

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4613133号
(P4613133)

(45) 発行日 平成23年1月12日 (2011. 1. 12)

(24) 登録日 平成22年10月22日 (2010. 10. 22)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 38/48	(2006. 01)	A 6 1 K 37/547
A 6 1 K 38/55	(2006. 01)	A 6 1 K 37/64
A 6 1 K 38/43	(2006. 01)	A 6 1 K 37/465
A 6 1 P 7/04	(2006. 01)	A 6 1 P 7/04
A 6 1 K 9/08	(2006. 01)	A 6 1 K 9/08

請求項の数 10 (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-514578 (P2005-514578)
 (86) (22) 出願日 平成16年10月6日 (2004. 10. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2004/014731
 (87) 国際公開番号 W02005/034990
 (87) 国際公開日 平成17年4月21日 (2005. 4. 21)
 審査請求日 平成19年5月1日 (2007. 5. 1)
 (31) 優先権主張番号 特願2003-350179 (P2003-350179)
 (32) 優先日 平成15年10月9日 (2003. 10. 9)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000173555
 一般財団法人化学及血清療法研究所
 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
 (74) 代理人 100068526
 弁理士 田村 恭生
 (74) 代理人 100087114
 弁理士 齋藤 みのり
 (74) 代理人 100126778
 弁理士 品川 永敏
 (72) 発明者 荒木 辰也
 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号 財団法
 人化学及血清療法研究所内
 (72) 発明者 友清 和彦
 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号 財団法
 人化学及血清療法研究所内
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アンチトロンビン I I I 含有止血用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分離精製した活性化血液凝固第 V I I 因子 (F V I I a) 及び血液凝固第 X 因子 (F X) を単一容器内に混合して含有する溶液状止血用組成物に、さらにアンチトロンビン I I I (A T - I I I) を加えたことを特徴とする、薬剤学的に安定な溶液状止血用組成物。

【請求項 2】

含有される F V I I a、F X 及び A T - I I I の濃度が各々 1 ~ 2 0 μ M、5 ~ 4 0 0 μ M 及び 0 . 1 ~ 5 . 0 国際単位 / m L である、請求項 1 記載の溶液状止血用組成物。

【請求項 3】

p H が 5 . 0 を超える範囲である、請求項 1 または 2 記載の溶液状止血用組成物。

10

【請求項 4】

p H が 5 . 0 を超え、7 . 0 未満の酸性領域にある、請求項 3 記載の溶液状止血用組成物。

【請求項 5】

p H が 5 . 5 以上、6 . 5 以下の酸性領域にある、請求項 3 記載の溶液状止血用組成物。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の溶液状止血用組成物を凍結乾燥してなる凍結乾燥止血用製剤。

【請求項 7】

F V I I a 及び F X を単一容器内に混合して含有する溶液状止血用組成物に A T - I I I

20

を加えることを特徴とする当該溶液状止血用組成物の安定化方法。

【請求項 8】

該組成物の pH が 5 . 0 を超える範囲である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

該組成物の pH が 5 . 0 を超え、7 . 0 未満の酸性領域にある、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

該組成物の pH が 5 . 5 以上、6 . 5 以下の酸性領域にある、請求項 8 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明は医療用医薬品の分野に関し、血漿蛋白質を含有する新たな止血用組成物及び製剤に関する。詳細には、活性化血液凝固第ⅤⅡ因子（以下、「FⅤⅡa」と称することがある）及び血液凝固第Ⅹ因子（以下、「FX」と称することがある）を単一容器内に混合して含有し、これにさらにアンチトロンビンⅢ（以下、「AT-Ⅲ」と称することがある）を加えたことを特徴とする治療用薬剤に関する。さらに本発明は、FⅤⅡa及びFXを同一容器内に混合して含有する溶液状止血用組成物にAT-Ⅲを加えることを特徴とする当該溶液状止血用組成物の安定化方法に関する。

【背景技術】

【0002】

20

血友病インヒビター患者の止血管理には、活性型プロトロンビン複合体製剤（APCC製剤）や遺伝子組換え活性型血液凝固第ⅤⅡ因子製剤（rFⅤⅡa製剤）等が用いられている。しかしながら、前者は安全性において、後者は有効性において満足のいくものとはいえず、本発明者等はこれらの欠点を補った止血剤として、FⅤⅡaとFXを複合した医薬組成物の有用性を示した（特許文献1参照）。

【0003】

これら止血管理に用いる蛋白質を主要成分とする医薬組成物は、静脈内投与が最適であり、使用に適した形態でアンプル、注射器やバイアル等の容器に封入した剤型として供給される。より一般的には、蛋白質を凍結乾燥物として含有する容器と、その凍結乾燥物の溶解に適した溶液を含有する容器とからなるセットが用いられている。血液凝固因子に関連した蛋白質濃縮物は、血漿由来もしくは遺伝子組換え技術を用いて調製された薬剤が製剤化されているが、それらの殆どが上記のような凍結乾燥粉末と溶解液のセットとして供給されている。

30

【0004】

FⅤⅡaとFXを複合した製剤の剤型を考案する場合、2つの方策がある。1つはFⅤⅡaとFXとを別々の容器に入れて用意する方策であり、もう1つはFⅤⅡaとFXとを混合して単一の容器に入れて用意する方策である。後者は混合した溶液の凍結乾燥粉末と溶解液からなるセットとなり、1セット計2個の容器で足りるのに対し、前者はそれぞれの因子につき凍結乾燥粉末と溶解液のセットとなり、2セット計4個の容器が必要となる。加えて、前者は溶解液を凍結乾燥粉末の容器に移注する装置や操作を余分に必要とするため、利便性の観点からも好ましくない。このようにFⅤⅡaとFXとを混合して調製し、単一の容器に封入することができれば、薬剤本来の薬学的な有用性だけでなく、さらに製剤学的な利便性をも兼ね備えた製剤となり得る。

40

【0005】

図1に示すようにFⅤⅡaとFXは酵素と基質の関係にあり、生理的条件下でFⅤⅡaは、リン脂質やCa²⁺存在下に、血管傷害部位に現れる組織因子と複合体を形成してFXを加水分解する。その結果生じたFXaは引き続き生じる酵素反応を惹起し、最終的には、不溶性のフィブリンを形成することで止血に至る。しかしながら、このFXaは、血管傷害部位のような出血局所にて産生される場合には、止血効果を示す有効な因子である一方で、全身循環で過剰に存在する場合には、全身的な過凝固を誘引することが報告されているだけでなく（非特許文献1参照）、血管内皮細胞や糸球体間質細胞の活性化を

50

介した炎症の惹起にも寄与している（非特許文献2及び非特許文献3参照）という好ましくない一面が示唆されている。

【0006】

F V I I aによるF Xの加水分解は、両者が非生理的な高濃度で存在する場合にはF X aの産生はもはや制御することができず、その結果、大量のF X a産生を生じる。また、それらにより生じるF X aは、F V I I aを基質として分解不活化してしまうために（非特許文献4参照）、安定な溶液として存在することは困難である。このように、不安定な状態のままで製剤化することもできないし、ましてやそのような溶液を患者へ投与することはできない。

【0007】

これまで述べてきたように、精製分取された酵素と基質を混合して単一容器内に封入するような概念の既存製剤はなかったため、本発明者等はこれらの課題を克服する技術の1つを示した（特許文献2参照）。当該発明はF V I I a及びF Xの混合液状組成物並びに当該組成物の凍結乾燥製剤に関するものであり、F V I I aをその至適pHであるpH6.5～10.0を外れた酸性領域下（pH5.0～6.5）においてF Xと混合することを特徴とするものである。すなわち、F V I I a自体の加水分解活性を制御することによってF X aの産生を低下せしめようとするものである。

【0008】

【特許文献1】特開2001-181204号公報

【特許文献2】国際公開第03/006054号パンフレット

【非特許文献1】ガイルズ（Giles, A. R.）ら、British Journal of Haematology, 1988, 69: p. 491 - 497

【非特許文献2】カメラー（Camerer E.）ら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97: p. 5255 - 5260

【非特許文献3】モンノ（Monno R.）ら、Journal of the American Society of Nephrology, 2001, 12: p. 891 - 899

【非特許文献4】バジャジ（Bajaj, S. P.）ら、The Journal of Biological Chemistry, 1973, 248: p. 7729 - 7741

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

一方、血友病という患者の特殊性から、しばしば血液凝固因子製剤の投与は患者自らもしくははその保護者による注射という方法が取られる。このような使用時の態様に配慮した製剤化を考慮すると、製剤の投与容量は少ないほうが好ましく、すなわち酵素F V I I a及び基質F Xを極めて高濃度にすることが望まれる。さらに、そのような場合であってもF X a量の増加を極力抑制することが必要である。その意味においては、先述した国際公開第03/006054号パンフレットに開示された、F V I I a及びF Xの混合溶液を酸性領域下（pH5.0～6.5）におくことによりF X aの産生を抑制する方法には限界があり、極めて少量のF X a量を高感度に測定すると、それら酸性領域の緩衝液においてさえも僅かではあるが経時的なF X a量の増大が認められる。

【0010】

このように、極めて高濃度のF V I I a及びF Xからなる混合溶液中に存在し、増加するF X a量を、薬剤の使用に際して必要な一定の時間、一定の濃度に制御する方法はなく、従来、この課題に対して克服する技術がなかった。

【課題を解決するための手段】

【0011】

そこで、本発明者らは酵素であるF V I I aと基質であるF Xとを極めて高濃度に混合して単一容器内へ封入し、さらに極めて安定な状態を保持し得る剤型を開発すべく鋭意研究した結果、驚くべきことに、F V I I aとF Xとの極めて高濃度の混合物にアンチトロンビンI I I (A T - I I I)を加えることによって産生されたF X aが特異的に阻害される結果、従来の活性型血液凝固因子製剤では試みられることのなかった酵素・基質の極めて安定な混合組成物及び当該混合組成物からなる止血用製剤が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0012】

すなわち、本発明は、F V I I a及びF Xを単一容器内にて混合した溶液状止血用組成物にさらにA T - I I Iを混合してなる安定化された溶液状止血用組成物、及び当該組成物を凍結乾燥して得られる止血用の治療用薬剤を提供するものである。本発明は、F V I I aとF Xとの混合溶液状止血用組成物中に所要量のA T - I I Iを加えることにより、産生されたF X aを特異的に阻害させることによって、遊離F X a量を制御するものである。

10

【発明の効果】

【0013】

本発明により、安全性及び有効性に優れ、かつ安定性と利便性が向上した新規な止血用製剤が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0014】

20

【図1】内因系凝固と外因系凝固に関する二つの経路の血液凝固カスケードを示す図である。

【0015】

【図2】F V I I a及びF Xを混合してなる溶液状組成物に対し、所定のp H条件下におけるF X aの生成状況を示す図である。

【0016】

【図3】F V I I a及びF Xを混合してなる溶液状組成物に対し、所定のp H条件下にA T - I I Iを加えた場合の遊離F X aの生成状況を示す図である。

【0017】

【図4】F V I I a及びF Xを混合してなる溶液状組成物に対し、異なる濃度のA T - I I Iを加えた場合の遊離F X aの生成状況を示す図である。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本発明に使用されるF V I I a、F X及びA T - I I Iを製造する方法は特に限定されることはなく、例えばヒト血液より分離する方法あるいは遺伝子組換え技術により作製する方法などによって製造することができる。

【0019】

血液由来のF V I I aの製法としては、例えば、特開平3 - 155797号公報、特開平10 - 059866号公報及び特開平10 - 059867号公報に示される方法がある。また、新鮮凍結ヒト血漿を冷融解・遠心処理してクリオプレシピテートを除いた脱クリオ血漿から、陰イオン交換クロマトグラフィーにより粗精製後、抗F V I Iモノクローナル抗体固定化カラムを用いてのアフィニティークロマトグラフィーによってF V I Iを精製した後、他の血漿蛋白質、例えば活性化血液凝固第X I I因子、F X aなどによりF V I IをF V I I aに活性化する方法がある。なお得られるF V I I aは、プロトロンビン、トロンビン、F I X及びF I X aを可能な限り伴わない方が好ましい。

40

【0020】

血液由来のF Xの製法としては、例えば、新鮮凍結ヒト血漿を冷融解・遠心処理してクリオプレシピテートを除いた脱クリオ血漿から、陰イオン交換クロマトグラフィーにより粗精製後、抗F Xモノクローナル抗体固定化カラムを用いてのアフィニティークロマトグラフィーによってF Xを精製する方法がある。前記と同様、得られるF Xは、プロトロン

50

ピン、トロンピン、F I X 及び F I X a を可能な限り伴なわない方が好ましい。

【 0 0 2 1 】

血液由来の A T - I I I の製法としては、例えば、新鮮凍結ヒト血漿を冷融解・遠心処理してクリオプレシペートを除いた脱クリオ血漿から、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーにより粗精製後、沈殿分画により製する方法がある。

【 0 0 2 2 】

A T - I I I を添加する際の濃度は 0 . 1 ~ 5 . 0 国際単位 / m L の範囲であることが好適であり、これより低濃度では十分な F X a 阻害効果を得ることができず、遊離の F X a 量は増加する。また、これより高濃度では F X a 阻害効果を得るという目的に対し過剰量過ぎる。その意味で添加量は通常 0 . 2 ~ 2 . 0 国際単位 / m L 、好ましくは 0 . 5 ~ 1 . 0 国際単位 / m L が用いられ、その範囲では F V I I a 及び F X 各々の成分の活性低下や遊離 F X a 量の増加は全く問題にならない。

10

【 0 0 2 3 】

A T - I I I を添加する際の緩衝液の p H は、5 . 0 を超える範囲、好ましくは 5 . 0 を超え、7 . 0 未満の酸性領域、さらに好ましくは 5 . 5 以上、6 . 5 以下の酸性領域であればよい。p H 5 . 0 以下の酸性領域では酵素である F X a とその阻害剤である A T I I I の反応が起こらなくなり、F X a 阻害効果を得ることができない。一方、p H 7 . 0 以上の p H 領域でも A T I I I による一応の F X a 阻害効果は得られるが、F X a の増加水準が高いため実用的ではない。

【 0 0 2 4 】

20

本発明の A T - I I I を添加する溶液状組成物に使用される成分組成の、好適な含量は、F V I I a 及び F X の濃度が各々 1 ~ 2 0 μ M 、5 ~ 4 0 0 μ M であり、さらに、好ましい態様として、0 . 0 0 1 ~ 1 重量 % の非イオン性界面活性剤並びに 0 . 0 1 重量 % 以上のアルブミン、糖類及びアミノ酸からなる群から選ばれた 1 種または 2 種以上の化合物の共存により、組成物の保存安定性のみならず、当該液状組成物を凍結乾燥した場合はその再構成時の溶解を容易にする。

【 0 0 2 5 】

当該組成物もしくは止血用製剤の投与対象は、様々な止血障害を有し出血傾向にある患者であれば特に限定されることはない。

【 0 0 2 6 】

30

以下、実施例に沿って本発明をさらに詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。

【 実施例 1 】

【 0 0 2 7 】

A T - I I I 不在下での遊離 F X a の生成

F V I I a / F X 混合物の緩衝溶液中の安定性を調べる目的で、所定の p H を有する各々の緩衝液 (C a C l ₂ 非存在下、クエン酸緩衝液 : 1 0 m M クエン酸ナトリウム、1 2 0 m M N a C l 、0 . 5 % グリシン、2 % アルブミン、5 0 p p m ツイーン 8 0) 下に、F V I I a 及び F X を終濃度 0 . 6 m g / m L (約 1 2 μ M) 及び 6 . 0 m g / m L (約 1 0 0 μ M) になるよう混合し、室温で放置した。各放置時間後のサンプル中の F V I I a 活性、F X 活性及び F X a 活性はそれぞれの因子が影響することのない系を用いて測定した。なお、ここで用いた F V I I a は、特開平 3 - 1 5 5 7 9 7 号公報に記載の方法による血液由来の標品である。また、ここで用いた F X は、新鮮凍結ヒト血漿を冷融解・遠心処理してクリオプレシペートを除いた脱クリオ血漿から、陰イオン交換クロマトグラフィーにより粗精製後、抗 F X モノクローナル抗体固定化カラムを用いてのアフィニティークロマトグラフィーによって製された血液由来の標品であった。

40

【 0 0 2 8 】

その結果、F V I I a 及び F X の両活性ともに、緩衝溶液中どの p H においても 1 8 時間のインキュベーションにおいて 9 0 % 以上の活性を保持していた。F X a 含量は、特異的な合成基質 (S 2 7 6 5) 水解活性から算出し、F X とのモル比として図 2 に示した。

50

その結果、図 2 に示すように高感度の測定系を用いて F X a 量を定量することにより、p H 6 . 0 及び p H 5 . 5 の溶液中においても僅かではあるが F X a 量の増加が認められた。

【実施例 2】

【0029】

A T - I I I 添加による F X a 阻害効果

F V I I a / F X 混合物の緩衝溶液中の安定性を高める目的で、実施例 1 に示した各 p H を有する各々の緩衝液下に、F V I I a および F X を終濃度 0 . 6 m g / m L 及び 6 . 0 m g / m L になるよう混合し、さらに A T - I I I を終濃度 1 . 0 国際単位 / m L になるよう添加し、室温で放置した。各放置時間後のサンプル中の F V I I a 活性、F X 活性及び F X a 活性はそれぞれの因子が影響することのない系を用いて測定した。なお、ここで用いた F V I I a、F X は実施例 1 と同じく調製した。また、ここで用いた A T - I I I は、新鮮凍結ヒト血漿を冷融解・遠心処理してクリオプレシピテートを除いた脱クリオ血漿から、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーにより粗精製後、沈殿分画により製された血液由来の標品であった。

10

【0030】

その結果、F V I I a 及び F X の両活性ともに、緩衝溶液中どの p H においても 1 8 時間のインキュベーションにおいて 9 0 % 以上の活性を保持していた。すなわち、活性化された凝固因子である F V I I a は A T - I I I 1 . 0 国際単位 / m L 存在下においても何ら影響されなかった。F X a 含量は、特異的な合成基質 (S 2 7 6 5) 水解活性から算出し、F X とのモル比として図 3 に示した。図 3 から明らかなように、A T - I I I 非存在下では著しい F X a 量の増加を示す p H 6 . 5 の溶液中において、A T - I I I 存在下では F X a 量の増加が顕著に抑制された。さらに、A T - I I I 非存在下では僅かながら F X a 量の増加を示す p H 6 . 0 及び p H 5 . 5 の溶液中において、A T - I I I 存在下では F X a 量の増加は殆ど認められなかった。一方、p H 5 . 0 の緩衝液では、A T - I I I による当該阻害効果は認められなかった (データは示していない) 。

20

【実施例 3】

【0031】

各種濃度の A T - I I I 添加による F X a 阻害効果

F V I I a / F X 混合物の緩衝溶液中の安定性を高めるために要する A T - I I I の濃度を調べる目的で、実施例 1 に示した緩衝液組成の p H 5 . 7 条件下に、F V I I a および F X を終濃度 0 . 6 m g / m L 及び 6 . 0 m g / m L になるよう混合し、さらに A T - I I I を終濃度 0、0 . 1、0 . 2、0 . 5、1 . 0 国際単位 / m L になるよう添加し、室温で放置した。各放置時間後のサンプル中の F V I I a 活性、F X 活性及び F X a 活性については実施例 1 と同様の方法にて測定した。なお、ここで用いた F V I I a、F X は実施例 1 と同じく調製した。また、ここで用いた A T - I I I は、実施例 2 と同じく調製した。

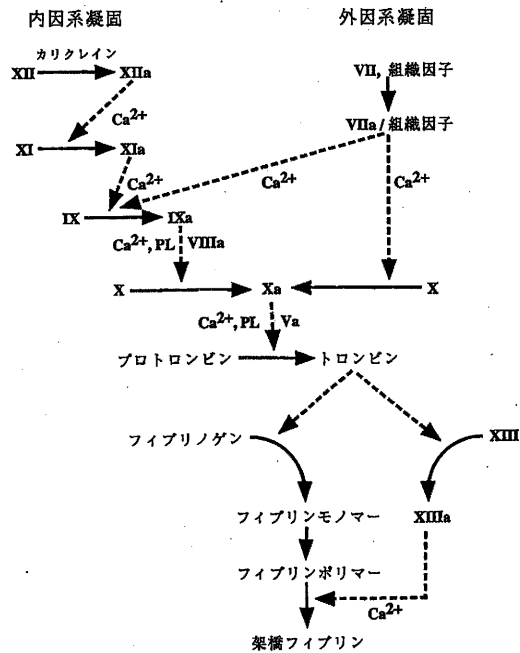
30

【0032】

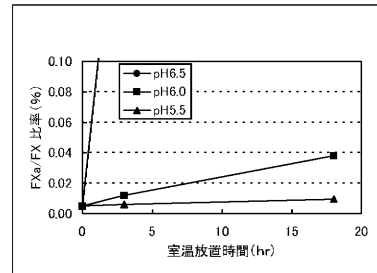
その結果、F V I I a 及び F X の両活性ともに、緩衝溶液中どの A T - I I I 濃度においても 1 8 時間のインキュベーションにおいて 9 0 % 以上の活性を保持していた。F X a 含量は、特異的な合成基質 (S 2 7 6 5) 水解活性から算出し、F X とのモル比として図 4 に示した。図 4 から明らかなように、用いたどの濃度の A T - I I I 存在下においても F X a 量の増加は殆ど認められなかった。また、そのときの F X a 量は A T - I I I 濃度依存的に低下しており、その低下効果は 0 . 5 国際単位 / m L 以上ではほぼプラトーであった。

40

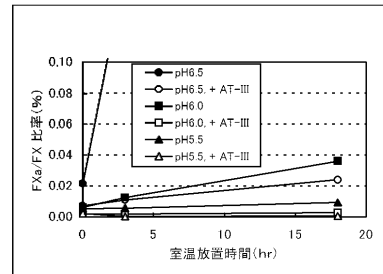
【図 1】



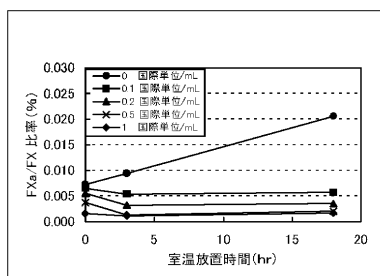
【図 2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 9/19 (2006.01) A 6 1 K 9/19

(72)発明者 中富 靖
熊本県熊本市大窪一丁目6番1号 財団法人化学及血清療法研究所内

(72)発明者 中垣 智弘
熊本県菊池市旭志川辺1314番地1 財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内

(72)発明者 緒方 洋一
熊本県熊本市大窪一丁目6番1号 財団法人化学及血清療法研究所内

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 国際公開第03/006054(WO,A1)
特開平02-167234(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

A61K 38/48

A61K 9/08

A61K 9/19

A61K 38/43

A61K 38/55

A61P 7/04

BIOSIS(STN)

CAPLUS(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)