (S e r) およびスレオニン (T h r) であってよい。しかし、また、O - グリコシル化チロシン (T y r) 、ヒドロキシリジン (H y d r o x y - L y s) またはヒドロキシプロリン (H y d r o x y - P r o) もまた当該分野で公知である。したがって、融合タンパク質中、特に、延長ペプチド (e x t e n s i o n p e p t i d e) における、1つまたはそれ以上のO - グリコシル化アミノ酸は、S e r 、 T h r 、 T y r 、 ヒドロキシ - L y s およびヒドロキシ - P r o から選択することができる。

10

前記断片の半減期 (h a l f - l i f e) の延長を齎す、O C T A 12中のVWF断片に融合した延長ペプチド (e x t e n s i o n p e p t i d e) は、O - グリコシル化スレオニン残基およびセリン残基の両方を含む。したがって、第1の態様の1つの実施形態によれば、O - グリコシル化アミノ酸のクラスターは、少なくとも1つのO - グリコシル化スレオニンを含む。好適には、前記クラスターは、スレオニンとセリンの両方を、O - グリコシル化アミノ酸として含む。

20

興味深いことに、O C T A 12の延長ペプチド (e x t e n s i o n p e p t i d e) は、少なくとも、O - グリコシル化された2つの隣接するスレオニン残基を含む。従って、一実施形態では、延長ペプチド (e x t e n s i o n p e p t i d e) は、少なくとも2つの隣接するO - グリコシル化スレオニン残基を含む。

以上説明したように、O - グリカンによって生成されたタンパク質表面の負の電荷は、半減期 (h a l f - l i f e) の延長を齎すと考えられている。理論に拘束されることを望まないが、効果の発現のために、近接した二つまたはそれ以上のO - グリカンが必要と考えられている。

【0033】

30

O - グリカン間のギャップが大きすぎる場合、すなわち、15個のアミノ酸における1個未満のO - グリコシル化アミノ酸を有する場合、その効果は、弱体化または無効になる可能性がある。従って、融合タンパク質の一の実施形態では、少なくとも一つの延長ペプチドは、15個のアミノ酸中に、少なくとも一つのO - グリコシル化アミノ酸を含む。より好ましくは、少なくとも一つの延長ペプチド (e x t e n s i o n p e p t i d e) は、10個のアミノ酸中に、少なくとも一つのO - グリコシル化部位を含む。

実施例に示されるように、試験された延長ペプチド (e x t e n s i o n p e p t i d e) は、8アミノ酸中に、1つのO - グリコシル化部位を有するクラスターを含む。したがって、好ましい実施形態によれば、1つまたは複数のクラスターは、8つのアミノ酸中に、少なくとも1つのグリコシル化部位を含む。

40

延長ペプチド (e x t e n s i o n p e p t i d e) の長さは、2つの異なる局面によって定義される。

延長ペプチドは、O - グリコシル化アミノ酸のグリコシル化を促進する認識部位を含むのに十分な長さでなければならない。従って、延長ペプチド (e x t e n s i o n p e p t i d e) は少なくとも10アミノ酸長でなければならない。

一方、延長ペプチド (e x t e n s i o n p e p t i d e) が短いほど、構造的完全性または活性、したがってメインプロテイン (m a i n p r o t e i n) の治療効果を妨害する可能性は低くなる。従って、延長ペプチド (e x t e n s i o n p e p t i d e) は100アミノ酸を超えてはならない。

【0034】

50

1つの実施形態によれば、1つまたはそれ以上の延長ペプチド (extension peptide) は、15～60個のアミノ酸の範囲の長さを有する。

延長ペプチド内で、4つのアミノ酸を、O-グリコシル化することを可能にするために、長さが、22から40個のアミノ酸の範囲であることが好ましい。

より好ましくは、延長ペプチド (extension peptide) の長さは、OCTA 12の延長ペプチド (extension peptide) の長さ程度、すなわち、26～36個のアミノ酸の範囲である。

一実施形態によれば、1つまたはそれ以上の延長ペプチド (extension peptide) は、約31個のアミノ酸の長さを有する。

タンパク質中に天然に存在するO-グリコシル化ペプチドの1つまたは複数のコピーを追加すると、その同じタンパク質またはその断片の半減期 (half-life) を増加するという、原理の結論を、本発明者らの発見は、導いただけではない。さらに、提示された結果は、VWFの特異的なO-グリコシル化ペプチドは、CTPと同様に、他のタンパク質、すなわち、一般的なタンパク質、の半減期 (half-life) を増加させることができるということを、信頼できるようにした。

【0035】

したがって、一実施形態によれば、その一つまたはそれ以上の延長ペプチドは、ヒトVWFのO-グリコシル化ペプチドに対して、少なくとも90%の配列同一性を有する。

このヒトVWF由来の延長ペプチド (extension peptide) は、FVIIIIのような、他の哺乳動物タンパク質またはその断片に融合され得る。

一つまたはそれ以上の延長ペプチド (extension peptide) の配列同一性は、好ましくは、ヒトVWFのO-グリコシル化ペプチドに対して、少なくとも95%である。より好ましくは、配列同一性は少なくとも98%である。最も好ましくは、延長ペプチド (extension peptide) の配列は、ヒトVWFのO-グリコシル化ペプチドと同一である。

【0036】

ヒトVWFのO-グリコシル化ペプチドは、好ましくは、少なくとも部分的に、VWFのO-グリコシル化クラスター2 (配列番号2のアミノ酸1238から1268) : QEPGGLVVPPTDAPVSP T T L Y V E D I S E P P L H (配列番号1) またはその変異体を含む。したがって、一の実施形態によれば、延長ペプチドは、少なくとも90%の配列番号1との配列同一性を有する。配列番号1に対する配列同一性は、好ましくは少なくとも95%である。より好ましくは、延長ペプチド (extension peptide) の配列番号1に対する、配列同一性は、少なくとも98%である。最も好ましくは、一つまたはそれ以上の延長ペプチドは、配列番号1に対して、100%の配列同一性を有する。

【0037】

メインプロテイン (main protein) は、哺乳動物のタンパク質に基づく、すなわち、哺乳動物のタンパク質またはその断片と類似または同一のアミノ酸配列を含む。哺乳動物タンパク質は、特にヒトタンパク質である。

メインプロテイン (main protein) のアミノ酸配列が類似または同一である、哺乳類のタンパク質は、グリコシル化タンパク質であってよい。

融合タンパク質の一の実施形態によれば、メインプロテイン (main protein) は、哺乳動物のタンパク質のグリコシル化部分を含む。

別の実施形態によれば、メインプロテイン (main protein) は、O-グリコシル化アミノ酸の少なくとも1つのクラスターを含む。

【0038】

O-グリコシル化アミノ酸のこのクラスターは、延長ペプチド (extension peptide) 中のO-グリコシル化アミノ酸のクラスターと同一であってもよい。

メインプロテイン (main protein) が基づく、哺乳類タンパク質は、より好ましくは血液タンパク質である。

一実施形態によれば、哺乳動物タンパク質はヒト血液タンパク質である。

哺乳動物の血液タンパク質は、血液凝固因子、輸送タンパク質、プロテアーゼ阻害剤、免疫グロブリン、細胞関連血漿タンパク質、アポリポタンパク質、補因子、成長因子、抗血管新生タンパク質 (antiangiogenic protein)、高グリコシル化タンパク質、血液因子または別の血液タンパク質とすることができる。

血液凝固因子は、特に、ヒト血液凝固因子は、好ましくは、フィブリノーゲン (F I)、プロトロンビン (F I I)、組織因子 (F I I I)、F V、F V I I、F V I I I、F I X、F X、F X I、F X I I、および、F X I I I、V W F、および A D A M T S 1 3 からなる群から選択される。

凝固因子 F I、F I I、F V、F V I I、F V I I I、F I X、F X、F X I、F X I I、および F X I I I は、非活性または活性化形態であり得ることが理解されている。

従って、本発明の文脈において、F I、F I I、F V、F V I I、F V I I I、F I X、F X、F X I、F X I I、および F X I I I に対する参照は、それぞれ、特に他について明確な言及無き限り、または、活性化された形態は論理的に除外されるという、文脈がない限り、活性化された形態、F I a (フィブリン)、F I I a (トロンビン)、F V a、F I X a、F V I I a、F V I I I a、F X a、F X I a、F X I I a および F X I I I a も含む。

したがって、この文脈では、F I、F I I、F V、F I X、F V I I、F V I I I、F X、F X I、F X I I、および F X I I I は、F I / F I a、F I I / F I I a、F V / F V a、F V I I / F V I I a、F V I I I / F V I I I a、F I X / F I X a、F X / F X a、F X I / F X I a、F X I I / F X I I a、および F X I I I / F X I I I a として読むことができる。

【0039】

輸送タンパク質、特にヒト輸送タンパク質は、アルブミン、トランスフェリン、セルロプラスミン、ハプトグロビン、ヘモグロビン、およびヘモベキシンから選択することができる。

1つの実施形態によれば、哺乳動物タンパク質は、プロテアーゼ阻害剤であり、特にヒトプロテアーゼ阻害剤である。

そのようなプロテアーゼ阻害剤の例をしては、 β -アンチトロンビン、 α -アンチトロンビン、プレラテントのアンチトロンビン (pre-latent-antithrombin)、酸化アンチトロンビン、2-マクログロブリン、C1-阻害剤、組織因子経路阻害剤 (tissue factor pathway inhibitor) (TFPI)、ヘパリン補因子 II、プロテイン C 阻害剤 (PAI-3)、プロテイン C、プロテイン S、およびプロテイン Z である。

免疫グロブリンの例は、ポリクローナル抗体 (Ig G)、モノクローナル抗体、Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig A、Ig A 1、Ig A 2、Ig M、Ig E、Ig D、およびベンス・ジョーンズ蛋白質である。

細胞関連血漿タンパク質は、たとえば、フィブロネクチン、トロンボグロブリン、または血小板因子 4 である。

アポリポタンパク質の例は、アポ A - I、アポ A - I I および アポ E である。

本発明の補因子は、たとえば、B 因子、D 因子、H 因子、I 因子、C 3 b 不活性化因子、プロパージン (properdin)、C 4 結合タンパク質などが挙げられる。

成長因子の例には、血小板由来成長因子 (PDGF)、上皮成長因子 (EGF)、トランスフォーミング増殖因子 α (TGF- α)、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β)、線維芽細胞増殖因子 (FGF) および肝細胞増殖因子 (HGF) を含む。

血管新生抑制 (Antiangiogenic) タンパク質は、潜在 (latent) - アンチトロンビン、プレラテント (prelatent) - アンチトロンビン、酸化アンチトロンビンおよびプラスミノーゲンを含む。

【0040】

高度にグリコシル化されたタンパク質の例としては、 α -1 酸性 糖タンパク質 (a l

10

20

30

40

50

f a - 1 - a c i d g l y c o p r o t e i n)、アンチキモトリプシン、インター α -トリプシン阻害剤、 α -2-HS糖タンパク質、C-反応性タンパク質である。

血液因子は、たとえば、エリスロポエチン、インターフェロン、腫瘍因子、t P A、またはg C S Fであり得る。

他のヒト血液タンパク質は、ヒスチジンリッチ糖タンパク質、マンナン(m a n n a n)結合レクチン、C4-結合タンパク質、フィブロンネクチン、GC-グロブリン、プラスミノゲン/プラスミン、 α -1マイクログロブリン、C-反応性蛋白質を含む。

【0041】

哺乳動物のタンパク質は、特に、ヒトVWF、フィブリノゲン、プロトロンビン、F I I I、F V、F V I I、F V I I I、F I X、F X、F X I、F X I I、F X I I I、A D A M T S 1 3、アンチトロンビン、 α -1 アンチトリプシン、C1-阻害剤、アンチキモトリプシン、P A I - 1、P A I - 3、2-マクログロブリン、T F P I、ヘパリン補因子I I、プロテインZ、プロテインC、およびプロテインSから選択された。ヒトにおける第V I I I因子は、6つのエキソンに、187.000塩基対を含むF8遺伝子によってコードされる。

10

転写されたmRNAは、9.029塩基対の長さを有し、そして、19個のアミノ酸が除去された2.351個のアミノ酸を有するタンパク質に翻訳される。

【0042】

ヒトにおけるF V I I I分子は、25N-グリコシル化、および6 O-グリコシル化を用い、31個のアミノ酸を、グリコシル化する(参照K a n n i c h tら、2013年)。

20

翻訳後、アミノ酸鎖は、特異的プロテアーゼによって、約200kDaの重鎖と約80kDaの軽鎖の形成をもたらす位置で、切断される。

ドメイン組織は、通常、A1-A2-B-A3-C1-C2と特徴付けられる。

軽鎖は、ドメインA3-C1-C2で構成されている。

重鎖は、主にドメインA1-A2-Bからなる。

血漿中に見出される重鎖は、90~200kDaの分子量を有する不均一な組成を有する。

【0043】

この理由は、そのグリコシル化の不均一性、スプライス変異体の存在およびBドメインの枯渇した重鎖(B domain depleted heavy chain)A1-A2のようなタンパク質分解産物の存在である。

30

【0044】

全長のF V I I Iのアミノ酸配列は、1986年7月21日の配列バージョン1(以下、UniProtKB P00451.1)のUniProtKBのP00451のアミノ酸20~2.351によって特定された。

一の実施形態によれば、メインプロテイン(main protein)が類似または同一である哺乳動物のタンパク質は、UniProtKB P00451.1のアミノ酸20~2.351によって特定されたヒト全長F V I I Iである。

別の実施形態によれば、メインプロテイン(main protein)は、Bドメインの少なくとも一部が欠失している、F V I I Iである。これに関して、Bドメイン全体が欠失していてもよい。

40

Bドメインの欠失している部分は、必要に応じてリンカーに置き換えられもよい。

リンカー配列は、特に、以下のアミノ酸配列S F S Q N S R H Q A Y R Y R R G(配列番号12)を有する。

Bドメインが、リンカーによって置換された、F V I I Iの一例は、Nuwiq(登録商標)またはVihum(登録商標)の活性成分である、シモクトコグアルファ(S i m o c t o c o g a l f a)である。

【0045】

シモクトコグアルファ(S i m o c t o c o g a l f a)は、以下の配列を有する：

50

ATRRYYLGAVELSDWYMQSDLGELPVDARFPVRPKSFPPNTSVVYKKTLEFVEFTDHLFNIAPRPPWMLLGP
 TIQAEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPM
 SDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVDEGKSWHSETKNSLMQDRDA
 ASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTA
 QTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRDDDNDSPSFIQ
 IRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLPAPDDRSYKSYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQH
 ESGILGPLLYGEVGDTLIIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVE
 DGPTKSDPRCLTRYSSSFVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQGRNQIMSDKRNVLFSVFEDENRSWYLTENIQ
 RFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYED
 TLTLFPFSGETVFMSPENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR
 SFSQNSRHQAYRYRRGEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERL
 WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQAS
 RPYSFYSSLSIYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGP
 LLVCHTNTLNPAGHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDT
 LPGLVMAQDQIRIRWYLLSMGNSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLI
 GEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQGWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLL
 APMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIR
 LHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVN
 NPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVNSLD
 PPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY (SEQ ID NO: 13)

10

【 0 0 4 6 】

VWFは、複数の生理学的機能を有する、哺乳動物の血漿中に存在する多量体 (m u l t i m e r i c) 接着性糖タンパク質である。

20

一次止血 (h e m o s t a s i s) の間、VWFは、血小板表面上の特異的受容体と、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの成分との間のメディエーターとして働く。

さらに、VWFは、プロ凝固 (p r o - c o a g u l a n t) 第V I I I 因子のための担体および安定化タンパク質として機能する。

VWFは、2813個のアミノ酸前駆体分子として、内皮細胞および巨核球で合成される。

VWFのドメイン構成は、典型的には、T i l 3 - D 3 - T I L 4 - A 1 - A 2 - A 3 - D 4 - C 1 - C 2 - C 3 - C Kとして特徴付けられる。

前駆体ポリペプチドである、プレプロVWF (p r e - p r o - V W F) は、成熟血漿フォンビルブラント因子において見出された、22残基のシグナルペプチド、741残基のプロペプチド (ドメインD1～D2) および2050残基のポリペプチドからなる (F i s c h e r ら、1994年)。

30

【 0 0 4 7 】

全長VWFは、UniProtKBのエントリーP04275によって特定された (2 0 1 7 年 4 月 1 2 日 の エ ン ト リ バ ー ジ ョ ン 2 2 4) 。

本発明におけるヒトVWFは、前記UniProtKB P04275の任意の配列のアミノ酸配列、特に、配列番号2 (アイソフォーム1) を有する。

VWFは、O - グリコシル化アミノ酸の2つのクラスターを含む。

O - グリコシル化アミノ酸の第1のクラスターは、配列番号2のアミノ酸1238～1268の間に見出される。

40

第2のクラスターは、配列番号2のアミノ酸1468～1487を含む。

血漿中に分泌されると、VWFは、分子サイズの異なる種々の種 (s p e c i e s) の形態で循環する。

これらのVWF分子は、2050アミノ酸残基の成熟サブユニットのオリゴマーおよびマルチマーからなる。

VWFは、通常、約500～20,000kDaのサイズの範囲のマルチマー多量体として、血漿中に見出され得る (F u r l a n ら、1996年) 。

【 0 0 4 8 】

一実施形態によれば、メインプロテイン (m a i n p r o t e i n) は、ヒト成熟V

50

W F の配列と同一または類似のアミノ酸配列を有する。

別の実施形態によれば、メインプロテイン (main protein) は、ヒト V W F の断片の配列と類似または同一であるアミノ酸配列を有する。

たとえば、ヒト V W F の断片において、ドメイン A 1、A 2、A 3、D 4、C 1、C 2、C 3、C K の一つまたはそれ以上が、ヒト成熟 V W F との比較で、欠失していてもよい (T i l 3 - D 3 - T I L 4 - A 1 - A 2 - A 3 - D 4 - C 1 - C 2 - C 3 - C K)。

V W F 断片は、たとえば、

T i l 3 - D 3 - T I L 4 - A 1、

T i l 3 - D 3 - T I L 4 - A 1 - A 2、

T i l 3 - D 3 - T I L 4 - A 1 - A 2 - A 3、

T i l 3 - D 3 - T I L 4 - A 1 - A 2 - A 3 - D 4、

T i l 3 - D 3 - T I L 4 - A 1 - A 2 - A 3 - D 4 - C 1、

T i l 3 - D 3 - T I L 4 - A 1 - A 2 - A 3 - D 4 - C 1 - C 2、および

T i l 3 - D 3 - T I L 4 - A 1 - A 2 - A 3 - D 4 - C 1 - C 2 - C 3 - C K

からなる以上の群から選択されるドメイン組織を有する。

【 0 0 4 9 】

これに関して、ヒト V W F の断片は、特に、配列番号 2 のアミノ酸 7 6 4 で始まる断片である。

配列番号 2 のアミノ酸 7 6 4 ~ 1 0 3 5 は、V W F の F V I I I 結合ドメインを含む。メインプロテイン (main protein) は、たとえば、W O 2 0 1 5 / 1 8 5 7 5 8 A 2 に定義されているような V W F の断片を含むことができる。

国際公開第 2 0 1 5 / 1 8 5 7 5 8 号パンフレットに示されるように、それに定義されている F V I I I とその V W F 断片との複合体は、F V I I I 単独と比較してリン脂質膜への結合が減少し、かつ、F V I I I と全長 V W F の複合体と比較して、コラーゲン I I I およびヘパリンへの結合の減弱を示した。

好ましくは、配列番号 2 のアミノ酸 7 6 4 で始まる V W F の断片は、好ましくは、配列番号 2 の 1 9 0 5 から 2 1 5 3 の範囲のアミノ酸で終わる。

【 0 0 5 0 】

一実施形態によれば、V W F 断片は、配列番号 2 の 2 0 3 0 ~ 2 1 5 3 の範囲の V W F のアミノ酸で終わる。

さらなる実施形態によれば、V W F 断片は、2 1 0 0 ~ 2 1 5 3 の範囲の配列番号 2 のアミノ酸で終わる。

一実施形態によれば、メインプロテイン (main protein) は、配列番号 2 の 7 6 4 ~ 1 2 6 8 と、類似または同一であるアミノ酸配列を有する。

一実施形態によれば、メインプロテイン (main protein) のアミノ酸配列主は、配列番号 2 のアミノ酸 7 6 4 ~ 1 2 6 8 に対して、少なくとも 9 0 % の同一性を有する。

メインプロテイン (main protein) のアミノ酸配列はまた、配列番号 2 のアミノ酸 7 6 4 ~ 1 2 6 8 に対して、少なくとも 9 5 % の同一性を有する。

さらに、メインプロテイン (main protein) のアミノ酸配列の、配列番号 2 のアミノ酸 7 6 4 ~ 1 2 6 8 に対する同一性は、少なくとも 9 8 % である。

特に、メインプロテイン (main protein) のアミノ酸配列は、配列番号 2 のアミノ酸 7 6 4 ~ 1 2 6 8 に対する 1 0 0 % の同一性を有する。

一実施形態によれば、メインプロテイン (main protein) は、配列番号 2 のアミノ酸 7 6 4 ~ 1 9 0 5 と類似または同一のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 5 1 】

一実施形態によれば、メインプロテイン (main protein) のアミノ酸配列は、配列番号 2 のアミノ酸 7 6 4 ~ 1 9 0 5 に対して、少なくとも 9 0 % の同一性を有する。

メインプロテイン (main protein) のアミノ酸配列はまた、配列番号 2 の

アミノ酸 764 ~ 1905 に対して、少なくとも 95 % の同一性を有する。

さらに、メインプロテイン (main protein) のアミノ酸配列の、配列番号 2 のアミノ酸 764 ~ 1905 に対する同一性は、少なくとも 98 % でよい。

特に、メインプロテイン (main protein) のアミノ酸配列は、配列番号 2 のアミノ酸 764 ~ 1905 と 100 % の同一性を有していてもよい。

融合タンパク質は、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つまたは 10 の延長ペプチド (extension peptide) のような任意の数の延長ペプチド (extension peptide) を含み得る。

融合タンパク質 OCTA 12 は、延長ペプチド (extension peptide) の 2 つのコピーを含有し、そして、VWF 断片の OCTA 11 と比較して、半減期 (half-life) の有意な増加を示す。

10

したがって、一実施形態によれば、融合タンパク質は、少なくとも 2 つの延長ペプチド (extension peptide) を含む。

【0052】

現在のところ、半減期 (half-life) の延長効果は、少なくとも部分的に、延長ペプチドの O - グリカンの負電荷に基づく、と理解される。

したがって、延長ペプチドのコピー数の増加は、半減期 (half-life) の延長の効果のさらなる増加に繋がる。

これは、延長ペプチド (extension peptide) の 4 つのコピーを含む、OCTA 14 によって確認される。

20

したがって、一実施形態によれば、融合タンパク質は、少なくとも 4 つの延長ペプチド (extension peptide) を含む。

【0053】

他方、延長ペプチド (extension peptide) のコピー数によって、延長ペプチドが構造的完全性または活性、そして、従って、メインプロテイン (main protein) の治療効果に干渉する機会が増加する。

したがって、一実施形態によれば、延長ペプチド (extension peptide) の数は 11 未満である。

融合タンパク質は、メインプロテイン (main protein) および延長ペプチド (extension peptide) に加えて、さらなるペプチド成分を含み得る。

30

【0054】

特に、本発明による延長ペプチド (extension peptide) に加えて、融合タンパク質は、CTP、XTEN、トランスフェリンまたはその断片、アルブミンまたはその断片などの半減期 (half-life) の延長のため、さらなるペプチドを含み得る。

メインプロテイン (main protein) が哺乳類タンパク質の断片であり、そして、融合タンパク質が同じ哺乳類タンパク質のさらなる断片を含むこともまた、可能である。

特に、2 つの断片は、1 つまたはそれ以上の延長ペプチド (extension peptide) によって分離される。

40

そのようなタンパク質の例は、OCTA 15 であって、VWF の 764 ~ 1268 のアミノ酸、配列番号 1 の配列を有する 2 つの延長ペプチドおよび、配列番号 2 のアミノ酸 2721 ~ 2813 からなる VWF の「システインノットドメイン (cysteine knot domain)」を含む。

融合タンパク質において、1 つまたはそれ以上の延長ペプチド (extension peptide) は、メインプロテイン (main protein) の N 末端または C 末端に連結され得る。

【0055】

特に、融合タンパク質は、N 末端に連結された 1 つまたはそれ以上の延長ペプチド (extension peptide) と、メインプロテイン (main protein)

50

のC末端に連結された1つまたはそれ以上の延長ペプチド(extension peptide)とを含むことができる。

融合タンパク質は、メインプロテイン(main protein)および1つまたは複数の延長ペプチド(extension peptide)に加えて、さらにペプチドを含有していてもよい。

したがって、延長ペプチド(extension peptide)は、メインプロテイン(main protein)に直接的または間接的に連結され得る。

【0056】

これに関して、「直接連結している」とは、メインプロテイン(main protein)および延長ペプチド(extension peptide)のアミノ酸配列が直接隣接していることを意味する。

10

【0057】

「間接的に連結された」とは、メインプロテイン(main protein)と延長ペプチド(extension peptide)との間に、さらなるペプチドが配置されていることを意味する。

特に、リンカーペプチドは、メインプロテイン(main protein)と延長ペプチド(extension peptide)との間に位置することができる。

リンカーは、切断部位を含み、延長ペプチド(extension peptide)を、メインプロテイン(main protein)から開裂可能にすることができる。

20

メインプロテイン(main protein)、1つまたはそれ以上の延長ペプチド(extension peptide)および、所望によりさらなるペプチドは、遺伝子、cDNA、またはそれらをコードする配列の接合によって産生され得る。

したがって、メインプロテイン(main protein)、1つまたはそれ以上の延長ペプチド(extension peptide)および所望によりさらなるペプチドは、ペプチド結合によって連結される。

【0058】

本発明によれば、融合タンパク質のペプチドは、代わりに、化学的リンカーまたはグリコシド結合のような他のリンカーを介して接続することができる。

好ましくは、融合タンパク質のペプチドは、ペプチド結合によって連結される。

一実施形態によれば、延長ペプチド(extension peptide)は、メインプロテイン(main protein)のC末端に直接連結される。

30

特に、融合タンパク質は、メインプロテイン(main protein)のC末端に連結された、少なくとも2つの連続した延長ペプチド(extension peptide)を含む。

【0059】

融合タンパク質は、2つまたはそれ以上の親和性タグに連結されていてもよい。

親和性タグの例は、ポリヒスチジン、プロテインA、グルタチオン S トランスフェラーゼ、サブスタンス P、FLAG、ストレプトアビジン、および免疫グロブリン重鎖定常領域である。

親和性タグは、一般に、完全な構築物のアミノ酸配列の一部を形成するが、親和性タグは、融合タンパク質の一部として考慮されていない。

40

一つまたはそれ以上の親和性タグは、好ましくは、融合タンパク質のC末端またはN末端に連結される。

【0060】

融合タンパク質が、1つまたは複数の親和性タグに連結されている場合、融合タンパク質は、好ましくは、親和性タグとタンパク質の残りの間に切断部位を含み、たとえば、プロテアーゼ切断による親和性タグの切断を可能にする。

一実施形態によれば、1つの延長ペプチド(extension peptide)は、融合タンパク質のN末端を形成する。

上で説明したように、前記延長ペプチド(extension peptide)のN

50

- 末端アミノ酸は、所望により、親和性タグに連結される。

1つの実施形態によれば、1つの延長ペプチド (extension peptide) は、融合タンパク質のC末端を形成する。

【0061】

上で説明したように、前記延長ペプチド (extension peptide) のC末端アミノ酸は、所望により、親和性タグに連結されていてもよい。

一実施形態によれば、前記請求項のいずれかに記載の融合タンパク質において、メインプロテイン (main protein) と比較して、少なくとも4、好ましくは少なくとも8、より好ましくは少なくとも1つの追加のO-グリカンを含む。

一実施形態によれば、融合タンパク質は、二量体化ドメインを含む。特に、メインプロテイン (main protein) は二量体化ドメインを含む。

VWFでは、二量体は、CKドメインの結合によって形成される。

【0062】

したがって、メインプロテイン (main protein) が、VWF断片である場合、それは好ましくは、CK-ドメインを含む。

本発明による代表的な融合タンパク質は、OCTA12である。

OCTA12は、以下のアミノ酸配列 (配列番号3) を有する：

SLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECKTCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQKEYA
PGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGEQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGN
KGCSHP SVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYIIILLGKALS VVWDRHLSISVVLK
QTYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPDSSPATCHNNIMKQTMVDSS
CRILTSDFVQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHGVVWTRTATLCPQSCEER
NLRENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCVAGRRFAS
GKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCEACQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLH**QEPGGLVVPPTDAP**
VSPTTLYVEDISEPPLH**QEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLH**

【0063】

OCTA12は、配列番号2のアミノ酸764~1268のVWF断片と、配列番号2のアミノ酸1238~1268からなる、C末端に結合した延長ペプチド (extension peptide) ((bold太字)) の2コピーとの融合タンパク質である。

一つの実施形態によれば、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号3に対して少なくとも90%の同一性を有する。

融合タンパク質のアミノ酸配列はまた、配列番号3と、少なくとも95%の同一性を有していてもよい。

また、融合タンパク質のアミノ酸配列の配列番号3との同一性は、少なくとも98%であってもよい。特に、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号3と100%の同一性を有していてもよい。

以下の配列 (配列番号4) は、追加の12アミノ酸シグナルペプチド (太字および下線) を有するOCTA12を表す。

このペプチドの発現は、OCTA12の単量体形態を提供する。

そのシグナルペプチドは切断される。

MIPARFAGVLLALALILPGTLCSLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECKTCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMV
RHENRCVALERCPCFHQKEYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGEQ
QYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSHP SVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYII
LLLGKALS VVWDRHLSISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKV
PLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDFVQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVC
AQHGVVWTRTATLCPQSCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILDE
LLQTCVDPEDCPVCVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCEACQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVE
DISEPPLH**QEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLH**
(SEQ ID NO: 4)

【0064】

10

20

30

40

50

一実施形態によれば、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 4 に対して少なくとも 90% の同一性を有する。融合タンパク質のアミノ酸配列はまた、配列番号 4 に対して、少なくとも 95% の同一性を有していても良い。

また、融合タンパク質のアミノ酸配列の、配列番号 4 に対する同一性は、少なくとも 98% であってよい。特に、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 4 に対して、100% の同一性を有していてもよい。

本発明による、さらなる代表的な融合タンパク質は、OCTA 12 およびシグナルペプチド（太字および下線）を有するプロペプチド（太字）を含む、Pro-OCTA 12 である。Pro-OCTA 12 は、配列番号 5 によって特定される：

【0065】

MIPARFAGVLLALALILPGTLCAEGTRGRSSSTARCSLFGSDFVNTFDGSMYSFAGYCSYLLAGGCQKRSFSIIG
DFQNGKRVLSVYLGEFFDIHLFVNGTVTQGDQRVSMFYASKGLYLETEAGYYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQV
LLSDRYFNKTCGLCGNFNIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANSWALSSGEQWCERASPPSSSCNISSGEMQKGLW
EQCQLLKSTSVFARCHPLVDPEPFVALCEKTLCECAGGLECACPALLEYARTCAQEGMVLVGWTDHSACSPVCP
AGMEYRQCVSPCARTCQSLHINEMCQERCVDGCSCPEGQLLDEGLCVESTECPCVHSGKRYPPGTSLSRDCNTC
ICRNSQWICSNEECPGECLVTGQSHFKSFDNRYFTTSGICQYLLARDCQDHSFSIVIETVQCADDRDAVCTRVS
TVRLPGLHNSLVKLKHGAGVAMDGDVQLPLLLKGLDLRIQHTVTASVRLSYGEDLQMDWDGRGRLLVKLSPVYAG
KTCGLCGNYNGNQDDFLTPSGLAEPRVEDFGNAWKHLHGDCQDLQKHSDPCALNPRMTRFSEEACAVLTSPTF
EACHRAVSPLPYLRNCRYDVCSCSDGRECLCGALASYAAACAGRGVRVAWREPGRCELNCPKGQVYLQCGTPCN
LTCSRSLSYDDEECNEACLEGCFCPPGLYMDERGDVCPKAQCPCYYDGEIFQPEDIFSDHHTMCYCEDGFMHCTM
SGVPGSLLPDAVLSSPLSHRSKRSLSCRPPMVKLVCPADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMSCMGCVSGCLCPPGM
VRHENRCVALERCPCFHQKEYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGE
CQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSHP SVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRP MKDETHFEVVESGRYI
IILLGKALS VVWDRHLSISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRK
VPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDVFDQCNKLVDPPEYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHV
CAQHKGKVVWTRTATLCPQSCEERNLRENGYECWEWRNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVGEGCHACPPGKILD
ELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVNVLTCEACQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLY
VEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLH
 (SEQ ID NO: 5)

【0066】

Pro-OCTA 12 の発現は、二量体の形成をもたらす。そのペプチド二量体は、プロペプチドの切断後にも残る。一つの実施形態によれば、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 5 に対して、少なくとも 90% の同一性を有する。

融合タンパク質のアミノ酸配列はまた、配列番号 5 に対して、少なくとも 95% の同一性を有する必要がある。あてよい。

また、融合タンパク質のアミノ酸配列の配列番号 5 との同一性は、少なくとも 98% であってよい。特に、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 5 に対して、100% の同一性を有していてもよい。

【0067】

さらに、本発明に係る代表的な融合タンパク質は、OCTA 14 である。

OCTA 14 は以下のアミノ酸配列を有する：

SLSCRPPMVKLVCPADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMSCMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQKEYA
 PGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGEQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGN
 KGCSHP SVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRP MKDETHFEVVESGRYIILLGKALS VVWDRHLSISVVLK
 QTYQEKVCGLCGNFDGIQNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSS
 CRILTSDVFDQCNKLVDPPEYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHKGKVVWTRTATLCPQSCEER
 NLRENGYECWEWRNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVGEGCHACPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFAS
 GKKVTLNPSDPEHCQICHCDVNVLTCEACQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAP
 VSPTTLYVEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDIS
 EPPLHQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLH (SEQ ID NO: 6)

【0068】

OCTA 14 は、配列番号 2 のアミノ酸 764 ~ 1268 の VWF 断片と、配列番号

2のアミノ酸1238～1268からなるC末端に結合した、延長ペプチド(*extension peptide*)(太字)の4コピーとの融合タンパク質である。

一つの実施形態によれば、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号6に対して、少なくとも90%の同一性を有する。融合タンパク質のアミノ酸配列はまた、配列番号6に対して、少なくとも95%の同一性を有していても良い。

また、融合タンパク質のアミノ酸配列である、配列番号6に対する同一性は、少なくとも98%であってよい。特に、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号6と100%の同一性を有することができる。

以下の配列(配列番号7)は、追加の12アミノ酸シグナルペプチド(太字および下線)を有するOCTA 14を表す。

【0069】

このペプチドの発現は、OCTA 14の単量体形態を提供する。

シグナルペプチドは切断される。

MIPARFAGVLLALALILPGTLCSLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECKTKCQNYDLECMMSGCVSGCLCPPGMV
RHENRCVALERCPCFHHQKEYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGE
QYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESEGRYII
LLLGLKALSVMWDRHLSISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKV
PLDSSPATCCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCSISGDCACFCDTIAAYAHVC
AQHGKVVWTRTATLCPQSCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVCQVEGCHAHCPPGKILDE
LLQTCVDPEDCPVCVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCACQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVE
DISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHQEPG
GLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLH(SEQ ID NO: 7)

【0070】

1つの実施形態によれば、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号7に対して、少なくとも90%の同一性を有する。融合タンパク質のアミノ酸配列はまた、配列番号7に対して、少なくとも95%の同一性を有しても良い。また、融合タンパク質のアミノ酸配列である、配列番号7と、98%の同一性があってもよい。

特に、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号7に対して、100%の同一性を有することができる。

本発明の更なる代表的な融合タンパク質は、OCTA 14と、シグナルペプチド(太字および下線)を有するプロペプチド(太字)とを含む、Pro-OCTA 14である。Pro-OCTA 14は、配列番号8によって特定される：

【0071】

MIPARFAGVLLALALILPGTLCAEGRTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSMYSFAGYCSYLLAGGCQKRSFSIIIG
DFQNGKRVSLSVYLGEFFDIHLFVNGTVTQGDQRVSMFYASKGLYLETEAGYYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQV
LLSDRYFNKTCGLCGNFNIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANSWALSSGEQWCERASPPSSSCNIISSGEMQKGLW
EQCQLLKSTSVFARCHPLVDPEPFVALCEKTLCECAGGLECACPALLEYARTCAQEGMVLYGWTDHSAACSPVCP
AGMEYRQCVSPCARTCQSLHINEMCQERCVDGCSCEGQLLDEGLCVESTCPCVHSGKRYPPGTSLSRDCNTC
ICRNSQWICSNEECPEGELVTGQSHFKSFDNRYFTFSIGICQYLLARDQCQDHSFSIVIETVQCADRDVCTRVS
TVRLPGLHNSLVKLKHGAGVAMDGQDVQLPLLKGLDLRIQHTVTASVRLSYGEDLQMDWDGRLLVKLSPVYAG
KTCGLCGNYNGNQDDFLTPSGLAEPRVEDFGNAWKHLHGDCQDLQKHSDPCALNPRMTRFSEEACAVLTSPTF
EACHRAVSPLPYLRNCRYDVCSDGRECLCGALASYAAACAGRGVRVAVWREPGRCELNCPKGQVYLQCGTFCN
LTCRSLSYPDDEECNEACLEGCFPPGLYMDERGDVCPKAQCPCYYDGEIFQPEDIFSDHHTMCYCEDGFMHCTM
SGVPGSLLPDAVLSSPLSHRSKRSLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECKTKCQNYDLECMMSGCVSGCLCPPGM
VRHENRCVALERCPCFHHQKEYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGE
CQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESEGRYII
LLLGLKALSVMWDRHLSISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRK
VPLDSSPATCCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCSISGDCACFCDTIAAYAHV
CAQHGKVVWTRTATLCPQSCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVCQVEGCHAHCPPGKILD
ELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCACQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLY
VEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHQE
PGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLH(SEQ ID NO:
8)

10

20

30

40

50

【 0 0 7 2 】

一つの実施形態によれば、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 8 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する。融合タンパク質のアミノ酸配列はまた、配列番号 8 に対して、少なくとも 9 0 % 同一性を有しても良い。また、融合タンパク質のアミノ酸配列の配列番号 8 に対する同一性は、少なくとも 9 8 % でもよい。

特に、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 8 に対して 1 0 0 % の同一性を有していてもよい。

【 0 0 7 3 】

さらに、本発明に係る代表的な融合タンパク質は、O C T A 1 5 である。

O C T A 1 5 は、以下のアミノ酸配列を有する：

SLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECKTKCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHHQKEYA
PGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECCQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGN
KGCSPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDKETHFEVVESGRYIIILLGKALSVVWDRHLSISVVLK
QTYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCCHNNIMKQTMVDSS
CRILTSDFVQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHGVVTVRTATLCPQSCEER
NLRENGYECWEYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFA
SGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCACQEPGGLVVPPTDAPVSPPTLYVEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDA
PVSPPTLYVEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVPTTLYVEDISEPPLHHEEPECNDITARLQYVKVGSCCKSEVEV
DIHYCQGKASKAMYSIDINDVQDQCSCCSPTRTEPMQVALHCTNGSVVYHEVLNAMECKCSPRKCSK (SEQ
ID NO: 9)

10

20

【 0 0 7 4 】

O C T A 1 5 は、配列番号 2 のアミノ酸 7 6 4 ~ 1 2 6 8 の V W F 断片と、配列番号 2 のアミノ酸 1 2 3 8 ~ 1 2 6 8 からなる C 末端に結合した、延長ペプチド (e x t e n s i o n p e p t i d e) (太字) の 2 コピー、および、配列番号 2 のアミノ酸 2 7 2 1 ~ 2 8 1 3 からなる V W F の「システインノットドメイン」(“ c y s t e i n k n o t d o m a i n ”) との融合タンパク質である。一つの実施形態によれば、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 9 に対して、少なくとも 9 0 % の同一性を有する。融合タンパク質のアミノ酸配列はまた、配列番号 9 に対して、少なくとも 9 5 % の同一性を有していても良い。また、融合タンパク質のアミノ酸配列である、配列番号 9 に対する同一性は、少なくとも 9 8 % であってよい。

30

特に、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 9 と 1 0 0 % の同一性を有することができる。

【 0 0 7 5 】

以下の配列 (配列番号 1 0) は、追加の 1 2 アミノ酸シグナルペプチド (太字および下線) を有する O C T A 1 5 を表す。このペプチドの発現は、O C T A 1 5 の二量体形態を提供する。シグナルペプチドは切断される。

MIPARFAGVLLALALILPGTLCSLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECKTKCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMV
RHENRCVALERCPCFHHQKEYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECC
QYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDKETHFEVVESGRYII
LLLGKALSVVWDRHLSISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKV
PLDSSPATCCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDFVQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVC
AQHGKVVTVRTATLCPQSCEERNLRENGYECWEYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVGCHAHCPPGKILDE
LLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCACQEPGGLVVPPTDAPVSPPTLYV
EDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVSPPTLYVEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVPTTLYVEDISEPPLHHEEPE
CNDITARLQYVKVGSCCKSEVEVDIHYCQGKASKAMYSIDINDVQDQCSCCSPTRTEPMQVALHCTNGSVVYHE
VLNAMECKCSPRKCSK (SEQ ID NO: 10)

40

【 0 0 7 6 】

一つの実施形態によれば、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 1 0 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する。融合タンパク質のアミノ酸配列はまた、配列番号 1 0 に対して、少なくとも 9 5 % 同一性を有しても良い。また、融合タンパク質のアミノ酸配

50

列の配列番号 10 に対する同一性は、少なくとも 98% でもよい。特に、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 10 に対して、100% の同一性を有していてもよい。

本発明の更なる代表的な融合タンパク質は、OCTA 15 と、シグナルペプチド（太字および下線）を有するプロペプチド（太字）とを含む Pro-OCTA 15 である。この配列の発現は、多量体の形成をもたらす。Pro-OCTA 15 は、配列番号 11 によって特定される：

MIPARFAGVLLALALILPGTLCAEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSMYSFAGYCSYLLAGGCQKRSFSIIIG
DFQNGKRVSLSVYLGEFFDIHLFVNGTVTQGDQRVSMFYASKGLYLETEAGYYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQV
LLSDRYFNKTCGLCGNFNIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANSWALSSGEQWCERASPPSSSCNISSGEMQKGLW
EQCQLLKSTSVFARCHPLVDPEPFVALCEKTLCECAGGLECACPALLEYARTCAQEGMVLYGWTDHSAACSPVCP
AGMEYRQCVSPCARTCQSLHINEMCQERCVDGCSCPEGQLLDEGLCVESTECPCVHSGKRYPPGTSLSRDCNTC
ICRNSQWICSNEECPEGELVTGQSHFKSFDNRYFTFSGICQYLLARDQCQDHFSFIVETVQCADDRDAVCTRVS
TVRLPGLHNSLVKLKHGAGVAMDQDVQLPLLLKGLDLRIQHTVTASVRLSYGEDLQMDWDGRGRLLVKLSPVYAG
KTCGLCGNYNGNQDDFLTPSGLAEPRVEDFGNAWKLHGDCQDLQKHSDPCALNPRMTRFSEEACAVLTSPTF
EACHRAVSPLPYLRNCRYDVCSCSDGRECLCGALASYAAACAGRGVRVAWREPGRCELNCCKGQVYLQCGTPCN
LTCRSLSYPDDEECNEACLEGCFCPPGLYMDERGDVCPKAQCPCYYDGEIFQPEDIFSDHHTMCYCEDGFMHCTM
SGVPGSLLPDAVLSSPLSHRSKRSLSRPPMVKLVCADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMGCVSGCLCPGGM
VRHENRCVALERCPCFHQKEYAPGETVKIGCNITCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGE
CQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSHPSVKCKKRVITLVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVEGSGRYI
ILLGKALSVVWDRHLSISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRK
VPLDSSPATCCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCSISGDCACFCDTIAAYAHV
CAQHGKVVITWRTATLCPQSCEERNLRENGYECWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILD
ELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCACQEPGGLVVPPTDAPVSPPTTLY
VEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVSPPTTLYVEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVPTTLYVEDISEPPLHEEP
ECNDITARLQYVKGSGCKSEVEVDIHYCQGKASKAMYSIDINDVQDQSCCSPTRTPEMQVALHCTNGSVVYH
EVLNAMECKCSPRKCSK (SEQ ID NO: 11)

10

20

【0077】

一つの実施形態によれば、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 11 に対して、少なくとも 90% の同一性を有する。融合タンパク質のアミノ酸配列はまた、配列番号 11 に対して、少なくとも 95% 同一性を有しても良い。また、融合タンパク質のアミノ酸配列の配列番号 11 に対する同一性は、少なくとも 98% でもよい。特に、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 11 に対して、100% の同一性を有していてもよい。

30

本発明の一の実施形態では、融合タンパク質は、延長ペプチド（extension peptide）の 2 つ以上のコピーを有する、Simoctocog アルファに基づく、修飾 FVIIIT タンパク質である。

【0078】

本実施形態では、好適には、FVIIIT の重鎖、特に、UniprotKB P00451.1 のアミノ酸 20 ~ 759、に同一または類似している。

FVIIIT の重鎖（特に、UniprotKB P00451.1 のアミノ酸 20 ~ 759）と同一または類似のメインプロテイン（main protein）を有する融合タンパク質は、好適には、さらに、配列番号 12 と類似または同一のリンカー、および、さらに、UniprotKB エントリー P00451.1 のアミノ酸 1668 ~ 2351 によって特定される軽鎖と類似または同一のアミノ酸配列を含む。

40

【0079】

延長ペプチド（extension peptide）は、軽鎖の C 末端に融合していてもよい。あるいは、延長ペプチド（extension peptide）は、重鎖と軽鎖の間に位置する。

これに関して、延長ペプチド（extension peptide）は、リンカーの C 末端または N 末端に連結され得る。

延長ペプチド（extension peptide）はまた、リンカーに置き換えることができる。

さらに、リンカー配列は、1 つ以上の延長ペプチド（extension pepti

50

d e) によって中断されてもよい。

また、延長ペプチド (e x t e n s i o n p e p t i d e) は、重鎖と軽鎖の間および軽鎖の C 末端の両方に位置することも可能である。

好ましくは、S i m o c t o c o g アルファに基づく、融合タンパク質は、N 末端から C 末端に向かって、F V I I I の重鎖、リンカーの最初の部分、二つ以上の、好ましくは 3 つの延長ペプチド (e x t e n s i o n p e p t i d e) (太字)、リンカーの第 2 の部分 (下線および太字) および軽鎖を含む。

そのようなタンパク質の例は、配列番号 1 4 によって特定されるタンパク質である：

ATTRYYLGAVELSDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSFPFNTSVVYKKTILFVEFTDHLFNIAPRPPWMLLGP
TIQAEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDA
ASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTA
QTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQ
IRSVAKKHPKTWVHYIAAEEDWDYAPLVLPAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQH
ESGILGPLLYGEVGDTLIIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVE
DGPTKSDPRCLTRYSSSFVNMRDLASGLIGPLLCYKESVDQRGNGQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQ
RFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMYVED
TLTLFPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR
SFSQNSRHOEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHQEPG
GLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHRYRRGEEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRS
FQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIR
AEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKYFWKVQHMAPTKDEFCKAWAYF
SDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAGHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTE
KENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETV
EMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPGLMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSIN
AWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGKTQGARQKFSLSYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSG
IKHNIFNPPIIARYIRLHPHTYSISRSTLRMELMGCDLNSCMLPGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKA
RLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVITQGVKSLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKV
FQGNQDSFTFPVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY (SEQ ID NO: 14)

10

20

【 0 0 8 0 】

一つの実施形態によれば、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 1 4 に対して、少なくとも 9 0 % の同一性を有する。融合タンパク質のアミノ酸配列はまた、配列番号 1 4 に対して、少なくとも 9 5 % 同一性を有しても良い。また、融合タンパク質のアミノ酸配列の配列番号 1 4 に対する同一性は、少なくとも 9 8 % でもよい。特に、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 1 4 に対して、1 0 0 % の同一性を有していてもよい。

30

あるいは、S i m o c t o c o g a l f a に基づく融合タンパク質は、S i m o c t o c o g a l f a の C 末端に連結された、2 またはそれ以上の、好ましくは 3 つの延長ペプチド (e x t e n s i o n p e p t i d e) (太字) を含む。そのようなタンパク質の例は、配列番号 2 1 によって特定されるタンパク質である。

一つの実施形態によれば、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 2 1 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する。融合タンパク質のアミノ酸配列はまた、配列番号 2 1 に対して、少なくとも 9 5 % 同一性を有しても良い。また、融合タンパク質のアミノ酸配列の配列番号 2 1 に対する同一性は、少なくとも 9 8 % でもよい。特に、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 2 1 に対して、1 0 0 % の同一性を有していてもよい。

40

【 0 0 8 1 】

ポリヌクレオチド

第 2 の態様によれば、本発明は、本発明の第 1 の態様により、融合タンパク質をコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

単離されたポリヌクレオチドは、DNA 分子または RNA 分子であってもよい。

単離されたポリヌクレオチドは、好ましくは、DNA 分子、特に、c DNA 分子である。

ペプチドをコードするポリヌクレオチドを単離またはクローニングするために使用される技術は、当技術分野で公知であり、そして、ゲノム DNA からの単離、c DNA からの調製、またはそれらの組み合わせを含む。

50

そのようなゲノムDNAからのポリヌクレオチドのクローニングは、たとえば、周知のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または発現ライブラリーの抗体スクリーニングを用いて、共通の構造的特徴を有するクローニングされたDNA断片を検出することによって行うことができる（たとえば、Innisら、1990年）PCR：方法と応用の指針（A Guide to Methods and Application）、Academic Press、New York。

リガーゼ連鎖反応（LCR）、ライゲーション活性化転写（LAT）およびポリヌクレオチドに基づく増幅（NASBA）のような他の核酸増幅手順を用いてもよい。

特に、単離されたポリヌクレオチドの配列は、メインプロテイン（main protein）および少なくとも1つの第2部分配列をコードする第1の部分を含み得る。

10

第1の部分は、好ましくは、配列番号15と類似または同一である。

第1の部分は、好ましくは、配列番号15と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性の程度を有する。

少なくとも1つの第2の部分は、好ましくは、配列番号16と類似または同一である。

【0082】

第2の部分は、好ましくは、配列番号16と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性の程度を有する。

単離されたポリヌクレオチドは、配列番号4、配列番号5、配列番号7、配列番号8、配列番号10、配列番号11、配列番号14および配列番号21からなる群から選択される配列と、類似または同一のアミノ酸配列を有する融合タンパク質をコードするDNA分子であってもよい。

20

特に、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号4に対して、少なくとも90%、好ましくは、少なくとも90%、好ましくは95%、より好ましくは少なくとも98%、最も好ましくは100%のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を有する融合タンパク質をコードするDNA分子であってもよい。

あるいは、単離されたポリヌクレオチドは、少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を有する融合タンパク質をコードするDNA分子であってもよい。

さらに、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号5に対して、少なくとも90%、好ましくは、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも98%、最も好ましくは、100%、の同一性を有するアミノ酸配列を有する融合タンパク質をコードするDNA分子であってもよい。

30

一実施形態によれば、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号7に対して、少なくとも90%、好ましくは、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも98%、最も好ましくは、100%、の同一性を有するアミノ酸配列を有する融合タンパク質をコードするDNA分子である。

一実施形態によれば、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号8に対して、少なくとも90%、好ましくは、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも98%、最も好ましくは、100%、の同一性を有するアミノ酸配列を有する融合タンパク質をコードするDNA分子である。

40

一実施形態によれば、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号10に対して、少なくとも90%、好ましくは、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも98%、最も好ましくは、100%、の同一性を有するアミノ酸配列を有する融合タンパク質をコードするDNA分子である。

一実施形態によれば、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号11に対して、少なくとも90%、好ましくは、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも98%、最も好ましくは、100%、の同一性を有するアミノ酸配列を有する融合タンパク質をコードするDNA分子である。

一実施形態によれば、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号14に対して、少なく

50

とも90%、好ましくは、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも98%、最も好ましくは、100%、の同一性を有するアミノ酸配列を有する融合タンパク質をコードするDNA分子である。

一実施形態によれば、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号21に対して、少なくとも90%、好ましくは、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも98%、最も好ましくは、100%、の同一性を有するアミノ酸配列を有する融合タンパク質をコードするDNA分子である。

【0083】

単離されたポリヌクレオチドは、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20および配列番号22からなる群から選択される配列と類似または同一の配列を有するDNA分子であり得る。

10

一の実施形態によれば、単離されたポリヌクレオチドの1本鎖は、配列番号17に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。

さらなる実施形態によれば、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号18に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。

さらに別の実施形態によれば、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号19に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。

20

【0084】

一の実施形態によると、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号20に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。

一の実施形態によると、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号20に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。

30

一の実施形態によると、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号20に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。

【0085】

ポリヌクレオチド配列のリスト

配列番号15：OCTA 11をコードするDNA（配列番号2のAA 1-1268）

配列番号16：延長ペプチド（extension peptide）をコードするDNA（配列番号1）

40

配列番号17：Pro-OCTA 12をコードするDNA（配列番号5）

配列番号18：Pro-OCTA 14をコードするDNA（配列番号8）

配列番号19：Pro-OCTA 15をコードするDNA（配列番号11）

配列番号20：リンカー領域に3つの延長ペプチド（extension peptide）を有するSimocctocog alfaをコードするDNA（配列番号14）

配列番号22：3つのC末端延長ペプチド（extension peptide）を有するSimocctocog alfaをコードするDNA配列（配列番号21）

【0086】

発現ベクター

50

第3の態様では、本発明はまた、第2の発明の態様による、ポリヌクレオチドを含む発現ベクターに関する。

発現ベクターはさらに、プロモーターのような制御エレメント、および、転写および翻訳停止シグナルを含むことが好ましい。

第2の態様によるポリヌクレオチドおよび制御エレメントのポリヌクレオチドは、一緒に連結して、そのような部位で、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの挿入または置換を可能にする、1つまたは複数の制限部位を含んでいてもよい、組換え発現ベクターを産生することができる。

ポリヌクレオチドは、発現のために、適切な発現ベクターに挿入され得る。

発現ベクターの作製において、コードする配列は、コードする配列が発現のための適切な制御配列と作動可能に連結されるように、発現ベクター内に位置する。

組換え発現ベクターは、組換えDNA手順に好都合に供され得、そして、本発明の第4の態様のポリヌクレオチドの発現をもたらすことができる、任意のベクター（たとえば、プラスミドまたはウイルス）であり得る。

発現ベクターの選択は、典型的には、発現ベクターが導入される宿主細胞との発現ベクターの適合性に依存する。

発現ベクターは、直鎖または閉環プラスミドであってもよい。

発現ベクターは、好ましくは、哺乳動物細胞における発現に適合される。

発現ベクターは、自律複製ベクター（autonomously replicating vector）、すなわち、染色体複製とは独立した染色体外存在物（extrachromosomal entity）、たとえば、プラスミド、染色体外エレメント、ミニ染色体（minichromosome）、または人工染色体、の複製、として存在するベクターであってもよい。

自律的複製のために、ベクターは、ベクターが、問題の宿主細胞において自律的に複製することを可能にする複製起点をさらに含み得る。

【0087】

複製起点は、細胞内で機能する自律複製を媒介する任意のプラスミド複製物（plasmid replicator）であり得る。

用語「複製起点（origin of replication）」または「プラスミド複製物（plasmid replicator）」は、プラスミドまたはベクターが、インピボで複製することを可能にするポリヌクレオチドを意味する。

ベクターは、好ましくは、宿主細胞中に導入される場合、ゲノムに組み込まれ、そして、それが組み込まれた染色体と共に複製されるものである。

宿主細胞のゲノムへの組み込みのために、発現ベクターは、相同組換えまたは非相同組換え（homologous or non-homologous recombination）によるゲノムへの組み込みのために、発現ベクターの任意の他の要素に依存し得る。

あるいは、ベクターは、相同組換えによって、染色体での正確な位置で、宿主細胞のゲノムに組み込むために、追加のポリヌクレオチドを含有してもよい。

本発明のベクターは、好ましくは、形質転換、トランスフェクト、形質導入、細胞などの容易な選択を可能にする1つまたはそれ以上の（たとえば、いくつかの）選択可能なマーカーを含む。

【0088】

選択可能なマーカーは、その産物が、殺生剤またはウイルス耐性、重金属に対する耐性、栄養要求株（auxotrophs）に対する栄養要求性（prototrophy）などを提供する遺伝子である。

本発明の組換え発現ベクターを構築するために、上記のエレメントを連結するために使用される手順は、当業者に周知である（たとえば、Sambrookら、1989年、前掲参照）。

一実施形態によれば、第3の態様によるベクターのベクター・バックボーン（vect

10

20

30

40

50

or backbone) は、pCDNA3、pCDNA3.1、pCDNA4、pCDNA5、pCDNA6、pCEP4、pCEP-puro、pCET1019、pCMV、pEF1、pEF4、pEF5、pEF6、pExchange、pEXPR、pIRES、およびpSCASから選択される。

【0089】

宿主細胞

第4の態様によれば、本発明は、第3の本発明の態様にしたがって、発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。

前述のように、第3の態様による発現ベクターは、発現ベクターが、染色体組込み体(chromosomal integrant)として、または、自己複製染色体外ベクターとして維持されるように、宿主細胞に導入される。

10

用語「宿主細胞」は、複製中に生じる突然変異のために、親細胞と同一ではない親細胞の任意の子孫を包含する。

宿主細胞の選択は、ポリペプチドおよびその供給源をコードする遺伝子に大きく依存するであろう。

【0090】

1つの実施形態によれば、融合タンパク質は、哺乳動物の宿主細胞株における発現によって産生される。

融合タンパク質は、好ましくは、ヒト宿主細胞株において産生される。

一般に、任意のヒト宿主細胞株は、融合タンパク質の発現に適している。

20

融合タンパク質の好ましいグリコシル化は、特に、ヒト腎臓細胞株を用いて、得られる。

好ましいヒト腎臓細胞株は、HEK細胞株、特に、HEK293細胞株である。

グリコシル化ポリペプチドの産生のための、HEK細胞株の例は、HEK 293 F、Flp-In (商標) - 293 (Invitrogen社、R75007)、293 (ATCC (登録商標) CRL - 1573)、293 EBNA、293 H (Thermo Scientific 11631017)、293S、293T (ATCC (登録商標) CRL - 3216 (商標))、293T/17 (ATCC (登録商標) CRL 11268 (商標))、293T/17 SF (ATCC (登録商標) ACS4500 (商標))、HEK 293 STF (ATCC (登録商標) CRL 3249 (商標))、HEK - 293.2sus (ATCC (登録商標) CRL - 1573 (商標)) である。

30

ポリペプチドの産生のための好ましい細胞株は、HEK 293 F細胞株である。

発現のための宿主細胞として適切な他の細胞株には、ヒト骨髄性白血病細胞由来の細胞株が含まれる。

宿主細胞の特定の例は、K562、NM-F9、NM-D4、NM-H9D8、NM-H9D8-E6、NM-H9D8-E6Q12、GT-2X、GT-5s、および前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞である。

K562は、American Type Culture Collection (ATCC CCL - 243) に存在する、ヒト骨髄性白血病細胞株である。

残りの細胞株は、K562細胞に由来し、そして、特異的なグリコシル化の特徴のために選択された。

40

【0091】

融合タンパク質の使用

実施例に示すように、すなわち、たとえば、メインプロテイン(main protein)、すなわち、VWFの断片と比較して、融合タンパク質OCTA 12とOCTA 14における、配列番号1の延長ペプチドは、融合タンパク質の半減期(half-life)の増加を導くだけではない。

融合タンパク質のOCTA 12とOCTA 14はまた、VWFの結合パートナーである、FVIIと一緒に、患者に投与される場合には、FVIIの半減期(half-life)の増加につながる。

従って、第5の態様によれば、本発明は、第2のタンパク質の半減期(half-life)

50

f e)を増加させるための第1の態様にしたがった、融合タンパク質の使用を提供する。ここで、融合タンパク質は、前記第2のタンパク質に結合することができる。

使用はまた、患者に、治療用タンパク質を投与方法として記載される。ここで、その方法は、たとえば、第1の態様にしたがって、融合タンパク質と一緒にF V I I Iタンパク質のような、治療用タンパク質を投与することを含む。

【0092】

組成物およびタンパク質複合体

したがって、本発明によるコンセプト、すなわち、延長ペプチド(e x t e n s i o n p e p t i d e)によって提供される半減期(h a l f - l i f e)の延長は、融合タンパク質に限定されるものではなく、追加で、融合タンパク質によって結合される第2のタンパク質の半減期(h a l f - l i f e)も拡張され得る。

10

したがって、第6の態様によれば、本発明は、第1のタンパク質および第2のタンパク質の組成物を提供する。ここで、前記第1のタンパク質は、第1の態様の融合タンパク質であり、そして、前記第2のタンパク質に結合することが可能であり、そして、前記第2のタンパク質は、第2の哺乳動物タンパク質またはその断片のアミノ酸配列と、同一または類似であるアミノ酸配列を含む治療用タンパク質である。

第1のタンパク質は、共有結合または非共有結合で、第2のタンパク質に結合して複合体を形成し得る。

したがって、本発明はまた、第1のタンパク質と第2のタンパク質の複合体に関する。ここで、前記第1のタンパク質は、第1の態様による融合タンパク質であり、そして、前記第2のタンパク質は、第2の哺乳動物タンパク質またはその断片のアミノ酸配列と同一または類似のアミノ酸配列を有する。

20

したがって、複合体は、第1のタンパク質を第2のタンパク質に、非共有結合によって、結合することによって形成される。

1つの実施形態によれば、第1のタンパク質は、共有結合的に第2のタンパク質に結合する。

第1および第2のタンパク質の結合を促進するリンカーは、ジスルフィド架橋、ペプチド結合、化学的リンカー、またはグリコシド結合から選択することができる。

あるいは、第1のタンパク質は、非共有結合的に、第2のタンパク質に結合する。

非共有結合について、第1のタンパク質は、特に、前記第2のタンパク質、すなわち、第2のタンパク質結合ドメインに結合することを可能にする特異的な結合ドメインを含む。

30

第1のタンパク質の配列における、一つまたはそれ以上の延長ペプチド(e x t e n s i o n p e p t i d e)の配置に依存して、第1のタンパク質の異なる位置に配置することができる。

好ましくは、一つまたはそれ以上の延長ペプチド(e x t e n s i o n p e p t i d e)は、タンパク質の折り畳まれた状態で、表面に曝される位置に配置される。

一つまたはそれ以上の延長ペプチドは、たとえば、結合ドメインのような第2のタンパク質の結合部位に関連する、任意の位置に配置することができる。

組成物の一実施形態によれば、一つまたはそれ以上の延長ペプチド(e x t e n s i o n p e p t i d e)は、第1のタンパク質が第2のタンパク質に結合するのを妨げない、第1のタンパク質の折り畳まれた状態の位置に配置される。

40

一の実施形態によれば、第1のタンパク質(たとえば、V W Fの断片)に結合された、第2のタンパク質(たとえば、F V I I I)の半減期(h a l f - l i f e)は、第2のタンパク質(たとえば、F V I I Iのタンパク質)の遊離の形態と比較して増加される。

好ましくは、第1のタンパク質(たとえば、O C T A 12)に結合された、第2のタンパク質(たとえば、F V I I Iのタンパク質)の半減期(h a l f - l i f e)は、天然の哺乳動物のタンパク質(たとえば、成熟したV W F)に結合された、前記第2のタンパク質と比較して増加される。

より好ましくは、第1のタンパク質(たとえば、O C T A 12)に結合された、第2のタンパク質(たとえば、F V I I Iのタンパク質)は、融合タンパク質(たとえば、O

50

C T A 11) を有しないメインプロテイン (main protein) に結合された、前記第2のタンパク質と比較して増加される。

第2の哺乳動物のタンパク質は、上記哺乳動物のタンパク質について同定されたのと同じリストから選択され得る。

しかしながら、組成物または複合体において、第2の哺乳動物のタンパク質は、第1の哺乳動物のタンパク質と同じではない。

【0093】

一実施形態によれば、第2の哺乳動物のタンパク質は、血液タンパク質、特に、ヒト血液タンパク質である。

好ましくは、第2の哺乳動物のタンパク質は、凝固因子、特にヒト凝固因子である。

一の実施形態によれば、メインプロテイン (main protein) が、類似または同一である、第2の哺乳動物タンパク質は、UniProtKB P00451.1の20~2351のアミノ酸によって特定されたヒト全長FVIIIIである。

別の実施形態によれば、メインプロテイン (main protein) はFVIIIIであり、ここで、Bドメインの少なくとも一部が欠失している。

これに関して、Bドメイン全体が欠失していてもよい。

B領域の欠失部分は、必要に応じて、リンカーに置き換えられる。

リンカー配列は、特に、以下のアミノ酸配列SFSQNSRHQA Y R Y R R G (配列番号12) を有する。

Bドメインが、リンカーによって置換された、FVIIIIの例は、Nuwiq (登録商標) またはVihuma (登録商標) の有効成分である、Simoc toc cog a l f a (配列番号13) である。

【0094】

一実施形態によれば、FVIIIIタンパク質は、患者において免疫応答が低下したヒトFVIIIIタンパク質である。

FVIIIIタンパク質の免疫応答の低下は、好ましくは、SIGLECs SIG-5、SIG-7、SIG-8およびSIG-9への結合に基づく。

理論に束縛されることを望まないが、抗原提示細胞 (たとえば、樹状細胞など) 上のSIGLECsへの結合は、細胞表面上で、炎症誘発性のダウンレギュレーションおよびの免疫抑制受容体発現のアップレギュレーションを齎す、ということが信じられている。

また、結合は、抗炎症性サイトカインの増強された産生をもたらす、炎症誘発性のサイトカインの産生を低減し、およびその結果、T細胞増殖および抗体産生の阻害を齎す。

したがって、グリコシル化されたポリペプチドが患者に投与された場合、SIGLECs、SIG-5、SIG-7、SIG-8およびSIG-9の結合は、免疫応答の低下または免疫寛容の増加を齎す。

【0095】

SIGLEC結合、そして、その結果、減少した免疫応答は、天然に存在するヒトFVIIIIのシアリル化コア2および/または拡張コア1 O-グリカンの数と比較して、シアリル化コア2および/または拡張コア1 O-グリカンの増加した数またはパーセンテージに基づく。

したがって、一実施形態によれば、FVIIIIタンパク質は、天然のヒトFVIIIIのシアリル化されたコア2および/または拡張されたコア1 O-グリカンの数と比較して、グリコシル化されたタンパク質において、シアリル化されたコア2および/または拡張されたコア1 O-グリカンの増加した数またはパーセンテージを示す。

第2のタンパク質がFVIIIIタンパク質である場合において、第1のタンパク質のメインプロテイン (main protein) は、好ましくは、FVIIIIタンパク質に結合することができるようにする、FVIIII結合ドメインを含む、VWFの断片である。

組成物の一実施形態によれば、第1のタンパク質は、配列番号3に対して、少なくとも95%、好ましくは、少なくとも98%、より好ましくは100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、そして、第2のタンパク質は、配列番号13に対して、少なくとも95

10

20

30

40

50

%、好ましくは、少なくとも98%、より好ましくは100%の同一性を有するアミノ酸を有する。

【0096】

組成物の一実施形態によれば、第1のタンパク質は、配列番号6に対して、少なくとも95%、好ましくは、少なくとも98%、より好ましくは100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、そして、第2のタンパク質は、配列番号13に対して、少なくとも95%、好ましくは、少なくとも98%、より好ましくは100%の同一性を有するアミノ酸を有する。

組成物の一実施形態によれば、第1のタンパク質は、配列番号9に対して、少なくとも95%、好ましくは、少なくとも98%、より好ましくは100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、そして、第2のタンパク質は、配列番号13に対して、少なくとも95%、好ましくは、少なくとも98%、より好ましくは100%の同一性を有するアミノ酸を有する。

10

患者の血液において、VWFの断片、特に、OCTA 12を含む融合タンパク質は、FVIIITタンパク質への結合において、内因性VWFと競合するので、組成物は、VWFの断片、特に、OCTA 12を、FVIIITタンパク質と比較して、モル過剰で、含む、融合タンパク質を含むことが好ましい。

好ましくは、第1のタンパク質対第2のタンパク質のモル比は、0.1~250の範囲、好ましくは0.5~50の範囲、より好ましくは1~25の範囲、最も好ましくは2~10の範囲である。

20

安定な非共有結合した複合体形成するため、そして、従って、第2のタンパク質の半減期(half-life)の延長を許容するため、平衡解離定数(K_D)によって定義された、第1のタンパク質の、第2のタンパク質に対する、結合親和性は、10 μ M未満であるべきである。

好ましくは、FVIIITタンパク質に対する、第1のタンパク質におけるVWF断片の平衡解離定数は、0.05~3 nMの範囲である。

【0097】

第1および第2のタンパク質は、別々の組換え発現によって産生され得、そして、その後、結合され得る。

あるいは、第1および第2のタンパク質は、同じ細胞内で組換え(recombinantly)発現される。

30

このために、第1および第2のタンパク質は、同じベクターまたは2つの異なるベクターでコードされてもよい。

実施例で使用されるVWFの構築物(VWF constructs)、すなわち、OCTA 12、OCTA 14およびOCTA 15は、それらのプロタンパク質の形態で発現され、二量体形成に導くか、または、OCTA 15の場合には、多量体形成に導く。これらの二量体は、プロペプチドの切断後でさえ無傷のままであり、そして、その結果、二量体中のVWF構築物のコピーの各々が、FVIIITタンパク質に結合することができる。

したがって、一実施形態によれば、複合体は、第1および第2のタンパク質の2つのコピーを含み、ここで、第1タンパク質の2つのコピーは二量体を形成する。第1のタンパク質のこの二量体は、好ましくは非共有結合の二量体である。

40

【0098】

医薬組成物および医薬用途

以上のように、本発明の第1の態様の融合タンパク質、第6の態様の組成物および第7の態様の複合体は、患者の血液中の半減期(half-life)が長くなり、そして、それゆえ、患者の治療効果が増大するという利点を有する。

したがって、第1の態様の融合タンパク質、第6の態様の組成物、および第7の態様の複合体は、特に、治療のための活性成分として有用である。

好ましくは、それらは出血障害の治療または予防に有用である。

50

本明細書に記載された、第1の態様の融合タンパク質、第6の態様の組成物、特にタンパク質複合体は、単独で、または医薬組成物の形態で投与することができる。

したがって、第8の態様によれば、本発明は、第1の態様の融合タンパク質の医薬組成物、第6の態様の組成物および、第7の態様に係る複合体を提供する。

本発明によれば、医薬組成物は、少なくとも一つの薬学的に許容される担体と共に製剤化された、第1の態様の融合タンパク質、第6の態様の組成物および、少なくとも一つの薬学的に許容される担体で製剤化された第7の態様の複合体の有効量を含んでいてもよい。

【0099】

実施形態の医薬組成物は、薬学の分野において周知の任意の方法によって調製され、被験体に投与され得る。

10

たとえば、以下を参照してください。

グッドマン・アンド・ギルマン (Goodman & Gilman) の「The Pharmacological Basis of Therapeutics」、Hardmanら編、McGraw-Hill Professional (第10版、2001年)；レミントン (Remington)：The Science and Practice of Pharmacy 薬学の科学と実践、ジェンナロ編、Lippincott Williams & Wilkins (第20版、2003年)；および

薬学的投薬形態および薬物送達システム Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems、Anselら (編)、Lippincott Williams & Wilkins (7版、1999年)。

20

【0100】

さらに、実施形態の医薬組成物は、他の医学的に有用な薬物または生物学的薬剤を含むように製剤化することもできる。

医薬組成物は、典型的には、薬学的に許容される担体と組み合わせて、治療上有効な量の融合タンパク質をまたはタンパク質複合体を含む。

薬学的に許容される担体は、当技術分野で公知または確立された任意の担体である。

例示的な薬学的に許容される担体は、無菌の発熱物質を含まない水および無菌の発熱物質を含まない生理食塩水を含む。

本実施形態に利用できる他の形態の薬学的に許容される担体には、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、吸収促進剤、保湿剤、吸収剤、潤滑剤、充填剤、増量剤、湿気付与剤、保存剤、安定剤、乳化剤、溶剤、浸透圧を制御する塩、緩衝剤のような希釈剤、および、製剤の使用形態に応じて通常使用される賦形剤を含む。

30

これらは、得られる製剤の単位用量に応じて、所望により選択して使用される。

したがって、本発明の第9の態様はまた、患者の出血性疾患の治療または予防の方法に関し、この方法は、第8の態様に係る医薬組成物を、前記患者に投与することを含む。

【0101】

本明細書で使用される「出血性障害」は、正常な止血を損なう疾患または状態を指す。出血性障害は、たとえば、血友病A、血友病B、第V I I I 因子欠乏症、第X I 因子欠損症、フォン・ウィルブラント病、グランツマン症候群 (Glanzmann's Thrombasthenia)、バーナード・スーリエ症候群、特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura)、大脳内出血、外傷、外傷性脳損傷などであり得る。

40

本明細書で使用される「血友病」は、血友病のない健康な個体における血餅 (blood clot) 形成時間と比較して血餅 (blood clot) 形成時間の増加に関連する出血障害の群を指す。

【0102】

血友病は、欠陥第V I I I 因子の産生をもたらす障害である血友病A、欠陥第I X 因子の産生をもたらす障害である血友病B、および、凝固因子 (F) V I I I に対する自己抗体によって引き起こされる稀な出血性疾患である後天性血友病Aを含む。

出血性障害は、好ましくは、血友病AまたはBである。

50

治療は、たとえば、P U P S（以前に未治療の患者）の血友病治療または免疫寛容誘導（I T I）治療および／または血友病の他の関連治療であり得る。

インビボ用途では、医薬組成物は、たとえば、経口的に、非経口的に、または吸入のような、任意の慣用の投与経路によって、患者に投与することができる。

非経口投与は、静脈内注射、皮下注射、腹腔内注射、筋肉内注射、液剤、懸濁剤、乳剤および滴下剤を含む。

非経口投与のためには、医薬組成物は、液剤または懸濁液などの注入可能な薬剤でなければならない。

他の実施形態では、医薬組成物は、患者に経口投与される。

これらの実施形態では、薬物の形態は、錠剤、被覆錠剤、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤および丸剤などの固体制剤、液剤（たとえば点眼剤、点鼻剤）、懸濁剤、乳剤およびシロップ剤などの液体剤、エアロゾル剤、アトマイザーおよびネブライザーなどの吸入剤、およびリポソーム封入剤を含む。

10

さらにいくつかの他の実施形態では、グリコシル化ポリペプチド、タンパク質複合体または医薬組成物は、被験者の気管および／または肺を標的とするために、患者の気道への吸入によって投与される。

第8の態様の一の実施形態によれば、使用は、静脈内または非静脈内注射を含む。

非静脈内注射は、好ましくは皮下注射である。

この開示に引用されているすべての刊行物および特許は、その全体が参考として援用される。

20

参照により組み込まれる資料が、本明細書と矛盾するかまたは不一致である限り、本明細書はそのような資料よりも優先する。

【0103】

実施例

実施例1

VWFタンパク質の組換え発現

以下の組み換えVWFタンパク質を、C末端Streptagを有するHEK細胞株293F中で一時的に発現させ、StrepTactinアフィニティークロマトグラフィー（IBA GmbH）によって精製した。

- OCTA 11

30

- OCTA 12

OCTA 12は、本発明による融合タンパク質である。

OCTA 11は、比較用のVWF断片である。

VWFタンパク質は、図1に、概略的に示されている。

Pro-タンパク質の発現は二量体の形成をもたらす。

ペプチド二量体は、プロペプチドの切断後にも残る。

【0104】

遺伝子の合成とクローニング

最初のステップとして、VWFタンパク質のプロタンパク質をコードする遺伝子は、GeneArt（サーモ フィッシャー サイエンティフィック）によって合成された。

40

- Pro-OCTA 11

- Pro-OCTA 12

プロタンパク質をコードする遺伝子を、Twin-Streptagを含む、pDSG発現ベクター（IBA GmbH）にクローニングした。

TOP10大腸菌（IBA GmbH）の個々の培養物を、ベクター構築物で形質転換し、そして、アンピシリン含有LB寒天プレート上で、37℃で、一晚インキュベートした後、単クローンを選択した。

プラスミドDNAの調製は、QIAamp DNA MiniまたはMaxiキット（Qiagen）を用い、製造者の推奨に従って行った。

シーケンシングによって、ベクターの完全性が確認された。特に、Pro-OCTA

50

11、Pro-OCTA 12をコードする遺伝子の、正しいオリエンテーション (orientation) と完全性が検証された。

【0105】

タンパク質発現

VWFタンパク質の真核生物における発現のために、MEXi トランスフェクション培地 (IBA GmbH) で増殖させた、MEXi-293細胞 (IBA GmbH) を、4.5 mg/ml の25 kDaの直線状ポリエチレンイミンを用いた、構築物 (constructs) 1.5 mg/l でトランスフェクトした。

37 で、5% CO₂ および100 - 150 rpmで、2 ~ 4時間インキュベートした後、培養物を、MEXi トランスフェクション培地で、1:2に希釈し、そして、細胞生存率が75%に達するまで培養を続けた。

10

その後、上清を、4 で、300 × gで遠心分離して細胞から分離した。細胞培養培地中のビオチンの阻害効果を最小にし、そして、pHを調整するために、0.1容量の緩衝液 (1M Tris-HCl、1.5 mMのNaCl、10 mMのEDTA、pH 8.0) および0.09% (v/v) BioLock溶液 (IBA GmbH) を上清に加え、そして、4 で、20分間インキュベートした。

【0106】

タンパク質の精製

遠心分離後、上清を、Strep-Tactin XTカラム (IBA GmbH) にアプライし、洗浄緩衝液 (100 mM Tris-HCl、150 mMのNaCl、1 mMのEDTA、pH 8.0) で、5回洗浄し、そして、結合したStrep-タグ含有タンパク質を、溶出緩衝液 (100 mM Tris-HCl、150 mMのNaCl、1 mMのEDTA、10 mMのデスチオビオチン、pH 8.0) で溶出した。

20

【0107】

実施例 2

FVIIII/VWFダブルノックアウト (DKO) マウスに、FVIIIIを、同時投与したときの、完全長VWFまたはVWFタンパク質の、FVIIIIの半減期 (half-life) に対する影響

【0108】

2.1 背景

30

この実験で、実施例 1 にしたがって製造したVWFタンパク質および完全長の、血漿由来のVWF (pdVWF) のFVIIIIの半減期 (half-life) に対する効果を試験した。

完全長VWFおよびFVIIIIは、非共有結合複合体を形成する結合パートナーであることが知られている。

循環中のFVIIIIの半減期 (half-life) は、主に、VWFの循環半減期 (half-life) によって決定される。

血清において、内因性VWFは、投与されたVWFタンパク質 (断片) とFVIIIIとの結合において競合するので、この競合は、FVIIIIの半減期 (half-life) に対して、投与されたVWFタンパク質の任意の影響を及ぼすであろう。

40

したがって、本実験では、FVIIIIおよびVWF (FVIIII/VWF-DKO) のダブルノックアウトであるC57Bl/6マウスを、FVIIIIの半減期 (half-life) に対するVWFの影響を評価するためのモデル生物として使用した。

【0109】

2.2 実験手順

2.2.1 FVIIIIを含む製品

以下のFVIIII含有製品が生産された：

1) FVIIII単独

2) FVIIIIおよびOCTA 11

3) FVIIIIおよびOCTA 12

50

4) F V I I I と p d V W F

V W F のタンパク質 O C T A 1 1 と O C T A 1 2 は、実施例 1 に記載したように製造した。

p d V W F は、V W F 濃縮物、「W i l a t e」（オクタファルマ）であった。

F V I I I は、B ドメイン削除のヒト細胞株 F V I I I（N u w i q、オクタファルマ O c t a p h a r m a）であった。

N u w i q 製品は、以下の緩衝液組成物を含有する：

【0110】

アルギニン塩酸塩	25.6 mM
スクロース	15.8 mM
N a C l	308 mM
ブルコニック F 6 8	0.14 mM
クエン酸ナトリウム	3.6 mM
塩化カルシウム	2.0 mM

10

F V I I I を含む製品 2) ~ 4) における、F V I I I に対する、V W F タンパク質のモル比は 5 : 1 であった。

V W F のタンパク質が、N u w i q 製品 (F V I I I) に添加された。

【0111】

2.2.2 F V I I I / V W F - D K O マウス株

F V I I I および V W F がダブルノックアウト (F V I I I / V W F - D K O) の、C 5 7 B 1 / 6 マウスを使用した。

20

【0112】

2.2.3 製品の投与

4 つの F V I I I を含有する製品が、20 匹の F V I I I / V W F - D K O マウスに、尾静脈注によって、240 IU F V I I I / キログラム (~ 6 IU / 1 匹のマウス) の用量で投与された。

【0113】

2.2.4 サンプルングと解析

マウスの血液試料を、F V I I I を含む製品で処理した後、5 分および 1、4、8、12、24、36 および 48 時間で採取した。血液サンプルは、マウスの後眼窩叢から得た。各時点について、F V I I I 含有製品あたり、5 匹のマウスからの血液試料を得て、そして、個々に分析した。

30

各マウスを 5 分の時点、そして、最大で 2 つのさらなる時点で、サンプルングした。各血液試料中の、F V I I I 活性を、発色アッセイ (クロモゲニックス C H R O M O G E N I X) を用いて分析した。

【0114】

2.3 結果

血液試料中の F V I I I 活性値を用いて、F V I I I 含有製品の各々についての F V I I I 活性の時間経過を、図 2 に示すように決定した。

各時点および F V I I I 含有製品について、5 匹の動物の血液試料を測定した。図 2 のダイアグラムにおける各データポイントは 5 つの値の平均を表す。

40

さらに、個々の時点での F V I I I 活性は、処置の 5 分後の % F V I I I 活性として与えられ、これは、F V I I I 含有製品のそれぞれに対して 100 % 活性として定義された。

5 つの製品における F V I I I の半減期は、個々の血漿濃度 - 時間曲線の対数線形部分の線形回帰分析 (l i n e a r r e g r e s s i o n a n a l y s i s o f t h e l o g - l i n e a r p o r t i o n) を用いて、カーブフィッティング (c u r v e f i t t i n g) 後に、または一相指数関数的減衰モデル (n o n - l i n e a r r e g r e s s i o n u s i n g o n e - p h a s e e x p o n e n t i a l d e c a y m o d e l) を用いて非線形回帰によって、計算された。

計算のために使用されるソフトウェアプログラムは、グラフパッド・プリズムバージョン

50

ン 6 . 0 7 (G r a p h P a d P r i s m v e r s i o n 6 . 0 7) (ラ ・ ホ ヤ 、 C A 9 2 0 3 7 、 米 国) と ウ ィ ン ノ ン リ ン (W i n N o n l i n) 、 バ ー ジ ョ ン 6 . 4 (フ ァ ー サ イ ト 社 (P h a r s i g h t) 、 マ ウ ン テ ン ビ ュ ー 、 C A 、 米 国) で あ る 。 計 算 は 次 の 式 に 基 づ く 。

$$t_{1/2}^1 = \frac{\ln 2}{K_{el}} \quad [h]$$

$$\frac{dc}{dt} = K_{el} \cdot c \quad [h]$$

10

K_{el} = 排除速度定数 (e l i m i n a t i o n r a t e c o n s t a n t)

$t_{1/2}$ = 排出半減期 (e l i m i n a t i o n h a l f - l i f e)

c = 濃度

t = 時間

その結果を表 1 にまとめる。

【 0 1 1 5 】

20

表 1 . D K O マウスにおける、F V I I I の終末半減期
(t e r m i n a l h a l f - l i f e)

F V I I I 含有製品	$t_{1/2}$ [h]
1) F V I I I 単独	0 . 0 7
2) F V I I I および O C T A 1 1	0 . 4 5
3) F V I I I および O C T A 1 2	1 . 0 3
4) F V I I I および f l V W F	0 . 3 2

30

これらの数字から、F V I I I と V W F タンパク質のいずれかとの共投与が半減期 (h a l f - l i f e) の増加をもたらすことは明らかである。

F V I I I を p d V W F と共に共投与すると、F V I I I の半減期 (h a l f - l i f e) は、 ~ 4 . 6 倍の増加を齎す (0 . 3 1) 。

V W F のタンパク質 O C T A 1 1 と同時投与した F V I I I は、 0 . 4 5 時間 (約 1 . 4 倍増加) の半減期 (h a l f - l i f e) に匹敵する増加を示した。

40

【 0 1 1 6 】

驚くべきことに、V W F のタンパク質 O C T A 1 2 との同時投与は、 1 . 0 3 時間の F V I I I 半減期 (h a l f - l i f e) を与え、それは、f l V W F と比較して、約 3 . 2 倍の増加を表す。そのファクターは、F V I I I と比較したとき、 1 4 . 7 倍である。

O C T A 1 2 に存在する、追加の O - グリカン反復は、V W F 断片と、次いで V W F / F V I I I 複合体に対して、顕著な半減期 (h a l f - l i f e) を延長させる効果を齎すことを、この結果は示す。

また、この結果は、真性 O - グリカンのクラスターのコピーの追加が、タンパク質の半減期 (h a l f - l i f e) を増加させることができることを示す。

【 0 1 1 7 】

50

実施例 3

ミニブタに、I Vおよび皮下注射 (S Q) した後の、F V I I IおよびV W F O C T A 1 2の薬物動態プロファイル

【 0 1 1 8 】

3 . 1 背景

薬剤の S Q 送達は、凝固因子の分野においてますます興味深くなっている。しかし、非常に低い回収のために、このルートは、F V I I Iの投与のために、まだ適用可能ではなかった。

ミニブタは、表皮のヒトの構造に非常に類似しているため、薬物の S Q 投与を試験するための最もよく知られた動物モデルである。

10

この実験の目的は、S Qルートを介して、ミニブタに、単独で、またはO C T A 1 2を、5 倍モル過剰に投与した場合に、V W F O C T A 1 2およびF V I I Iの半減期 (h a l f - l i f e) の評価であった。

さらに、従来のI V経路を介して単独で投与された場合の、F V I I Iの半減期 (h a l f - l i f e) を、V W F O C T A 1 2を含むまたは含まない、S Qで投与されたF V I I Iと比較した。

【 0 1 1 9 】

3 . 2 実験手順

1 0 ~ 1 4 カ月齢の9 匹のメスのA a c h e n e rミニブタをこの研究に使用した。体重は、1 3 . 7 ~ 1 9 . 5 k gであった。

20

I V注入は、側耳静脈 (t h e l a t e r a l e a r v e i n) で行われ、S Q注入は、鼠径部 (i n g u i n a l r e g i o n) の皮膚下であった。

用量は、1 0 0 U F V I I I / k g 体重 (B W) であり、1 群あたり3 匹の動物を各製品で処置した：

- グループ 1 : F V I I I 単独 S Q
- グループ 2 : O C T A 1 2 と F V I I I S Q
- グループ 3 : F V I I I 単独 I V

動物およびサンプリング時間当たり、2 × 2 0 0 μ L のクエン酸ナトリウム血漿を得るために、それぞれ、以下の時点 (0 (投与前) 、投与後、0 . 5 、1 、2 、4 、8 、2 4 、3 2 、4 8 、7 2 、9 6 および1 2 0 時間後) で、十分な血液を全ての動物の頸静脈 (v e n a j u g u l a r i s) から採取した。

30

全血液を、抗凝固剤として、クエン酸ナトリウム (0 . 1 5 M) を含むチューブに採取し、そして、I s o T h e r m - R a c k システム (エッペンドルフ) を用いて直ちに冷却した。

採血から3 0 分以内に、遠心分離により血漿を分離した。

遠心分離の直後に、血漿サンプルを凍結させ、そして、運搬まで、- 2 0 以下で保存した。

各試料を、A s s e r a c h r o m アッセイキット (D i a g n o s t i c a S t a g o) を用いて、F V I I I 抗原について試験した。

O C T A 1 2 を、以下のように、E L I S A アッセイを用いて定量した：S t r e p - T a c t i n (登録商標) X T 被覆マイクロプレート (I B A G m b H) をブロッキング緩衝液 (P B S 中の1 % B S A) で、R T で、2 時間ブロックした。

40

血漿試料を、ブロッキングバッファー (b l o c k i n g b u f f e r) 1 : 1 5 で希釈し、そして、プレート上に適用した。

3 7 で2 時間インキュベートした後、V W F 断片を、抗 V W F p A b (D a k o P 0 2 2 6) で検出した。

各インキュベーションの後、プレートをP B S 中の0 . 1 % T w e e n で3 回洗浄した。

分析データの薬物動態学的評価を、ウィンノンリン (W i n N o n l i n) 、バージョ ン 6 . 4 (ファーサイト社 (P h a r s i g h t C o r p o r a t i o n) 、マウンテンビュー (M o u n t a i n V i e w) 、C A 、米国) を使用して行った。

50

【 0 1 2 0 】

3 . 3 結果

図 3 は、F V I I I / V W F O C T A 1 2 混合物の S Q 投与後、ミニブタ血漿中の V W F O C T A 1 2 の濃度の経時変化を示す。

表 2 にまとめたように、O C T A 1 2 は、2 1 9 . 3 1 の半減期 (half-life) で循環した。

半減期 (half-life) は、実施例 2 に記載したように測定した。

【 0 1 2 1 】

表 2 . ミニブタにおける V W F O C T A 1 2 抗原の薬物動態パラメータ値は、
3 匹の動物の平均 ± S D を表す。

O C T A 1 2 抗原の薬物動態パラメータ			
グループ／ 投薬量／ ルート	C _{max} [nM]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]
グループ 2 : 1 0 0 U / k g B W O C T A 1 2 を含む F V I I I S Q	0 . 9 3 ± 0 . 3 8	8 . 0 0	2 1 9 . 3 1

C_{max} 最高測定血漿濃度

t_{max} C_{max} の時間

t_{1/2} 終末相半減期 (half-life)

【 0 1 2 2 】

フォン・ヴィレブランド病 (von Willebrand disease) (V W D) のブタにおいて、完全長の組換えヒト (r h V W F) の半減期 (half - l i f e) は、 ~ 1 0 から 1 6 時間であり、そして、血漿由来のブタの V W F の半減期 (half - l i f e) は、 1 0 ~ 1 8 時間である (ニコルズら) 。

F V I I I 結合ドメインのみを含む V W F 断片の半減期 (half - l i f e) は、 Y e e らによって示されるように、 V W F 欠損マウスにおいて、 f l V W F の半減期 (h a l f - l i f e) より短い。

したがって、O C T A 1 2 の半減期 (h a l f - l i f e) は、ブタにおける、 r h V W F の半減期 (h a l f - l i f e) よりも、約 1 4 ~ 2 2 倍長い
さらに、F V I I I 半減期 (h a l f - l i f e) に対する有意な延長効果もまた、観察された。

図 4 に示され、そして、表 3 に纏められたように、O C T A 1 2 と一緒に投与されたとき、F V I I I は、 2 5 . 3 時間の半減期 (h a l f - l i f e) を有する。これは、同じルート (S Q) を介して、単独で投与された F V I I I と比較した場合の半減期 (h

a l f - l i f e) において、減期で 6 . 7 倍の増加、そして、従来の I V 経路を介して単独で投与された F V I I I と比較した場合の 3 . 9 倍の改善を示した。

【 0 1 2 3 】

表 3. ミニブタにおける F V I I I 抗原の薬物動態パラメータ値は 3 匹の動物の平均 $\pm$ S D を表す

F V I I I 抗原の薬物動態パラメータ			
グループ/ 投薬量/ ルート	C_{max} [U/mL]	t_{max} [h]	$t_{1/2}$ [h]
グループ 1 : 100 U/kg BW、F V I I I 単独 S Q	0.03 ± 0.015	8.00	3.78 ± 1.31
グループ 2 : 100 U/kg BW、O C T A 1 2 を含む F V I I I S Q	0.178 ± 0.09	8.00	25.30 ± 11.24
グループ 3 : F V I I I 単独 I V	2.56 ± 0.26	1.00	6.45 ± 2.32

10

【 0 1 2 4 】

多くの改変および本明細書に記載された発明の他の実施形態は、前述の説明および関連する図面において提示された教示の利益を有することを、本発明が関係する当業者は理解するであろう。

20

したがって、本発明は、開示された特定の実施形態に限定されるものではなく、そして、修飾および他の実施形態は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されることを理解されたい。

本明細書では特定の用語を使用しているが、それらは一般的かつ説明的な意味でのみ使用され、限定のためではない。

【 0 1 2 5 】

参考文献

Birken S, Canifield RE. Isolation and amino acid sequence of COOH-terminal fragments from the beta subunit of human choriogonadotropin. J Biol Chem. 1977; vol. 252 pg. 5386-5392

30

Ewenstein BM, Collins P, Tarantino MD, Negrier C, Blanchette V, Shapiro AD, Baker D, Spotts G, Sensel M, Yi SE, Gomperts ED. Hemophilia therapy innovation development of an advanced category recombinant factor VIII by a plasma/albumin-free method Proceedings of a Special Symposium at the XIXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis; 2004, vol. 41, pg. 1-16.

Fischer B, Mitterer A, Schlokot U, DenBouwmeester R, Dorner " Structural analysis of recombinant von Willebrand factor: identification of hetero- and homo-dimers " FFEBS Lett. 1994 Sep 12;351(3):345-8. Erratum in: FEBS Lett 1994 Oct 24;353(3):337.

40

Furlan M. " Von Willebrand factor: molecular size and functional activity " Ann Hematol. 1996 Jun;72(6):341-8.

Kannicht C, Ramstrom M, Kohla G, et al. Characterisation of the post-translational modifications of a novel, human cell line-derived recombinant human factor VIII. Thromb Res. 2013;131(1):78-88.

Needleman SB, Wunsch CD. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J Mol Biol. 1970; vol. 48(3); pg. 443-453.

Nichols TC, Bellinger DA, Merricks EP, et al. Porcine and Canine von Willebra

50

nd Factor and von Willebrand Disease: Hemostasis, Thrombosis, and Atherosclerosis Studies. Thrombosis. 2010;2010:461238.

Strohl WR. Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. BioDrugs. 2015 Aug; vol. 29(4), pg. 215-239.

Tiede A. Half-life extended factor VIII for the treatment of hemophilia A. J Thromb Haemost. 2015 Jun; vol. 13 Suppl 1; pg. S176-179

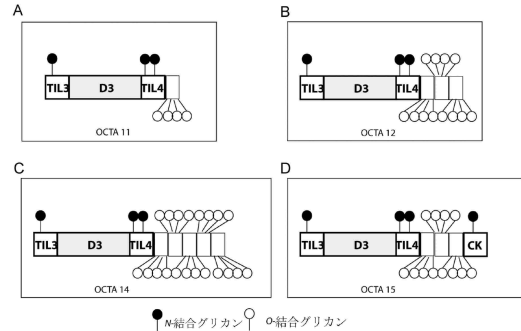
Vlot AJ, Koppelman SJ, Meijers JC, Dama C, van den Berg HM, Bouma BN, Sixma JJ, Willems GM. Kinetics of factor VIII-von Willebrand factor association. Blood. 1996 1; vol. 87(5); pg. 1809-1816

Yee A, Gildersleeve RD, Gu S, Kretz CA, McGee BM, Carr KM, Pipe SW, Ginsburg D. A von Willebrand factor fragment containing the D'D3 domains is sufficient to stabilize coagulation factor VIII in mice. Blood. 2014 Jul 17; vol. 124(3); pg. 445-452.

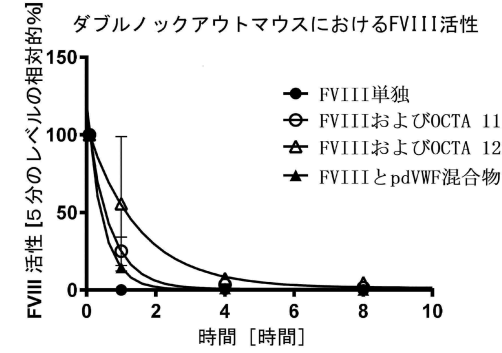
Innis et al, 1990 PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York.

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

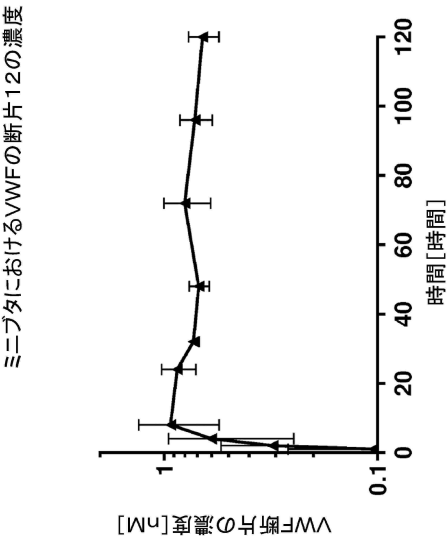
20

30

40

50

【図 3】



【配列表】

0007626514000001.app

【図 4】

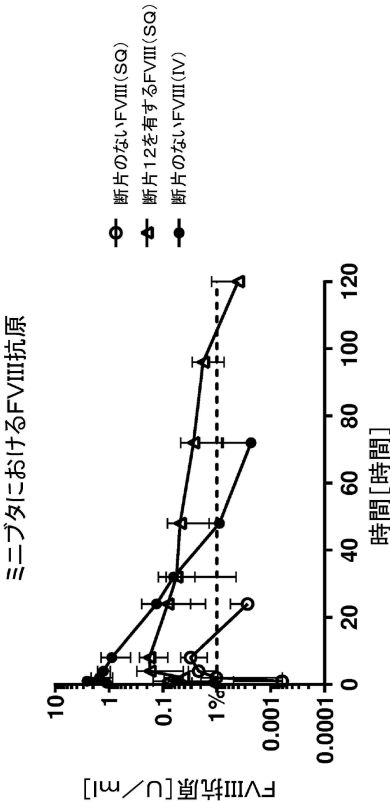


図 4

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/64	
A 6 1 K	47/65	(2017.01)	A 6 1 K	47/65	
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	
C 0 7 K	14/745	(2006.01)	C 0 7 K	14/745	
C 0 7 K	14/75	(2006.01)	C 0 7 K	14/75	
C 0 7 K	14/755	(2006.01)	C 0 7 K	14/755	
C 0 7 K	14/81	(2006.01)	C 0 7 K	14/81	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
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 N	15/70	(2006.01)	C 1 2 N	15/70	Z
C 1 2 N	15/85	(2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	

欧州特許庁(EP)

2 トル ロングハルスヴェーイエン 1 7

(72)発明者

シュヴィーンテック ティロ

ドイツ連邦共和国 4 1 4 6 8 ノイス クーヴェーク 1 3

合議体

審判長 福井 悟

審判官 北田 祐介

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献

特表平 7 - 5 0 3 3 6 9 (J P , A)

特表平 7 - 5 0 3 3 6 8 (J P , A)

特表 2 0 1 2 - 5 2 2 4 9 0 (J P , A)

特表 2 0 1 1 - 5 2 5 3 6 3 (J P , A)

特表 2 0 1 5 - 5 1 5 4 8 2 (J P , A)

J . B i o t e c h n o l . , 2 0 1 6 年 0 1 月 1 9 日 , V o l . 2 2 1 , p p . 1 3 - 2 4

P r e c i s . M e d . , 2 0 1 5 , V o l . 2 , e 9 8 9 (p p . 1 - 8)

P L o S O N E , 2 0 1 2 , V o l . 7 , I s s u e 5 , e 3 7 5 0 8 (p p . 1 - 1 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

C07K 1/00-19/00

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

J S T P l u s / J S T 7 5 8 0 / J M E D P l u s (J D r e a m I I I)