

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4500494号
(P4500494)

(45) 発行日 平成22年7月14日 (2010.7.14)

(24) 登録日 平成22年4月23日 (2010.4.23)

(51) Int.Cl.		F I	
C07K	7/08	(2006.01)	C O 7 K 7/08 Z N A
C07K	14/755	(2006.01)	C O 7 K 14/755
C07K	1/16	(2006.01)	C O 7 K 1/16
C07K	16/36	(2006.01)	C O 7 K 16/36
C07K	16/42	(2006.01)	C O 7 K 16/42

請求項の数 4 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-587603 (P2002-587603)
 (86) (22) 出願日 平成14年5月6日 (2002.5.6)
 (65) 公表番号 特表2004-535393 (P2004-535393A)
 (43) 公表日 平成16年11月25日 (2004.11.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/BE2002/000070
 (87) 国際公開番号 W02002/090542
 (87) 国際公開日 平成14年11月14日 (2002.11.14)
 審査請求日 平成17年4月20日 (2005.4.20)
 (31) 優先権主張番号 09/853,080
 (32) 優先日 平成13年5月9日 (2001.5.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 503409805
 デパートメント セントラル ドゥ フラ
 クシヨヌモント ドゥ ラ クロワールー
 ジュ エス.セ.エール.エル.
 ベルギー, ペー1120 ブリュッセル
 , アヴェニュー ドゥ ティラス 109
 (74) 代理人 100103816
 弁理士 風早 信昭
 (74) 代理人 100120927
 弁理士 浅野 典子
 (72) 発明者 ローブ, ルス
 ベルギー, ペー1190 ブリュッセル
 , アヴェニュー ベスム 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 第V I I I 因子の抗原エピトープ、当該エピトープに対して向けられたインヒビターおよびそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号32によって規定されるエピトープからなる、単離されたまたは精製されたヒト第V I I I 因子の抗原フラグメントを含む、サンプル中の阻害性のおよび非阻害性の抗第V I I I 因子抗体の存在または非存在を決定するためのキット。

【請求項2】

配列番号32によって規定されるエピトープからなる、単離されたまたは精製されたヒト第V I I I 因子の抗原フラグメントに結合されるキャリアタンパク質またはキャリアペプチドを含む複合体。

【請求項3】

配列番号32によって規定されるエピトープからなる、単離されたまたは精製されたヒト第V I I I 因子の抗原フラグメントとの免疫親和性を示す阻害性の抗第V I I I 因子抗体または抗体フラグメント。

【請求項4】

請求項3に記載の抗体またはフラグメントに向けられた抗 - 抗第V I I I 因子のイデオタイプ抗体または抗体フラグメント。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の主題

本発明は、抗第V I I I因子インヒビターに対する第V I I I因子の抗原性ポリペプチド配列（エピトープ）に関し、この抗第V I I I因子インヒビターはこれらのポリペプチド配列に向けられたものである。そして本発明は、当該抗第V I I I因子インヒビターに向けられた抗インヒビターに関する。

【0002】

本発明はまた、少なくとも一つの上記分子を含有する医薬組成物および診断用デバイスに関する。

【0003】

発明の技術的背景

第V I I I因子は、三つの構造ドメインA、BおよびCから形成され、2, 3 3 2のアミノ酸から成る巨大な複数ドメインタンパク質であり、これらのドメインはA 1 : a 1 : A 2 : a 2 : B : a 3 : A 3 : C 1 : C 2の順番に配置されている。Aドメインには40%を超えるホモロジーがあり、そしてセルロプラスミンともホモロジーを有する（最近の総説であるプラット（2000）およびサエンコ（1999）を参照すること）。第V因子のAドメインおよび第V I I I因子のAドメインの間にも30%のホモロジーが存在する。Cドメインは二回現れ、そして複合糖質および最終的に負電荷を帯びたリン脂質と結合することが可能であると報告されている。Cドメインには、負電荷を帯びたリン脂質と結合することが可能なレクチンとのホモロジーも見られる。血小板付着部位もこの領域（C 2ドメイン）内に位置する（フォスターら（1990））。

【0004】

これらの抗原決定基は、フラグメント3 5 1 - 3 6 5（A 1ドメイン重鎖）、フラグメント7 1 3 - 7 4 0（A 2ドメイン）、フラグメント1 6 7 0 - 1 6 8 4（A 3ドメイン軽鎖）（軽鎖のNH₂末端）から成るか、そうでなければ、フラグメント2 3 0 3 - 2 3 3 2（C 2ドメイン軽鎖）（フォスター シー、（1990））、フラグメント7 0 1 - 7 5 0、フラグメント1 6 6 3 - 1 6 8 9、フラグメント3 3 0 - 4 7 2、フラグメント1 6 9 4 - 1 7 8 2（EP - 0 2 0 2 8 5 3）、フラグメント3 2 2 - 7 4 0およびフラグメント2 1 7 0 - 2 3 2 2から成る。

【0005】

米国特許第5, 7 4 4, 4 4 6号には、ブタの第V I I I因子またはネズミの第V I I I因子の対応する配列を伴った、A 2ドメインのフラグメント3 7 3 - 5 4 0、フラグメント3 7 3 - 5 0 8、フラグメント4 4 5 - 5 0 8、フラグメント4 8 4 - 5 0 8、フラグメント4 0 4 - 5 0 8、フラグメント4 8 9 - 5 0 8およびフラグメント4 8 4 - 4 8 9から成る群より選択されるアミノ酸配列を有するヒト/動物のハイブリッド第V I I I因子が記載されており、当該ハイブリッドは第V I I I因子欠乏症の治療に用いられる。

【0006】

これらの種々の部位を認識する抗体は、第V I I I因子の活性化や、v W f、第I X a因子、第X a因子、A P Cまたはリン脂質の結合を妨害する。第V I I I因子に应答する特異的な抗体は、個体間でかなりのばらつきがあり、そしてインヒビター抗体についてのエピトープを、第V I I I因子のすべてのドメインについて確定する必要がある（最近の総説であるスキャンデラ、2000；ローラー、2000を参照すること）。

【0007】

その他の抗体 - インビトロでの標準的な活性試験を阻害しないもの - は、分子中の活性部位から実質的に少し離れた位置の部位にそれらの抗体が接触している間に、血液凝固カスケードのその他の構成成分と共に、第V I I I因子の挙動に影響を与えることが可能である。これらの抗体は、第V I I I因子の自然の状態のフォールディングを、いくつかの特性を変化させることによって、妨害することが可能である。

【0008】

注入された第V I I I因子活性を中和する同種異系抗体（インヒビター）が出現することによって、第V I I I因子の代償療法が著しく困難になるかもしれない。報告されているインヒビターの血友病患者における発生率には、相当程度のばらつきがある。発生率は

10

20

30

40

50

6 - 35%前後の範囲に分布している(バーミレンら、1998)。たとえば大規模な欠失およびイントロン22の逆位などのような遺伝的素因を有していそうな者は、インヒビターならびにMHCクラスI遺伝子およびクラスII遺伝子として免疫応答に関与する遺伝子が合同して高頻度で見られる(タッデンハムおよびマックベイ、1998)。ある第VII因子の産物から別の産物に繰り返し切り替わること、およびいくつかの第VII因子濃縮物の免疫原性がより強いという可能性があることも、インヒビターが出現することの説明となるかもしれない(バーミレンら、1998)。第VII因子を調製するための方法が異なることが、その構造、物理化学的特性または本来の微小環境に影響を与えるかもしれない;ラウプら、(1999);ラウトら、(1998)。臨床上の関連性を有する抗第VII因子の自己抗体は、非血友病患者の間ではまれである(集団における一年間の頻度: $1 - 5 / 10^6$) (モリソンおよびルドラム)(1995)。これらは多数の自己免疫疾患と関連性を有し、そして多くの場合、生命に関わる出血を特徴とする。他方、抗第VII因子抗体は健康な被験者中でも記載されており(エイルジマン(Algiman)ら、1992;モロー(Moreau)ら、2000)、ここでは、被験者における循環する第VII因子のレベルに何らの明白な影響も見られない。

10

【0009】

炎症部位において、プロフェッショナル抗原提示細胞によってCD4 T細胞に提示される場合、自己タンパク質または誘導されたペプチドは免疫応答を導き出すかもしれない。個々の第VII因子ドメインの配列をまたぐ、重なり合った合成ペプチドのプールを用いて、レディングら(2000)は、健康な被験者および血友病患者において、第VII因子反応性CD4⁺を示した。いくつかの第VII因子ドメインが認められた: A3ドメインがより強くかつ高頻度で認められ、そして各ドメインはいくつかのエピトープを形成する。

20

【0010】

第VII因子の明確なタンパク質分解フラグメント、多数の組み換えペプチドライブラリー、または合成ペプチドアレイを用いての、たとえばウエスタンブロッティング、免疫沈降、および酵素結合抗体免疫吸着アッセイ(ELISA)などの技術を利用して、主にA2ドメインおよびC2ドメイン中に位置する、異なる第VII因子-インヒビター結合部位のマッピングを行った。しかしながら、これらの技術はどれもインヒビターエピトープおよび非インヒビターエピトープを特定するためのモデルを構築することができなかつた。わずかに数個のエピトープが別個の配列(<20アミノ酸残基)に対してマッピングされている。この問題を解決するために、パルマーら(1997)は、第VII因子の完全な配列の残基の80%を表す96種のウンデカマーペプチド(11アミノ酸残基)を合成した。彼らは、9人の患者の阻害性抗体のエピトープ特異性を決定することに成功した。他の有用な技術は、第VII因子の遺伝子突然変異を分析することであり、そしてそのような突然変異による第VII因子分子ならびにファージディスプレイ技術(ファンデンプリングら、2000)への影響を分析することである。しかしながら、これらのすべての方法論は時間を要し、費用が高くつく傾向があり、そして患者を確保できるかどうか大きく依存する。第VII因子分子のある特定の領域は、一般的に認識されているインヒビターエピトープのかたまり、たとえばA2ドメイン、A3ドメイン、およびC2ドメイン内の領域などを含有する「ホットスポット」かもしれない。インヒビターの反応を引き起こす際のこれらの「ホットスポット」の理由には、まだ完全に理解されていない点が残っている(ライスナーら、1995)。

30

40

【0011】

現在のところ、血友病患者、臨床医および「分離屋」の間で有力な考えは、すべての病原性の血漿汚染物質および二次作用が除かれた、利用可能な精製第VII因子を持つことである。

【0012】

血友病の犬、重篤複合免疫不全マウス、血友病のマウスなどの異なる動物モデルを用いることは可能であった。しかし、現在までのところ、第VII因子調製品の免疫原性も

50

しくは免疫調節効果を、または臨床的に宿主に投与する前にその宿主の感受性を予測することが可能な、満足できる実験モデルは存在しない。

【0013】

抗第V I I I因子免疫応答が現れる患者は、危険で、攻撃的かつ極めて高価な手段を講じることが必要な、深刻な状態にあることが分かる。

【0014】

高い頻度で行われる治療の一つに、プロトロンビン複合体濃縮物と共同してまたは共同せずに、第V I I I因子を非常に多い投与量で投与すること(150 IU/kg、一日に二回)によって免疫トレランスを誘導することがあり、「ポンプロトコール」とされる。治療の選択の余地としては、PCC(好ましくは活性化PCC〔APCC])または第V I I a因子を用いて、第V I I I因子インヒビター活性を回避することもある。これらの代替的な作用物質を注入した結果としての特異的抗体が産生されたが、治療を弱めるものであった。治療前または治療中に、ブタの第V I I I因子と実質的に交差反応を起こさない抗体を有する患者の止血を、代替的な作用物質としてブタの第V I I I因子を用いて実施できるかもしれない(ローラー、2000)。

10

【0015】

インヒビターの産生を阻害するための見込みのある代替的な研究手法としては、レセプター・リガンド結合シグナル事象(エベンスタインら、2000)を經由して媒介されるT細胞/B細胞の協力を妨害することである。ヒトT細胞CD40リガンド(CD 154)に対するヒト化マウスモノクローナル抗体を用いて、予備的な臨床試験を実施した。

20

【0016】

インヒビターのレベルを下げるための有利な戦略は、総IgGの固相への吸着が可能となる体外循環に患者をさらすことにある。

【0017】

免疫吸着は、総ヒト免疫グロブリンに対するセファロース結合スタフィロコッカスのプロテインAまたはセファロース結合ポリクローナルヒツジ抗体となるかもしれない(クノッフおよびデルフラー、1999)。外来タンパク質(プロテインA、ヒツジ抗ヒトIg)はカラムから漏出することもあり、そして臓器移植者の免疫機構を引き起こした;その上、衛生面(ICHトピックQ5A、指示書92/79/EC)での問題が生じるかもしれない。

30

【0018】

多価の静注用免疫グロブリン(IVIg)の注入 - ここでは免疫抑制療法と適切に組み合わせている - は、比較的有効であることが分かった。しかしながら、この有効性の理由はまだ完全には明らかにはなっていない。IgG合成のフィードバック阻害、IgGクリアランスの刺激またはサプレッサーT細胞の活性化などの種々の仮説が提唱されてきた。一つの興味深い解釈は、これらの市販の静注用免疫グロブリンは、抗第V I I I因子抗体の種々の部分(イディオタイプ)と反応することができ、そしてこれらの抗体を中和することができる抗体を含んでいるのかもしれない、というものである(ディートリッヒら(1992))。

【0019】

残念なことに、これらの研究手法のいずれも安全性、有効性、能力およびコストの点で満足できるものではないことが分かっている。

40

【0020】

エピトープの構造の予測についての最新技術は、不連続なアミノ酸残基が最も重要なエピトープを構成しているらしいこと、および多くの場合、エピトープの構造予測を複雑な四次元の難問にせしめるエピトープの予測式に、結合の動力学を組み入れることができないこと(バンレゲンモーター、方法:メソズインエンザイモロジーの手引書、9、第465-472頁、1996)といった事実制限されていた。

【0021】

著者によれば、未処理のタンパク質に対して産生された抗体のほとんどは、親タンパク

50

質に由来するあらゆるペプチドフラグメントとも反応せず、そしてこのことは、このような抗体が不連続のエピトープ（立体配置的なエピトープ）に対して向けられていることを示唆しているという。

【 0 0 2 2 】

この著者はさらに、抗原性の予測の成功率が低いのは、予測は連続的なエピトープだけを対象としているという事実が原因であり、そして立体的な特徴を常に一次元の直鎖ペプチドモデルに帰着させてエピトープの複雑さを緩和することは現実的ではないと述べている。

【 0 0 2 3 】

同様に、合成ペプチドアレイを用いて新規第 V I I I 因子インヒビターエピトープを特定しているパルマーら（1997）は、それぞれの患者の抗第 V I I I 因子抗体反応性のパターンがポリクローナルのように思われ、タンパク質のアミノ末端およびカルボキシル末端の範囲に位置する複数の部位に対して向けられており、そして調査されたそれぞれの血漿についてユニークであるらしいことを言及している（上記も参照すること）。さらに、この著者は、合成ペプチドアッセイだけでの結果に基づく第 V I I I 因子凝固活性に関して、あらゆる所定の抗体：エピトープ相互作用の持つ重要性を予測することは困難であることを言及している。（異なる第 V I I I 因子ドメインの構造と機能との間関係について不完全な理解と、インヒビターおよび非阻害性抗体の両者が患者の血漿内に存在するかもしれないという可能性が原因である。）

【 0 0 2 4 】

したがって、最新技術の文献には、巨大分子（たとえば第 V I I I 因子など）上で抗原性直鎖ペプチドを特定することが示されておらず、第 V I I I 因子に対して向けられたインヒビターによって引き起こされる免疫障害の診断および/または治療に線状エピトープを用いることができるかもしれない。

【 0 0 2 5 】

国際特許出願第 W O 9 6 / 0 2 5 7 2 号には、第 V I I I 因子の抗原性フラグメントおよびエピトープ配列ならびにこれらの配列のいくつかに対して向けられたインヒビターが記載されている。

【 0 0 2 6 】

発明の目的

本発明は、免疫障害（特に第 V I I I 因子のインヒビター、とりわけ第 V I I I 因子の、フォンウィルブランド因子（v W f）、第 I X 因子および/または膜のリン脂質（P L）との結合のインヒビターによって引き起こされる障害）の診断および/または（予防を含む）治療を改良するために、第 V I I I 因子の新規抗原エピトープを得ることを目的とし、当該エピトープによって、非阻害性のおよび阻害性の抗第 V I I I 因子同種異系抗体または自己抗体（同種異系免疫グロブリンまたは自己免疫グロブリン）の間でのスクリーニングが可能となる。

【 0 0 2 7 】

本発明の別の目的は、これらの抗原エピトープとの免疫親和性を示すインヒビターを得ること、および抗インヒビター、特に抗体または（T）細胞レセプターを得ることであり、この抗インヒビターは上記の当該インヒビターに対して向けられたものであり、その目的は、免疫障害の診断および/または治療（または予防）を改良することである。

【 0 0 2 8 】

本発明のさらなる目的は、治療および診断の分野での G M P 基準（I C H トピック Q S A、指示書 9 2 / 7 9 / E C など）にしたがって、汚染物質（ウイルス、プリオンなど）がない高純度の当該分子を工業レベルで得ることである。

【 0 0 2 9 】

発明の概要

本発明は第 V I I I 因子の抗原性ポリペプチド配列（エピトープ）に関する。この因子の完全な配列はベルハーら（1984）によって記載され、そしてこの因子は、完全な第

10

20

30

40

50

エピトープ：

配列番号：30：

Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln

1 5

- 次の配列（P14）によって規定される、ロイシン2273からセリン2289までのエピトープ：

配列番号：31：

Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp

1 5 10 15

Ser

10

- 次の配列（P15）によって規定される、プロリン2292からチロシン2305までのエピトープ：

配列番号：32：

Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr

1 5 10

リン脂質のフォンウィルブランド因子結合部位に関わる末端のトリペプチドThr - Arg - Tyrの一つ以上のアミノ酸が欠失しているかもしれない

20

- 次の配列（P16）によって規定される、グルタミン酸2322からチロシン2332までのエピトープ：

配列番号：33：

Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr

1 5 10

【0032】

本発明はさらに、当該エピトープの主要な部分に関する。当該エピトープからは一つ以上の末端のアミノ酸、好ましくは一つ、二つまたは三つのアミノ酸を削除することが可能であり、または、親水性、柔軟性および接近可能性といった特性と同じ特性を示す一つ以上のアミノ酸によって、当該エピトープを置換することが可能である。

30

【0033】

本発明のエピトープのいくつかは、ヒトインヒビターエピトープまたはいくつかの因子結合部位もしくは既知のモノクローナル抗体の結合部位、特にモノクローナル抗体Mas531Pの結合部位として知られているC2部位もしくは結合部位ESH8、ならびにリン脂質、第Xa因子もしくはフォンウィルブランド因子結合部位の主な決定基内に含まれていることも知られている。しかしながら、本発明の特異的エピトープまたはそれらの主要な部分が、当該結合部位の好ましい部分として選択されるか、または当該結合部位との潜在的な重なり合いを含んでいてもよい。

【0034】

40

これらのエピトープ配列は、パーカーおよびホッジズ（1986）によって規定される高い親水性、カープラスおよびシュルツ（1985）によって規定される高い柔軟性、およびジャンン（1979）によって規定される高い接近可能性という特に有利な特徴を有する。

【0035】

これらのエピトープは、特に第VII因子タンパク質の表面上に露出しており、そして明白な抗原性および免疫原性の特性を示す。

【0036】

本発明の別の側面は修飾（組み換えまたはトランスジェニック）第VII因子に関し、遺伝子工学によって得られ、そして上記に確認されたエピトープまたは当該エピトープ

50

の主要部分の一つ以上のものを削除されるかもしれない。

【 0 0 3 7 】

都合が良いことに、当該第 V I I I 因子はなお単数（または複数）の凝固因子の結合を許容するものの、免疫原性はより小さくなり、当該修飾第 V I I I 因子または天然第 V I I I 因子に対して向けられたインヒビターの形成を誘導しないかまたは誘導の程度がより小さくなるだろう。

【 0 0 3 8 】

当該エピトープはさらに独立して免疫原性を有し（すなわち、たとえば B S A、K L H、ヘモシアニンなどのサイズが大きなタンパク質と複合化しなくても、これらのエピトープは免疫原性を有する）、そして好ましくは、たとえば抗第 V I I I 因子抗体などの第 V I I I 因子のインヒビターの内部での免疫親和性を示し、および/または T リンパ球およびおそらく B リンパ球のレセプターについての免疫親和性を示す、という点も好都合である。

10

【 0 0 3 9 】

これらのエピトープおよび/または当該エピトープの主要部分は、これらがウサギの中に注入された場合、免疫反応（抗体の合成）を誘導する。

【 0 0 4 0 】

当該配列が、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体に対して実質的に免疫原性を有するという特徴は予想外であるものの、合成によって容易にかつ都合良く得るには、この配列は十分短い。

20

【 0 0 4 1 】

本発明はさらに、本発明の上記に特定された少なくとも二つの異なる配列のエピトープおよび/または少なくとも二つの当該エピトープの主要部分を含有する立体配置的なエピトープに関する。

【 0 0 4 2 】

この立体配置的なエピトープは二つ以上の異なるポリペプチド配列の部分から構成され、この部分は、タンパク質がその三次構造または四次構造にてフォールディングする場合、互いの近傍に位置する。

【 0 0 4 3 】

これらのエピトープは、第 V I I I 因子のインヒビターによって、特に（主要組織適合遺伝子座（M H C I および/または M H C I I）を経由して）B リンパ球および T リンパ球および/または抗第 V I I I 因子抗体（スキャンデラら（2 0 0 0）；レディングら、（2 0 0 0））によって、好ましくは同時に「認識される」（すなわち、免疫親和性を示す）という能力を有する。

30

【 0 0 4 4 】

より強力な免疫原性を示す複合体を形成するように、当該エピトープおよび/または当該エピトープの主要部分が、キャリアタンパク質またはキャリアペプチド、たとえば B S A、または K L H、ヘモシアニンなどと複合体化することが好ましい。

【 0 0 4 5 】

本発明はさらに、上記の線状エピトープ（配列番号：1 0、配列番号：1 7、配列番号：2 0、配列番号：2 1、配列番号：2 4、配列番号：2 7、配列番号：3 0、配列番号：3 1、配列番号：3 2、配列番号：3 3）のエピトープ混合物を含有する第 V I I I 因子の抗原エピトープのプールに、または当該エピトープもしくは最新技術として既に記載されている少なくとも一つの当該エピトープおよび一つ以上のさらなる第 V I I I 因子の抗原エピトープを含有してもよいプールから作られる立体配置的なエピトープを含有する第 V I I I 因子の抗原エピトープのプールに関し、そして好ましくは、以下のものから成る群から選択されるものに関する：

40

- 次の配列によって規定される、アルギニン 1 6 4 8 からチロシン 1 6 6 4 までのエピトープ：

配列番号：1：

50

Arg Asp Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp

1 5 10 15

Tyr

テトラペプチド Arg - Asp - Ile - Thr (P 7) の一つ以上のアミノ酸が、またはジペプチド Asp - Tyr の最後の一つまたは二つのアミノ酸が欠失しているかもしれない

- 次の配列によって規定される、アスパラギン酸 1 6 8 1 からアルギニン 1 6 9 6 (P 8) までのエピトープ :

配列番号 : 2 :

Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg

1 5 10 15

エピトープの Asp - Glu - Asp - Glu の一つ以上のアミノ酸が欠失しているかもしれない

- 次の配列によって規定される、スレオニン 1 7 3 9 からチロシン 1 7 4 8 までのエピトープ :

配列番号 : 3 :

Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr

1 5 10

- 次の配列によって規定される、アスパラギン 1 7 7 7 からフェニルアラニン 1 7 8 5 までのエピトープ :

配列番号 : 4 :

Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe

1 5

末端のジペプチド Ser - Phe またはテトラペプチド Pro - Tyr - Ser - Phe の一つ以上のアミノ酸が欠失しているかもしれない

- 次の配列によって規定される、グルタミン酸 1 7 9 4 からチロシン 1 8 1 5 までのエピトープ :

配列番号 : 5 :

Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro

1 5 10 15

Asn Glu Thr Lys Thr Tyr

最初のトリペプチド Glu - Asp - Gln (P 9) または最初のノナペプチド Glu - Asp - Gln - Arg - Gln - Gly - Ala - Glu - Pro の一つ以上のアミノ酸が欠失しているかもしれない

- 次の配列によって規定される、メチオニン 1 8 2 3 からアスパラギン酸 1 8 3 1 までのエピトープ :

配列番号 : 6 :

Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp

1 5

- 次の配列によって規定される、グルタミン酸 1 8 8 5 からフェニルアラニン 1 8 9 1 までのエピトープ :

配列番号 : 7 :

10

20

30

40

Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe

1 5

- 次の配列によって規定される、グルタミン酸 1885 からアラニン 1901 までのエピトープ :

配列番号 : 8 :

Glu Thr Lys Ser Trp Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala

1 5 10 15

ヘプタペプチド G l u - T h r - L y s - S e r - T r p - P h e - T h r のまたはトリ 10
ペプチド C y s - A r g - A l a の一つ以上のアミノ酸が欠失しているかもしれない

- 次の配列によって規定される、アスパラギン酸 1909 からアルギニン 1917 までのエピトープ :

配列番号 : 9 :

Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg

1 5

- 次の配列によって規定される、アラニン 108 からバリン 128 までのエピトープ :
配列番号 : 11 :

Ala Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys 20

1 5 10 15

Glu Asp Asp Lys Val

20

末端のアミノ酸アラニンおよびバリン (P 1) が欠失しているかもしれない

- 次の配列によって規定される、グルタミン酸 181 からロイシン 192 までのエピトープ :

配列番号 : 12 :

Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu 30

1 5

末端のジペプチド T h r - L e u の一つまたは二つのアミノ酸が欠失しているかもしれない

- 次の配列によって規定される、アスパラギン酸 203 からアラニン 227 までのエピトープ :

配列番号 : 13 :

Asp Glu Gly Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln

1 5 10 15

Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg Ala 40

20 25

ノナペプチド A s p - A r g - A s p - A l a - A l a - S e r - A l a - A r g - A l a の一つ以上のアミノ酸が欠失しているかもしれない

- 次の配列によって規定される、アスパラギン酸 327 からメチオニン 355 までのエピトープ :

配列番号 : 14 :

Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu
 1 5 10 15
 Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met
 20 25

末端のジペプチド Asp - Ser の一つ以上のアミノ酸がまたはオクタペプチド Asp - Asp - Leu - Thr - Asp - Ser - Glu - Met (P 2) の一つ以上のアミノ酸が欠失しているかもしれない

- 次の配列によって規定される、アスパラギン酸 4 0 3 からリジン 4 2 5 までのエピトープ :

配列番号 : 1 5 :

Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro Gln Arg
 1 5 10 15
 Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys
 20

テトラペプチド Asp - Asp - Arg - Ser (P 3) の一つ以上のアミノ酸が欠失しているかもしれない

- 次の配列によって規定される、バリン 5 1 7 からアルギニン 5 2 7 までのエピトープ :

配列番号 : 1 6 :

Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg
 1 5 10

ジペプチド Pro - Arg の一つまたは二つのアミノ酸が欠失しているかもしれない

- 次の配列によって規定される、ヒスチジン 6 9 3 からグリシン 7 0 1 までのエピトープ :

配列番号 : 1 8 :

His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
 1 5

- 次の配列 (P 4) によって規定される、セリン 7 1 0 からアスパラギン酸 7 2 5 までのエピトープ :

配列番号 : 1 9 :

Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Gly Asp Ser Tyr Glu Asp
 1 5 10 15

- 次の配列によって規定される、イソロイシン 2 0 8 1 からセリン 2 0 9 5 までのエピトープ :

配列番号 : 2 2 :

Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser
 1 5 10 15

テトラペプチド Ile - His - Gly - Ile の一つ以上のアミノ酸が欠失しているかもしれない

- 次の配列によって規定される、チロシン 2 1 0 5 からグリシン 2 1 2 1 までのエピトープ :

配列番号 : 2 3 :

10

20

30

40

よび/または細胞フラグメント(レセプター)を意味すると理解される。

【0052】

このような抗インヒビターは、天然のまたは遺伝子工学によって得られる、抗-抗第V I I I因子のイディオタイプ(モノクローナルまたはポリクローナル)抗体または抗体フラグメントであることが好ましい。

【0053】

本発明の別の側面は、適切な製薬学上の担体または希釈剤および当該エピトープまたはそのプール、それらエピトープに対して向けられた第V I I I因子のインヒビター、当該インヒビターに対して向けられた抗インヒビター、および/またはこれらの混合物から成る群より選択される成分を含む医薬組成物に関する。

10

【0054】

当該医薬組成物中に存在する適切な製薬学上の担体または希釈剤(そしてもしかすると補助剤または賦形剤)のタイプおよび量は投与方法にしたがって変化してもよく、そして本発明の医薬組成物の治療上の特性を改良するために、または起こり得る副作用を減少させるために、補助剤を組み合わせることもあり得る。本発明の医薬組成物において用いられる適切な製薬学的に許容される担体は、当業者によって周知のものであり、薬剤師によって一般的に用いられる方法にしたがって選択され、そして固体、液体または気体の無害の製薬学的に許容される担体が挙げられる。活性成分/製薬学的に許容される担体のパーセンテージについては、極めて大きな範囲内で変更してもよいが、(ヒトを含む)患者の耐性および患者への考えられる副作用、ならびに投与の頻度および/または投与様式によ

20

【0055】

これらのエピトープおよび/または当該エピトープの主要部分、本発明の複合体またはそれらのプール、それらに対して向けられたインヒビター、当該インヒビターに対して向けられた抗インヒビター、および/またはそれらの混合物から成る群より選択される成分を含む、診断用装置および/または精製用装置、たとえば診断キット、アフィニティフィルター、またはクロマトグラフィーカラムに関する。当該装置は、患者のスクリーニングを可能とし、当該患者において存在する最も重要なインヒビターを検出でき、そして十分な特異性および感度を伴う陽性試験を可能とする当該エピトープのプールを含む点で都合が良い。

30

【0056】

したがって、精製用装置は、これらのエピトープおよび/またはエピトープの主要部分を含み、クロマトグラフィーカラムの固相に付着しているクロマトグラフィーカラムで構成されることも可能である。

【0057】

患者に由来し、そして第V I I I因子のインヒビターを含有する体液(たとえば血清など)が、当該インヒビター(たとえば抗体など)が当該エピトープもしくは当該主要部分またはそのプールに特異的に付着しながら固体担体(クロマトグラフィーカラム)を通過する。溶出の後に、抗インヒビター(抗-抗第V I I I因子のイディオタイプ抗体)と反応させることによって、当該インヒビターを集めることが可能である。

40

【0058】

第V I I I因子のインヒビターがその固相上に付着している固体担体(クロマトグラフィーカラム)を通過したこれらの抗インヒビターによって、血清中に存在する抗-抗第V I I I因子のイディオタイプ抗体をキャラクタライズすることも可能である。

【0059】

当該エピトープまたはそのプールと結合させることによって第V I I I因子のインヒビターを除去した後で、当該患者に体液(血液または血清もしくは得られる画分)を再注入すること(生体外での治療)も可能である;当該インヒビターは、ヒト患者に適用される透析法に推奨されているのと同様に、体液(血液または血清)から取り除かれる。

【0060】

50

本発明はさらに、第V I I I因子に対するインヒビターによって引き起こされる病状を示す患者を治療する方法（生体外での治療）であって、患者から当該体液（血液または血清）を抽出する工程、本発明のエピトープまたはそのプールが結合している固体担体上で反応を行う工程、そして当該エピトープ、主要部分またはそのプールが固定されたインヒビターを除去した後で当該体液を患者に再注入する工程を含む方法に関する。

【0061】

本発明の最後の側面は、免疫障害、特に第V I I I因子のインヒビターによって、第V I I I因子の第I X因子および/または第X因子および/またはフォンウィルブランド因子（v W F）への結合のインヒビターによって、および/または第V I I I因子の膜のリン脂質への結合のインヒビターによって引き起こされる免疫障害を予防するおよび/または治療するために用いられる薬剤を調製するための本発明の医薬組成物の使用に関する。

10

【0062】

添付された図を参照しつつ次の非限定的な実施例において、本発明を具体的に説明する。

【0063】

図面の簡単な説明

図1は、第V I I I因子のA3配列の1から371に番号を付け替えられたアミノ酸の親水性、柔軟性および接近可能性の（それぞれのアミノ酸についての表面積の）グラフを表す。

【0064】

図2 aは、ペプチド-セファロースカラム上でのアフィニティークロマトグラフィーによる、ヒト抗-配列番号：32抗体の精製に関する溶出プロファイルを表す。コーン画分I I + I I I溶液（50 ml）をカラム（1 mlのゲル）上に添加し流速を1 ml /分とした。実施例に記載されたようにして、特異的抗体の分離を実施した。矢印は、特異的ヒト抗-配列番号：32抗体の位置を示す。

20

【0065】

図2 bは、コーン画分I I + I I Iから精製された抗-（配列番号：32）I g Gの存在下での第V I I I因子凝固活性を表す。実施例に記載されたようにして、その量が増加する抗-配列番号：32の存在下で、第V I I I因子の凝固活性を測定した。第V I I I因子活性の% = （抗体存在下での第V I I I因子活性 / 抗体非存在下での第V I I I因子活性）× 100。

30

【0066】

図3は、ウエスタンブロッティング後の、第V I I I因子ポリペプチドに対するヒト抗ペプチド抗体の免疫反応を表す（パネルAの左側から右側への方向：H A P 1からH A P 4までのヒト抗体であり、第V I I I因子H C内で見られた異なる第V I I I因子エピトープ配列について特異的である - 表2も参照すること、そしてパネルB：P 5ペプチドおよび第V I I I因子L C配列、P 7、P 8およびP 9について特異的なヒト抗体 - 表2も参照すること）。R A P 9のレーンは、ペプチド配列A r g ^{1 7 9 7} - T y r ^{1 8 1 5}について特異的な精製ウサギ抗体に対する第V I I I因子ポリペプチドの反応性を示す（表2も参照すること）。

40

【0067】

図4は、4種のインヒビター血漿の、異なるペプチド配列とのE L I S Aでの反応性を表す。4人の患者の血漿中に存在するインヒビターを、選択された異なる第V I I I因子エピトープ合成ペプチドを被覆抗原として用いるE L I S A試験によって、縦軸で表されているように分析した。

【0068】

実施例

材料と方法

試薬

M A S 5 3 0 p（ハーラン - セララブ社、インディアナポリス、インディアナ州）は、

50

第V I I I因子重鎖の44 k D aのA2ドメインに対して特異的なマウスモノクローナル抗体である。ビオチン標識化ウサギI g G - 抗マウスI g Gをダコパツ社(コペンハーゲン、デンマーク)から購入した。ビオチン標識化ヤギI g G - 抗ヒトI g Gおよびビオチン標識化マウスI g G - 抗ウサギI g Gをシグマケミカルズ社(セントルイス、ミズーリ州)から入手し、精製 - トロンピン(3000 I U / m g)、ストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ複合体、オボアルブミン(O V A)、ウシ血清アルブミン(B S A)、スカシ貝ヘモシアニン(K L H)、およびo - フェニレンジアミン(O P D)をシグマケミカルズ社(セントルイス、ミズーリ州)から購入した。カゼインをメルク社(ダルムシュタット、ドイツ)から入手した。4 - クロロ - 1 - ナフトールおよびビオチン化分子量マーカーをバイオ - ラッドラボラトリーズ社(ハーキュリーズ、カリフォルニア州)から入手した。フロイントのアジュバントはディフコ社(デトロイト、ミシガン州)からのものであった。

10

【0069】

第V I I I因子濃縮物

血漿第V I I I因子(p - F V I I I)は、イオン交換クロマトグラフィーで精製した溶媒/界面活性剤処理済み第V I I I因子濃縮物(タンパク質1 m gあたり100 I U)(F V I I I C o n c . S D、シーエーエフ - ディーシーエフ赤十字社、ブリュッセル、ベルギー)であった。アルブミンを含まない組み換え第V I I I因子(r F V I I I)を、ハイランド社(グレンデール、カリフォルニア州)から入手した。

【0070】

20

血漿画分免疫グロブリン

4,800人の無給の提供者由来の多量の血漿プールを、徐々にエタノール濃度を高めて沈殿させた後のものから、コーン(C o h n)画分I I + I I Iを得た。この画分は、すべてのI gクラスおよびサブクラスを含有する。比濁法によってI g Gの組成を測定した。各サブクラスの相対的なパーセントは、I g G 1、I g G 2、I g G 3およびI g G 4についてそれぞれ63.7; 30.1; 3.4および2.8であった(画分I I + I I Iの三つの異なるバッチについての平均値)。

【0071】

第V I I I因子濃縮物、第V I I I因子の活性および活性の阻害

コアグロメーターK C 4 A(シグマダイアグノスティックス社)上で用いるように適合理化させたワンステージ凝固アッセイにて、第V I I I因子の活性を測定した。このアッセイでは、危険な血友病A血漿(オラガノンテクニカ社、ケンブリッジ、イギリス)とインスツルメンテーションラボラトリー社(ウォリントン、イギリス)のA P P T試薬とを用いる。第5国際標準第V I I I因子濃縮物88/640(5.4 I U / m l)(エヌアイビーエスシー(N I B S C)社、ポッターズパー、イギリス)と相対化することによって、有効性を算出した。ベセスダアッセイの変法にしたがって、精製ウサギI g G調製品および精製ヒトI g G調製品にて第V I I I因子阻害活性を測定した。簡単に言えば、アフィニティー精製されたI g Gを連続的に希釈し、そして第V I I I因子濃縮物88/640(1 I U / m l)の存在下、37にて1時間インキュベートした。残りの第V I I I因子の活性を、上記のようにして測定した。

30

40

【0072】

- トロンピンによる第V I I I因子の活性化およびイムノプロットティングは、他の箇所に記載した(ピールリンクラ、1997)。

【0073】

ペプチドの合成、ペプチドのキャリアタンパク質への複合化およびウサギ抗ペプチド抗血清の作製は、ネオシステム社(ストラスブル、フランス)によって行われた。

【0074】

アフィニティークロマトグラフィーによるウサギ抗体およびヒト抗体の精製

ウサギ抗体およびヒト抗体を精製するために、製造メーカーの取扱説明書にしたがって、5 m gの異なるペプチドをそれぞれ1 m lのプレパックのN H S - 活性化セファロース

50

(ファルマシアバイオテック社、ウプサラ、スウェーデン)に結合させた。自動液体クロマトグラフィーシステム(AEKTA explorer 100A、ファルマシア社、ウプサラ、スウェーデン)を用いて、50mlのウサギ抗血清、またはコーン分画(画分I I + I I I ; 13mgタンパク質/ml)の後に得られた100mlのヒト血漿画分のいずれか一方から、特異的な抗ペプチド抗体を精製した。簡単に言えば、5倍の体積のTE緩衝液(20mMのトリス-塩酸、pH7.2、150mMのNaClおよび0.02%のNaN₃)に対してサンプルを3回透析し、そして1ml/分の流速にてカラム上に添加した。2ml/分にて、50mlのTE緩衝液および1MのNaClを含有する30mlのTEを用いて、このカラムを順次洗浄した。吸着後に、5mlの0.1Mのクエン酸、pH2.5によって物質を(1ml/分で)溶出し、そして5mlの1Mのトリス-塩酸、pH9.0中に直接回収した。最後に、サンプルを10倍の体積の平衡化緩衝液に対して透析し、そしてCentriprep-30(アミコン社、ビバリー、マサチューセッツ州)で濃縮した。バイオラッドタンパク質アッセイによって、Igの回収を測定した。

10

【0075】

結果

第V I I I 因子の線状エピトープの可能性のあるもの選択

8から25残基の範囲の、30を超える表面領域(線状エピトープ)-高い親水性、高い柔軟性および高い接近可能性に特徴を有する-が第V I I I 因子分子上で特定された。これらが外側の位置にある可能性が高いことに基づいて(A3について図1を参照すること)、特定された、13個またはそれを超える鎖長のアミノ酸残基と適合する16種の直鎖ペプチド(P1からP16)を選択した。これらのペプチドを合成し、そして特異的抗血清を作製するためにオボアルブミンと結合させた(以下では表1)。P8は、シマラ(1988)に記載されたエピトープを含み、外部コントロールとして用いた。

20

【0076】

ウサギモデルを用いて当該合成線状エピトープから得られた実験結果

ウサギ抗第V I I I 因子-ペプチド抗血清および回収されたアフィニティー精製免疫グロブリンの特性に関する結果を、表1に要約している。

【0077】

Aドメイン、Bドメイン、C1ドメインおよびC2ドメインの中から、16種の合成ペプチド(10から20アミノ酸)を選択した。オボアルブミンとの複合化の後に、OVA-ペプチド複合体をウサギの中に注入し、そして第V I I I 因子抗ペプチド抗血清のRAP1からRAP16について調査した。

30

【0078】

より正確に言えば、二羽のウサギをそれぞれ第V I I I 因子-ペプチド-オボアルブミン調製品を用いて免疫化した。特異的抗血清のRAP1からRAP16(カラムb、表1)を調製し、そしてrFV I I Iまたは第V I I I 因子-ペプチド-KLHを抗原として用いるELISA(カラムc、表1)にてアッセイを行った。50%が結合する血清の希釈率の逆数の対数に負号をつけたものとして、ELISAの力価を表現する。次いで、ペプチド結合セファロースでのクロマトグラフィーによって、免疫グロブリンを精製した。イムノプロットティングの後に抗第V I I I 因子ペプチドIgによって認識された第V I I I 因子のドメインを(カラムd、表1に)示し、そしてIgタンパク質の回収の程度を、免疫グロブリンを標準として用いて測定した(カラムe、表1)。BU/mgタンパク質で表示される阻害活性を、第V I I I 因子中和活性アッセイにて測定した(カラムf、表1)。

40

【0079】

第V I I I 因子ペプチドの免疫原性およびウサギ抗第V I I I 因子ペプチド抗血清のキャラクタライゼーション

KLHタンパク質に結合する第V I I I 因子-ペプチドであって、対応する異なる第V I I I 因子-ペプチド、または精製rFV I I Iのいずれか一方を抗原として用いるEL

50

ISAによって、第VII因子抗ペプチド抗血清の反応性を測定した。それぞれの抗第VII因子 - ペプチド抗血清の結合反応は、ウサギでの免疫応答を導くために用いられる第VII因子ペプチド、およびrFVIIの両者について特異的であった(表1を参照すること)。

【0080】

ウサギ抗ペプチド抗体の第VII因子エピトープの特異性を明らかにするために、rFVIIおよびトロンビンにて処理した後に得られるrFVIIのフラグメントをSDS-PAGEによって分離し、そしてウサギIgGの異なる調製品を用いるウエスタンブロッティングによって分析した。予想された通り、選択された線状エピトープを含有する、対応する第VII因子フラグメントに対して、ほとんどの抗血清(14/16、87%)が強く反応することが示された(表1を参照すること)。

10

【0081】

ウサギ抗第VII因子ペプチド抗体の精製

下記の方法に記載の通りに、ペプチド - セファロースにてのアフィニティークロマトグラフィーによって特異的ウサギIgGを精製した。ワンステージ凝固アッセイにて第VII因子中和活性を測定した場合、二種のウサギIgG精製調製品：配列番号：14について特異的なIgGに対応するRAP2および配列番号：01について特異的なIgGに対応するRAP7による顕著な阻害が見られた。

【0082】

ヒトrFVIIを用いるイムノブロッティングによる、ウサギ抗第VII因子ペプチド抗体のエピトープマッピング

20

ウサギ抗ペプチド抗体の第VII因子エピトープの特異性を明らかにするために、rFVIIおよびトロンビンにて処理した後に得られるrFVIIのフラグメントをSDS-PAGEによって分離し、そしてウサギIgGの異なる調製品(RAP1からRAP17のIg)を用いるウエスタンブロッティングによって分析した。

【0083】

それぞれ重鎖および軽鎖について特異的な二種のモノクローナル抗体であるMoAb530pおよびMoAb18の混合物を用いて、それぞれのレーンにおいて、rFVIIの重鎖(HC)および軽鎖(LC)ならびにそれらのトロンビンによるタンパク質分解産物(44kDaおよび72kDa)を特定した。MoAb18は、トロンビンによる活性化後に得られる、第VII因子の軽鎖フラグメントのNH₂末端を認識し、このフラグメントはあまりにも小さいため、電気泳動後のゲルに残っていることを検証することができなかった。17種のウサギ免疫グロブリン調製品のうちの14種が、rFVIIおよびpFVIIの両者と強く反応した。抗血清のRAP1、RAP2、RAP3、RAP4は、(200kDaから92kDaの)重鎖を独占的に認識した。抗血清のRAP1およびRAP2は50-kDaのA1ドメインフラグメントと反応し；RAP3およびRAP4は44-kDaのフラグメント(ドメインA2)と結合し；(Bドメインについて特異的な)RAP5は高分子量の第VII因子重鎖(約200-kDa)と結合した。

30

【0084】

RAP7、RAP8、およびRAP9は、80-kDaの軽鎖のダブレットと反応した。RAP9およびRAP12からRAP17の抗体は、72-kDaの第VII因子軽鎖フラグメントも検出した。予想された通り、それぞれの反応性抗血清は、対応する、選択された線状エピトープを含有する第VII因子フラグメントと強く反応することが示された。RAP6またはRAP10と、HC第VII因子フラグメントまたはLCの第VII因子フラグメントとの間の反応は、ゲル中では検出できなかった。

40

【0085】

ヒト自己抗体を精製し、キャラクタライズするための当該合成線状エピトープから得られた実験結果

表2は、健康な被験者のコーン画分II+IIに由来するヒト抗第VII因子抗体のキャラクタライゼーションに関する。

50

【 0 0 8 6 】

今までのところ、13種の異なる第V I I I因子ペプチドに結合したセファロースにて、ヒト抗ペプチドI g G調製品(H A P 1からH A P 17まで)を精製した(カラムa、表2)。これらのI g(カラムb、表2)をイムノプロットングによって分析した。r F V I I IのH C鎖またはL C鎖への結合、そしてr F V I I Iのトロンビンフラグメントへの結合を、それぞれ表2のカラムcおよびdに示す。第V I I I因子-ドメイン反応性を表2のカラムeに示す。矢印は、80-k D aのバンドの強度が低下したことを意味する。アフィニティー精製後のI gの回収の程度(カラムf、表2)を、 $\mu\text{g}/10\text{mg}$ の添加された画分I I + I I Iで表現する(材料と方法を参照すること)。13種のI g調製品のそれぞれの存在下でのインキュベーションの後で、凝固アッセイの障害をベセズダアッセイにて測定した(カラムg、表2)。

10

【 0 0 8 7 】

健康な提供者におけるヒト抗第V I I I因子抗体を免疫精製するための第V I I I因子ペプチドの使用

健康な被験者中に存在するヒト抗第V I I I因子抗体の調製およびキャラクタライゼーションを行うために、我々は、選択された特異的抗ペプチド抗体の存在を示すための免疫グロブリンに富むコーン画分I I + I I Iを分析した。適切なペプチド(表2を参照すること)に結合したセファロースにてのアフィニティークロマトグラフィーによって、ヒト抗第V I I I因子-ペプチド抗体(H A P 1からH A P 11、H A P 16およびH A P 17)を精製した。典型的な例として、図2に、C2ドメインで見られる配列である配列番号: 32によって得られたクロマトグラフを示す。表2には、それぞれの第V I I I因子ドメイン(A1、A2、A3、B、C1およびC2)において選択された17種のエピトープ配列によって得られた結果が要約されている。用いられた13種の第V I I I因子ペプチドのそれぞれについて特異的な免疫グロブリンのかなりの量が、出発血漿画分I I + I I Iから得られた。得られた精製ヒト抗体の特異性について、血漿第V I I I因子、組み換え第V I I I因子、およびトロンビンによるタンパク質分解後に得られたフラグメントを用いてのイムノプロットングによって直接テストした(表2を参照すること)。

20

【 0 0 8 8 】

ヒト精製抗体調製品におけるI g Gのアイソタイプの分布は、極めて不均一であることが分かった。興味深い点としては、回収されたI g Gのうちの40から79%のものが、I g G2サブクラスに属していたことであった。ほとんどの調製品において、I g G4は過剰に(最大で25%まで)表示されているように思われた。

30

【 0 0 8 9 】

ヒト抗第V I I I因子-ペプチド抗体調製品のすべてについての第V I I I因子活性を阻害する能力を、ワンステージ凝固アッセイによってテストした。表2には、テストを行った13種の調製品のうちの7種(54%)、それぞれ配列番号: 14、配列番号: 19、配列番号: 2、配列番号: 5、配列番号: 22、配列番号: 32および配列番号: 33が阻害活性を示したことが記載されている。典型的な例として、抗-配列番号: 32のI g濃度の第V I I I因子活性の阻害を関数の形として図2に示す。

40

【 0 0 9 0 】

第V I I I因子に対するヒト抗第V I I I因子ペプチドI g免疫特異性

得られた精製ヒト抗体の特異性について、血漿第V I I I因子、組み換え第V I I I因子、およびトロンビンによるタンパク質分解後に得られたフラグメントを用いてのイムノプロットングによってテストした。第V I I I因子-H C-もしくは第V I I I因子-L C-特異的マウスモノクローナル抗体または第V I I I因子-ペプチド-特異的ウサギポリクローナル抗体のいずれか一方を用いて、第V I I I因子フラグメントを再度特定した。ピオチン化ヤギ抗ヒトI g Gの結合後に、ヒト抗体を特定した。図3には、第V I I I因子ペプチド配列番号: 11(S e r¹⁰⁹-L y s¹²⁷)、配列番号: 14(C y s³²⁹-A s p³⁴⁸)、配列番号: 15(T y r⁴⁰⁷-L y s⁴²⁵)または配列番号: 19(C y s⁷¹¹-A s p⁷²⁵)に結合したセファロースにて精製された4種

50

のヒト抗体調製品との、高分子量の第V I I I因子(92 - k D a)の免疫反応が示されている。Ser¹⁰⁹ - Lys¹²⁷ - セファロースまたはCys³²⁹ - Asp³⁴⁸ - セファロースにて精製されたヒト抗体によって、50 - k D aの第V I I I因子フラグメント(ドメインA1)が認められ、そしてTyr⁴⁰⁷ - Lys⁴²⁵ - セファロースおよびCys⁷¹¹ - Asp⁷²⁵ - セファロースにて精製された免疫グロブリンによって、44 - k D aの第V I I I因子フラグメント(A2)が認められた。抗 - (Ser⁸¹⁷ - Ser⁸³⁰)免疫グロブリン調製品(HAP5)が第V I I I因子フラグメントに対して反応しないことから、このエピトープがドメインBのアミノ末端に位置することが確認される(図3)。配列番号: 1 (Arg¹⁶⁵² - Tyr¹⁶⁶⁴)のペプチドまたは配列番号: 2 (Asp¹⁶⁸¹ - Arg¹⁶⁹⁶)のペプチドに結合したセファロースにて精製されたヒト抗体は、80 - k D aの第V I I I因子軽鎖(図3)と強く反応した。両調製品について、80 - k D aのものと反応したバンドがトロンビンによるタンパク質分解後に消失したことは、エピトープが、予想された通りに、第V I I I因子A3ドメインのNH₂末端の部分にあるa3酸性ペプチド内に位置していることを示す。配列番号: 5 (A3ドメイン内にあるArg¹⁷⁹⁷ - Tyr¹⁸¹⁵)のペプチドについて特異的なヒト抗体をイムノプロットングによって分析したところ、rFV I I Iについてのそれらの抗体の特異性は、80 - k D aの第V I I I因子軽鎖およびその72 - k D aのトロンビンフラグメントに制限されているように思われた。

10

【0091】

rFV I I Iを用いてのE L I S Aにて陽性反応が得られたのにも関わらず、第V I I I因子ペプチドの配列Cおよび配列番号: 23について特異的な抗体調製品を用いても、rFV I I I鎖またはフラグメントとの免疫反応は検出されなかった。このことは、これらの免疫グロブリン調製品は立体配置的なエピトープを認識することを意味するのかもしれない。

20

【0092】

血友病A患者の血漿におけるヒト抗第V I I I因子抗体をキャラクタライズするための第V I I I因子合成ペプチドの使用

E L I S A実験にて選択されたペプチドを使用し、血友病Aの血漿において抗第V I I I因子抗体の特異性が存在するかどうかを測定した。これらのペプチドをマイクロプレート上で被覆した(PBS緩衝液1mlあたり25μg、4で16時間)。患者血漿をトリス - カゼイン緩衝液で1/10から1/1000に希釈したものを、被覆されたペプチドと37で2時間反応させた。結合したヒトI g Gを、方法の欄に記載されたようにして測定した。コントロールのサンプルを健康な提供者の血漿プールとした。図4は、4人の血友病A患者の血漿を用いて得られた結果を示している。光学濃度は、二つの独立した実験の平均値(患者のOD - 健常者の血漿プールのOD)を補正したものである。

30

【0093】

分子モデルでのエピトープの予測

ベンパートンら(1997)は第V I I I因子のAドメインの分子モデルを構築した。この三次元モデルから、第V I I I因子の活性の重要な領域について予測し検討することが可能となる。このモデルを用いて、パーカーおよびホッジのアルゴリズムによって特性された第V I I I因子ペプチドエピトープの位置を決定した。これらのアルゴリズムによって予測された通り、Aドメイン内に位置するすべてのペプチドは第V I I I因子表面上で見出され、そして細部に至るまで完全に利用可能なものであった。

40

【0094】

エピトープと第I X a因子結合ループとの間の重なり合い(Glu¹⁸¹¹ - Tyr¹⁸¹⁵にまたがった共通する5残基)から、フィブリンクロット形成時の、対応する抗 - (Arg¹⁷⁹⁷ - Tyr¹⁸¹⁵)抗体の阻害作用を明らかにすることができるかもしれない。

【0095】

結果の分析

50

凝固試験において、ウサギの抗 - (C y s ^{3 2 9} - A s p ^{3 4 8}) 抗体および抗 - (A r g ^{1 6 5 3} - T y r ^{1 6 6 4}) 抗体の存在下では第 V I I I 因子活性の顕著な阻害が記録された。しかし、異なる阻害様式が観察された。抗 - (A r g ^{1 6 5 3} - T y r ^{1 6 6 4}) による阻害は、第 V I I I 因子活性の激しい低下を伴う二次反応速度式に従う。抗 - (C y s ^{3 2 9} - A s p ^{3 4 8}) I g の有効性はより小さく、そして、抗体の濃度に非線形的な依存性を伴ったさらに複雑なタイプの反応を示す。エピトープの A r g ^{1 6 5 2} - T y r ^{1 6 6 4} およびそれに近接する主な結合部位の v W F (G l u ^{1 6 7 5} - G l u ^{1 6 8 4} の残基) は、酸性軽鎖ペプチド a 3 内に位置する。ウエスタンブロッティングによって示されるとおり、トロンピン処理の後に A 3 ドメインから a 3 が遊離し、抗 - (A r g ^{1 6 5 2} - T y r ^{1 6 6 4}) I g が活性化第 V I I I 因子にさらに結合することを妨害する。同様の結果がシマラ (1 9 9 1) によって報告されており、彼らは、第 V I I I 因子活性を中和するウサギポリクローナル抗体の結合部位として、第 V I I I 因子の配列 A s p ^{1 6 6 3} - S e r ^{1 6 6 9} を記載していた。エピトープの C y s ^{3 2 9} - A s p ^{3 4 8} は、活性化されたプロテイン C の切断部位 (A r g ^{3 3 6}) およびトロンピンの切断部位 (A r g ^{3 7 2}) に近接するものとして記載されている (a 1 中の) 酸性の A s p ^{3 4 8} - L y s ^{3 6 2} 配列と重なり合っていた。これはヒト血友病インヒビターのターゲットである。抗 - (A s p ^{3 4 8} - L y s ^{3 6 2}) 抗体は、タンパク質分解または第 X 因子相互作用部位 (M e t ^{3 3 7} - A r g ^{3 7 2}) (サエンコら、 1 9 9 9 およびスキャンデラら、 2 0 0 0) を妨害するかもしれない。

10

【 0 0 9 6 】

20

1 3 種の I g 調製品のすべてについて、第 V I I I 因子 - 中和活性を測定した。7 種のヒト I g 調製品は、凝血促進活性を阻害することを示した。これらはそれぞれアミノ酸残基 C y s ^{7 1 1} - A s p ^{7 2 5}、 T y r ^{1 6 8 1} - A r g ^{1 6 9 6}、および A r g ^{1 7 9 7} - T y r ^{1 8 1 5} について特異的であった。 C y s ^{7 1 1} - A s p ^{7 2 5} 配列は、 T y r ^{7 1 8}、 T y r ^{7 1 9}、および T y r ^{7 2 3} において硫酸化チロシンを含有し、そして活性化と H C のタンパク質分解との両方を促進するものとして記載された第 V I I I 因子 H C 領域の L y s ^{7 1 3} - A r g ^{7 4 0} と重なり合う。添加された硫酸化群は、トロンピンまたは第 X 因子 - 活性化複合体において見られるような他の成分と適切に相互作用を行うために必要なものかもしれない。この配列もさらに領域 G l y ^{7 0 1} - S e r ^{7 5 0} と重なり合っており、阻害性マウスモノクローナル抗体によってかすかに認められる。ペプチド P 8 (T y r ^{1 6 8 1} - A r g ^{1 6 9 6}) (第 V I I I 因子 L C) は、シマラ、 1 9 9 1 によって既に記載されている配列 G l u ^{1 6 8 4} - A r g ^{1 6 8 9} を含有する。これはトロンピン活性化部位の A r g ^{1 6 8 9} - S e r ^{1 6 9 0} を含む。 P 4 (C y s ^{7 1 1} - A s p ^{7 2 5}) はさらに、患者抗体のレパートリーをジーンファージディスプレイ技術にて分析することによって検出された A s p ^{7 1 2} - A l a ^{7 3 6} 配列に含有される。これは、患者における潜在的な補助的インヒビターとして提案されている (ファンデンブリンクら、 2 0 0 0) 。ペプチド P 9 (A r g ^{1 7 9 7} - T y r ^{1 8 1 5}) は第 X a 因子結合部位を含有する (下記を参照すること) 。

30

【 0 0 9 7 】

ヒトから精製されたかまたはウサギ内で産生された 1 6 種の抗第 V I I I 因子 - ペプチド免疫グロブリンのうち、7 種は試験の条件下で第 V I I I 因子活性を中和した。小さなペプチドの配列と免疫結合アッセイを用いて、我々はさらなる新規エピトープの証拠を提供した。我々は、新規エピトープが A 1 ドメイン (S e r ^{1 0 9} - C y s ^{1 2 7} 残基) 内、 A 2 ドメイン (C y s ^{4 0 7} - L y s ^{4 2 5}) 内、および B ドメイン (S e r ^{8 1 7} - S e r ^{8 3 0} および G l u ^{1 0 7 8} - P r o ^{1 0 9 2}) 内に位置することを見出した。

40

【 0 0 9 8 】

変性第 V I I I 因子を用いて免疫精製された自己抗体が、健康な被験者内および正常ヒト免疫グロブリンのプール (画分 I I を処理したもの、上記を参照すること) 内で報告されている (エイルジマンら、 1 9 9 2 およびモローら、 2 0 0 0) 。血流からの変性第 V I I I 因子またはそのフラグメントのクリアランスにおけるおよび / または免疫トレラン

50

スにおける、考えられる役割が示唆された。

【 0 0 9 9 】

第 V I I I 因子の治療および治療用第 V I I I 因子濃縮物の質を改善するために、第 V I I I 因子エピトープを特定することは達成されるべき主な課題である。第 V I I I 因子エピトープ配列は、患者ポリクローナル抗第 V I I I 因子 I g が、全体的な阻害活性および活性の調節に寄与しているかどうかを決定することの助けになる。これらエピトープ配列はさらに、治療中の患者における抗第 V I I I 因子の特異性がいつものように転換することを監視することにも用いることが可能かもしれない。第 V I I I 因子エピトープのこのようなキャラクタライゼーションと、フォールディングしている分子上でのこれらエピトープの位置のモデルによって、血友病患者および非血友病患者の両者におけるインヒビターの取り扱い（検出、フォローアップおよび第 V I I I 因子エピトープペプチドの治療目的の使用など）が改善される。

【表 1】

表 1 ウサギ抗第V I I I 因子ペプチド抗体のキャラクタライゼーション

配列番号 (a)	ウサギ抗血清 (b)	E L I S A 力価 (c)		第V I I I 因子ドメインの認識 (d)	RAP-IgGの回収の程度 (e) μg/血清 ml	インヒビター力価 (f) BU/mg
		P-KLH	r-FVIII			
SEQ ID 11	RAP1	2.5	2.2	A1	27	-
SEQ ID 14	RAP2	3.6	2.5	A1/a1	55	1,5
SEQ ID 15	RAP3	2.5	3.2	A2	268	-
SEQ ID 19	RAP4	2.5	1.3	A2/a2	12	-
SEQ ID 21	RAP5	4.6	3.9	B	106	-
SEQ C	RAP6	3.8	2.9	-	14	-
SEQ ID 01	RAP7	3.9	3.9	a3 ↓	35	0,5
SEQ ID 02	RAP8	1.9	0.9	a3/A3 ↓	3	-
SEQ ID 05	RAP9	3.8	2.6	A3	42	-
SEQ ID 23	RAP10	3.9	0.8	-	65	-
SEQ ID 22	RAP11	ND	ND	ND	ND	ND
SEQ ID 26	RAP12	4,1	1,1	C2	ND	ND
SEQ ID 27	RAP13	3,7	1,1	C2	ND	ND
SEQ ID 28	RAP14	3,8	0,9	C2	ND	ND
SEQ ID 31	RAP15	3,2	0,7	C2	ND	ND
SEQ ID 32	RAP16	3,5	1,8	C2	ND	ND
SEQ ID 33	RAP17	4,8	1,2	C2	ND	ND

10

20

30

40

【表 2】

表2 ヒト抗第V I I I 因子ペプチド自己抗体のキャラクタライゼーション

配列番号 (a)	ヒト抗ペプチド Ig (b)	イムノプロットティングにおける 第V I I I 因子の反応性 (トロンビンなし) (c) (トロンビンあり) (d)		第V I I I 因子 ドメイン (e)	HAP-IgG の回収の程度 (f) μg/10 mgのIgG	第V I I I 因子 阻害活性 (g) BU/mg
SEQ ID 11	HAP1	>92kDa	50kDa	A1	0,27	-
SEQ ID 14	HAP2	>92kDa	50kDa	A1/a1	1,07	3,4
SEQ ID 15	HAP3	>92kDa	44kDa	A2	0,06	-
SEQ ID 19	HAP4	92kDa	44kDa	A2/a2	0,12	+
SEQ ID 21	HAP5	>100kDa	-	B	0,26	-
SEQ C	HAP6	-	-	-	0,03	-
SEQ ID 01	HAP7	80kDa	80kDa	a3 ↓	0,20	-
SEQ ID 02	HAP8	80kDa	80kDa	a3/A3 ↓	0,01	+
SEQ ID 05	HAP9	80kDa	72kDa	A3	0,08	+
SEQ ID 23	HAP10	-	-	-	0,11	-
SEQ ID 22	HAP11	ND	ND	ND	0,98	4,3
SEQ ID 26	HAP12	ND	ND	ND	ND	ND
SEQ ID 27	HAP13	ND	ND	ND	ND	ND
SEQ ID 28	HAP14	ND	ND	ND	ND	ND
SEQ ID 31	HAP15	ND	ND	ND	ND	ND
SEQ ID 32	HAP16	80kDa	72 kDa	ND	2,40	6,3
SEQ ID 33	HAP17	ND	ND	A3C1C2 ND	1,06	2,4

+: 100 μg/ml において25%を超える阻害性

10

20

30

40

参考文献

- Algiman, M., et al. (1992) Proc Natl Acad Sci USA. 89, 3795-3799
- Dietrich, G., et al. (1992), Blood 79, 2946-2951
- Ewenstein, B.M., et al.(2000), Haematologica 85 (suppl. 10), 35-39
- Foster, PA and Zimmerman, T.S. (1989), Blood Reviews 3, 190-191 10
- Janin, J. (1979) Nature 277, 491-492
- Karplus, PA and Schulz, GE. (1985) Naturwissenschaften 72, 212
- Knobf, P. and Derfler, K (1999), Vox Sanguinis 77 (suppl. 1), 57-64
- Laub, R., et al. (1999) Thromb Haemost. 81, 39-44
- Lollar P. (2000), Haematol. 85 (suppl 10), 26-30 20
- Moreau, A., et al. (2000) Blood 95, 3435-3441
- Morrisson and Ludlam. (1995), Br J Haematol. 89, 231-6
- Palmer, DS, et al. (1997) Vox Sang. 72, 148-161
- Parker, JMR, et al. (1986) Biochem. 25, 5425-5432
- Peerlinck, K. et al. (1997), Thromb Haemost 77, 80-86
- Pemberton, S., et al. (1997), Blood 89, 2413-2421
- Pratt KP. (2000), Curr. Opinion Drug Discovery & Development 3, 516-526 30
- Raut, S., et al. (1998), Thromb Haemost. 80, 624-631
- Reding, MT, et al. (2000), Thromb Haemost. 84, 643-52
- Reisner, HM, et al. In: Aledort LM et al, eds. Inhibitors to coagulation factors. New York, NY: Plenum Press (1995), 65-78
- Saenko, EL, et al. (1999), TCM 9, 185-192 40
- Scandella, D.(2000), Semin Thromb Haemost. 26, 137-142
- Shima, M., et al. (1991), Int J Haematol. 54, 515-522
- Toole et al. (1984) Nature 312, 342-7
- Tuddenham, EG and McVey, JH. (1998) Hemophilia 4, 543-545

- van den Brink, EN, et al. (2000) Blood. 96, 540-545
- Van Regenmortel, Methods: A companion to Methods in Enzymology, 9, page 465-472, 1996
- Verhar et al. (1984) Nature 312, 339
- Vermynen J. (1998), Hemophilia 4, 538-542

【図面の簡単な説明】

【0101】

10

【図1】図1は、第VII因子のA3配列の1から371に番号を付け替えられたアミノ酸の親水性、柔軟性および接近可能性の(それぞれのアミノ酸についての表面値の)グラフを表す。

【図2a】図2aは、ペプチド-セファロースカラム上でのアフィニティークロマトグラフィーによる、ヒト抗-配列番号:32抗体の精製に関する溶出プロファイルを表す。

【図2b】図2bは、コーン画分II+IIIから精製された抗-(配列番号:32)IgGの存在下での第VII因子凝固活性を表す。

【図3】図3は、ウエスタンブロッティング後の、第VII因子ポリペプチドに対するヒト抗ペプチド抗体の免疫反応を表す。

【図4】図4は、4種のインヒビター血漿の、異なるペプチド配列とのELISAでの反応性を表す。

20

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Departement central defractionnement de la Croix-Rouge S.C.R.L.
 Laub, Ruth
 Di Gianbattista, Mario

<120> ANTIGENIC EPITOPES OF FACTOR VIII, INHIBITORS DIRECTED AGAINST SAID
 EPITOPES AND USE THEREOF

<130> P.CDFR.02B/WO.Ext

<160> 33

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Asp Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 2 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3 30

Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr
 1 5 10

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe
 1 5

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His
1 5 10

<210> 11
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 11

Ala Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys
1 5 10 15

Glu Asp Asp Lys Val
20

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 12

Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
1 5 10

<210> 13
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Asp Glu Gly Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln
1 5 10 15

30

Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg Ala
20 25

<210> 14
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu
1 5 10 15

Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met
20 25

<210> 15
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro Gln Arg
1 5 10 15

Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys
20

10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg
1 5 10

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Tyr Lys Glu Ser Val Asp Gly Arg Gly Asn Gln
1 5 10

20

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

30

His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
1 5

<210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Gly Asp Ser Tyr Glu Asp
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser
 1 5 10

<210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Ser Asp Asp Pro Ser Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser
 1 5 10

<210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr
 1 5 10 15

Gly

<210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn
 1 5 10

10

20

30

40

<210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg
1 5 10

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 26

Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr
1 5 10 15

Asn

<210> 27
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 27

Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp
1 5 10 15

Arg Pro Gln

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 28

Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser
1 5 10 15

Leu

<210> 29
<211> 10
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu
1 5 10

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln
1 5 10

10

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp
1 5 10 15

Ser

20

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr
1 5 10

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

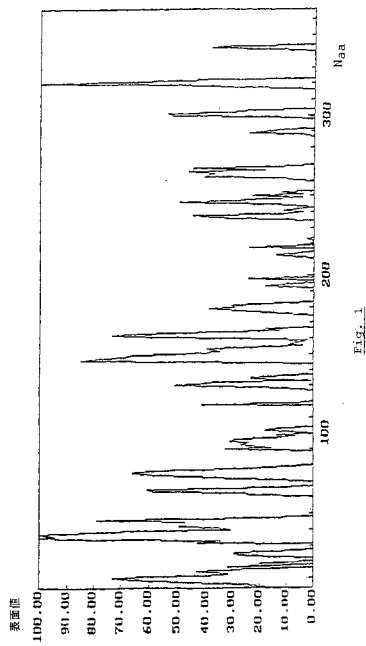
<213> Homo sapiens

<400> 33

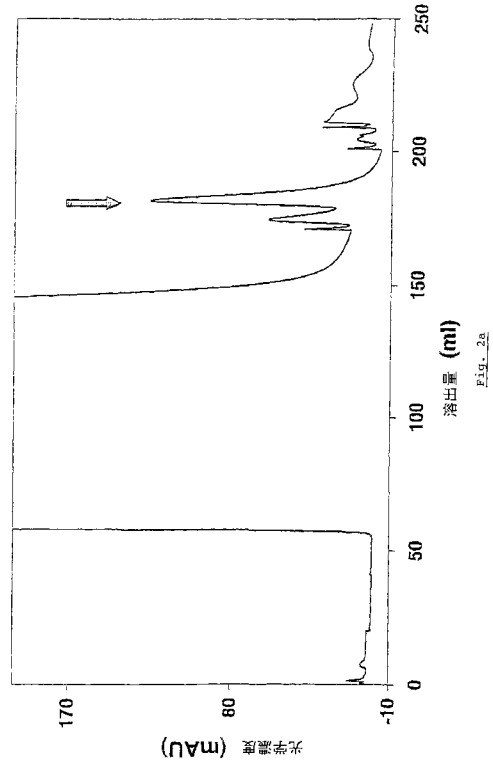
30

Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
1 5 10

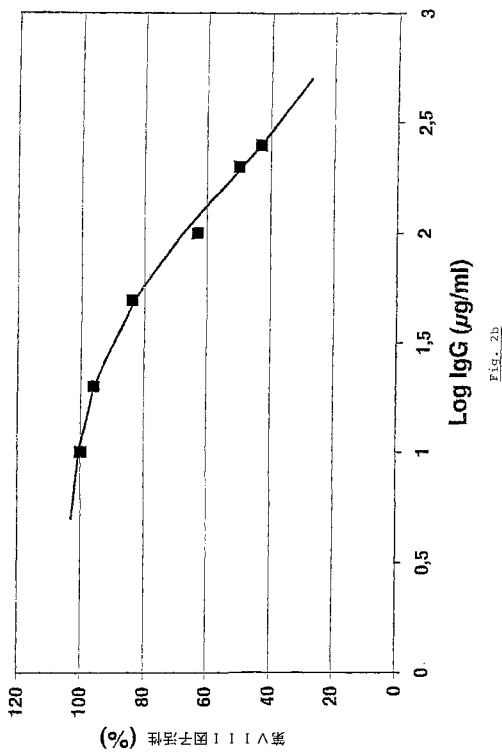
【 図 1 】



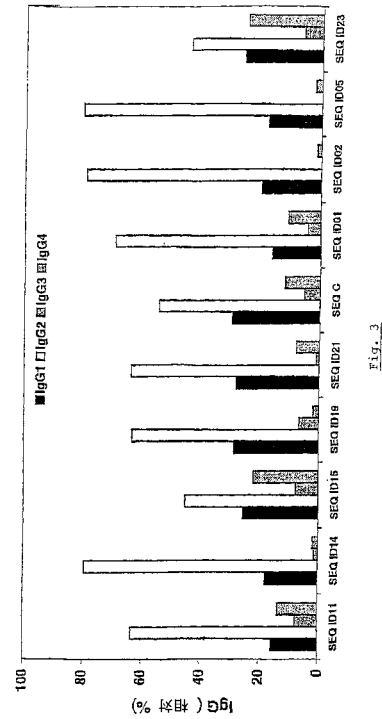
【 図 2 a 】



【 図 2 b 】



【 図 3 】



【 4 】

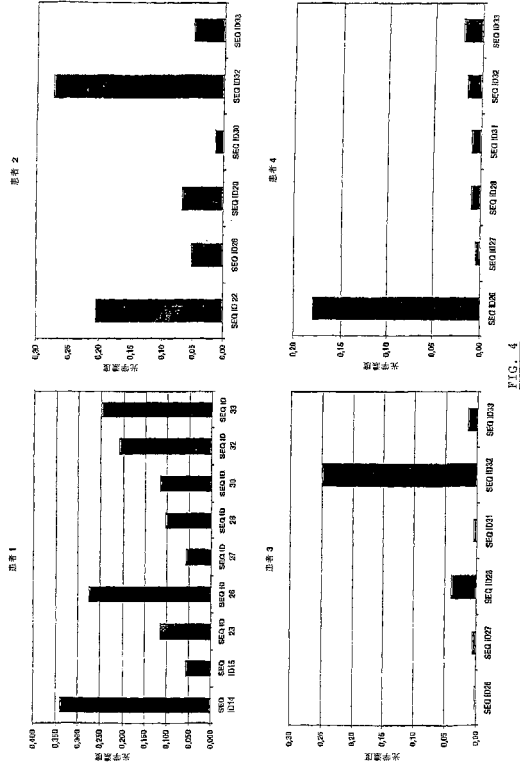


FIG. 4

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 30/88	(2006.01)	G 0 1 N 30/88	J
G 0 1 N 30/08	(2006.01)	G 0 1 N 30/08	L
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/531	(2006.01)	G 0 1 N 33/531	A
G 0 1 N 33/566	(2006.01)	G 0 1 N 33/566	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 37/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/00	

(72)発明者 ディ ジャムバチスタ, マリオ
ベルギー, ベ - 7 0 9 0 ブライン - ル - コンテ, ルー プロウシャート 2 4

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特表平 1 0 - 5 0 6 6 1 0 (J P , A)
国際公開第 0 0 / 0 3 4 3 1 7 (W O , A 1)
Nagoya J.Med.Sci.,2000,Vol.63, No.1/2,p.25-39

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
C07K 1/00-19/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
CA/REGISTRY(STN)

专利名称(译)	因子VIII的抗原表位，针对所述表位的抑制剂及其用途		
公开(公告)号	JP4500494B2	公开(公告)日	2010-07-14
申请号	JP2002587603	申请日	2002-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	中央部门去分馏空蒙特德·拉克鲁瓦胭脂ES晒麦芽酒萨尔瓦多		
申请(专利权)人(译)	中央部门去分馏空蒙特德拉十字-...日ES本身强麦萨尔瓦多.		
当前申请(专利权)人(译)	中央部门去分馏空蒙特德拉十字-...日ES本身强麦萨尔瓦多.		
[标]发明人	ローブルス ディジャムバチスタマリオ		
发明人	ローブ, ルス ディ ジャムバチスタ, マリオ		
IPC分类号	C07K7/08 C07K14/755 C07K11/16 C07K16/36 C07K16/42 G01N30/88 G01N30/08 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/566 A61K38/00 A61K39/395 A61P7/00 A61P37/00 A61K39/00 B01J20/281 C07K19/00 C12N15/12 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6878 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/0008 A61K2039/505 C07K14/755 C07K16/36 C07K2317/21 C07K2317/76 G01N2333/755 Y10S530/806		
FI分类号	C07K7/08.ZNA C07K14/755 C07K11/16 C07K16/36 C07K16/42 G01N30/88.J G01N30/08.L G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/531.A G01N33/566 A61K37/02 A61K39/395.D A61P7/00 A61P37/00		
代理人(译)	Kazehaya信明 浅野纪子		
优先权	09/853080 2001-05-09 US		
其他公开文献	JP2004535393A5 JP2004535393A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及针对针对抗原多肽序列的抑制剂的抗原多肽序列(因子VIII的表位)和针对所述抑制剂的抗抑制剂。本发明还涉及含有至少一种上述分子的药物组合物和诊断装置。点域

表位 (a)	抗体 (b)	ELISA 值 (c)	因子 VIII 抑制剂的抑制 (d)	因子 VIII 的回收率 (e)	因子 VIII 的回收率 (f)
SPQ ID 11	RA21	2.5	AL	27	-
SPQ ID 14	RA22	3.6	Al/a1	55	1.5
SPQ ID 15	RA23	2.5	A2	268	-
SPQ ID 19	RA24	2.5	A2/a2	12	-
SPQ ID 21	RA25	4.6	B	106	-
SPQ C	RA26	3.8	-	14	-
SPQ ID 01	RA27	3.9	a3 ↓	35	0.5
SPQ ID 02	RA28	1.9	a3/a3 ↓	3	-
SPQ ID 05	RA29	3.8	A3	42	-
SPQ ID 23	RA20	3.9	-	65	-
SPQ ID 22	RA211	ND	ND	ND	ND
SPQ ID 26	RA212	4.1	C2	ND	ND
SPQ ID 27	RA213	3.7	C2	ND	ND
SPQ ID 28	RA214	3.8	C2	ND	ND
SPQ ID 31	RA215	3.2	C2	ND	ND
SPQ ID 32	RA216	3.5	C2	ND	ND
SPQ ID 33	RA217	4.8	C2	ND	ND