

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-529155

(P2010-529155A)

(43) 公表日 平成22年8月26日 (2010. 8. 26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 37/48	
C 0 7 K 14/755 (2006.01)	C 0 7 K 14/755	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁)

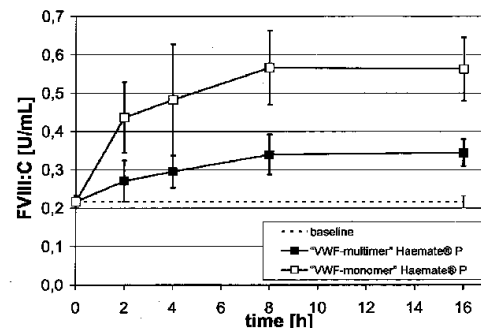
(21) 出願番号	特願2010-511541 (P2010-511541)	(71) 出願人	597070264 ツェー・エス・エル・ベアリング・ゲー・ エム・ペー・ハー ドイツ連邦共和国 D-35041 マルブ ルク・エミル フォン ベアリング シュ トラーセ 76
(86) (22) 出願日	平成20年6月13日 (2008. 6. 13)	(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(85) 翻訳文提出日	平成22年1月29日 (2010. 1. 29)	(74) 代理人	100105290 弁理士 三輪 昭次
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/004770	(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
(87) 国際公開番号	W02008/151817	(72) 発明者	ウルリッヒ・クロンターラー ドイツ連邦共和国 82041 ダイゼンホー フェン・シュテファニー・シュトラッセ5 最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成20年12月18日 (2008. 12. 18)		
(31) 優先権主張番号	07011545.6		
(32) 優先日	平成19年6月13日 (2007. 6. 13)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 出血性疾患の治療及び予防的処置における血管外投与のための VWF 安定化 F V I I I 製剤及び F V I I I なしの VWF 製剤の使用

(57) 【要約】

本発明は、出血性疾患の治療及び予防的処置における血管外投与のための、フォンビルブラント因子 (VWF) 製剤、又は凝固第 V I I I 因子 (F V I I I) との組み合わせの VWF 製剤の使用に関する。

Figure 16: Time course of mean FVIII activity plasma levels $\pm$ SD following s.c. injection of 500 U (FVIII:C)/kg Haemate[®] P preparations, characterized by different VWF:RC₀ / VWF:Ag ratios (n=4/timepoint)



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

精製フォンビルブラント因子（VWF）及び第ⅢⅢⅢ因子（FⅢⅢⅢ）を含む、フォンビルブラント病（VWD）及び／又は血友病 A の治療における血管外投与に適した組成物であって、ここで VWF：Ag 対 FⅢⅢⅢ：C の比が 5：1 より大きい組成物。

【請求項 2】

フォンビルブラント因子がヒト血漿から誘導され、組み換えによって生産される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

VWF が非複合である、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

血管外投与する場合の、VWD 及び／又は血友病 A を治療する薬剤を製造するための請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

【請求項 5】

VWD 及び／又は血友病 A を処置する薬剤を製造するための VWF の使用であって、ここで FⅢⅢⅢの前記薬剤組成物が、同じ濃度、用量で、そして同じ様式の血管外投与であるが VWF なしで投与される場合のそれぞれのパラメータと比較して、FⅢⅢⅢの薬物製剤との血管外共投与後の、

a) 注射後血漿中の FⅢⅢⅢ活性を少なくとも 0.01 U/ml 高める期間が延長される；又は、

20

b) 血漿中の FⅢⅢⅢ活性の最大濃度が増加する；又は、

c) FⅢⅢⅢ活性のデータ曲線下面積（AUC）が増加する；

のいずれかである、使用。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の VWF の使用であって、ここで FⅢⅢⅢの前記薬剤組成物が、同じ濃度、用量で、そして同じ様式の血管外投与であるが VWF なしで投与される場合のそれぞれのパラメータと比較して、FⅢⅢⅢの薬物製剤との血管外共投与後の、

a) 注射後血漿中の FⅢⅢⅢ活性を少なくとも 0.01 U/ml 高める期間が少なくとも 3 倍延長される；又は、

b) 血漿中の FⅢⅢⅢ活性の最大濃度が少なくとも 3 倍増加する；又は、

30

c) FⅢⅢⅢ活性のデータ曲線下面積（AUC）が少なくとも 5 倍増加する；

のいずれかである、使用。

【請求項 7】

VWD 及び／又は血友病 A を処置する薬剤を製造するための VWF の使用であって、ここで FⅢⅢⅢの薬物製剤による血管外共投与後に、FⅢⅢⅢの前記薬剤組成物が、同じ濃度、用量で、そして同じ様式の血管外投与であるが VWF なしで投与される場合と比較して、FⅢⅢⅢに対する阻害抗体の生成がより少ない、使用。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の使用であって、ここで VWF 製剤が FⅢⅢⅢの薬物製剤と血管外共投与される場合、FⅢⅢⅢの前記薬剤組成物が、同じ濃度、用量で、そして同じ様式の血管外投与であるが VWF なしで投与される場合と比較して、阻害抗体の生成が少なくとも 15% 少なく、ここで阻害抗体のタイターはベセズダ分析で測定される、使用。

40

【請求項 9】

VWD 及び／又は血友病 A を処置する薬剤を製造するための VWF の使用であって、ここで投与される VWF が血管外投与され、そして 1：0.35 より小さい VWF：RCOF/VWF：Ag 比を有する、使用。

【請求項 10】

VWD 及び／又は血友病 A を処置する薬剤を製造するための VWF の使用であって、ここで投与される VWF が血管外投与され、そして 1：1.05 に等しいか又はそれより小さい VWF：RCOF/VWF：Ag 比を有する、使用。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、出血性疾患の治療及び予防的処置における血管外投与のための、フォンビルブラント因子（VWF）製剤、又は凝固第V因子（FV）との組み合わせのVWF製剤の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

VWFは、哺乳動物の血漿に存在する多量体接着性糖タンパク質であり、多様な生理機能を有する。一次止血中、VWFは血小板表面の特異的受容体及びコラーゲンなどの細胞外マトリックス成分間のメディエータとして作用する。GPIIb/IIIa受容体を経由して、VWFは、また、血小板-血小板相互作用を促進することを介して止血にも寄与する。更に、VWFは、凝固促進FVの担体及び安定化タンパク質としての機能を果たす。VWFは、内皮細胞及び巨核球内で2813アミノ酸前駆体分子として合成される。その前駆体ポリペプチドのプレーローVWFは、成熟血漿VWFに認められる22残基シグナルペプチド、741残基プロペプチド及び2,050残基ポリペプチドから成る（非特許文献1）。血漿中に分泌されると、VWFは種々の分子サイズを有する多様な種の形態で循環する。これらのVWF分子は、2,050アミノ酸残基の成熟サブユニットのオリゴマー及びマルチマーから成る。VWFは、通常、1つのダイマーから50～100個のダイマーから成るマルチマーまでの形態として血漿中に認めることができる（非特許文献2）。ヒト循環系におけるヒトVWFのインビボ半減期は、およそ12～20時間である。

【0003】

ヒトの最も高頻度の遺伝性出血性疾患はフォンビルブラント病（VWD）であり、これは血漿又は組み換え起源のVWFを含有する濃縮液を用いる代償療法によって処置し得る。

【0004】

VWFは、例えば特許文献1に記載のようにヒト血漿から調製することができる。特許文献2は、組み換えVWFを分離する方法を記載している。

【0005】

VWFはインビボでFVを安定化することが知られ、従って、血漿レベルのFVを調節する重要な役割を担い、そしてその結果として、一次及び二次止血を調節する主要因子となる。また、VWF含有薬物製剤をVWD患者へ静脈内投与した後、24時間で内因性FV：Cが1～3単位/ml増加することを観察することができ、FVに対するVWFのインビボ安定化効果を示すことが知られている。

【0006】

FVは、哺乳動物の肝臓で産生される約260kDa分子質量の血漿糖タンパク質である。これは血液凝固をもたらす凝固反応のカスケードの必須成分である。このカスケード内には、第IX因子（FIX）が、FVと連動して第X因子（FX）を活性型のFXに変換するステップがある。FVはこのステップの補因子として作用し、FIXの活性にはカルシウムイオン及びリン脂質が必須である。最も一般的な血友病性疾患は、機能的FVの欠乏によって引き起こされ、血友病Aと呼ばれる。

【0007】

血友病Aの処置の重要な進歩は、ヒトFVの完全な2,351アミノ酸配列をコードするcDNAクローンの単離であり（特許文献3）、並びにヒトFV遺伝子DNA配列及びその生産のための組み換え法の提供であった。

【0008】

クローン化cDNAから決定されたヒトFVの推定一次アミノ酸配列分析の結果は、それが大きな前駆体ポリペプチドからプロセシングされたヘテロダイマーであることを示す。このヘテロダイマーは、約210kDaのN末端重鎖フラグメントと金属イオン

10

20

30

40

50

依存的に会合した約80 kDaのC末端軽鎖から成る（非特許文献3の総説を参照）。ヘテロダイマーの生理的活性化は、トロンビンによるタンパク質鎖のタンパク質分解的切断を介して起こる。トロンビンは、重鎖を90 kDaタンパク質に切断し、次いで54 kDa及び44 kDaフラグメントに切断する。トロンビンは、また、80 kDa軽鎖を72 kDaタンパク質に切断する。それは、後者のタンパク質でありそしてカルシウムイオンにより一緒に保持される、活性FV IIIを構成する2つの重鎖フラグメント（上記54 kDa及び44 kDa）である。不活性化は、72 kDa及び54 kDaタンパク質が、トロンビン、活性化タンパク質C又はFXaによって更に切断される場合に起こる。血漿中では、このFV III複合体は、上述のようにFV IIIのタンパク質分解的破壊を阻害するように見える、50倍過剰のVWFタンパク質（「VWF」）と結びつくことにより安定化される。

10

【0009】

FV IIIのアミノ酸配列は、3つの構造ドメイン：330アミノ酸の三重Aドメイン、980アミノ酸の単一Bドメイン、及び150アミノ酸の二重Cドメインで構成されている。Bドメインは他のタンパク質と相同性を有さず、そして本タンパク質の25の可能性あるアスパラギン（N）結合グリコシル化部位のうち18を与える。Bドメインは明らかに凝固における機能はなく、そして尚凝固促進活性を有するBドメイン欠失FV III分子で欠失され得る。

【0010】

FV IIIに対するVWFの安定化作用も、CHO細胞中のVWFの組み換え体の発現を補助するのに使用されている（非特許文献4）。

20

【0011】

今日まで、血友病A及びVWDの標準治療は、ヒトドナー血漿から誘導したFV III及びVWF濃縮物の製剤、又はFV IIIの場合、組み換えFV IIIに基づく薬物製剤の頻回静脈内注射を含む。これらの代償療法は、一般的に、例えば予防的処置を受ける重度血友病Aの患者に有効であるが、第V III因子は、約12時間の第V III因子の短い血漿中半減期のために、週当たり約3回静脈内投与（i.v.）する必要がある。健常非血友病患者のFV III活性の1%を超えるレベルに、例えば0.01 U/mlずつのFV IIIのレベル上昇により既に到達している場合、重度血友病Aは中等度血友病Aに変わる。予防的処置では、投与計画は、FV IIIのトラフレベルが、健常非血友病患者のFV III活性の2～3%レベルを下回らないように設計される。それぞれのi.v.投与は疼痛を伴って扱いにくく、そして特に投与が主に血友病Aと診断された患者自身又は小児の親による在宅処置で行われるために、感染のリスクを伴う。加えて、頻回i.v.注射は必然的に癰痕形成をもたらし、以後の注入を妨げる。重度血友病の予防的処置は、若年、しばしば2歳未満の小児で開始されることから、そのような小さな患者の静脈に週当たり3回FV IIIを注射することは、尚更困難である。限られた期間、ポートシステムの移植は代替法を提供し得る。反復性感染症が発生し、そしてポートが運動時に不便を引き起こす可能性があるという事実にもかかわらず、それらはそれでも一般的に静脈内注射に比べて好ましいと考えられている。

30

【0012】

それ故、VWF又はFV IIIを静脈内注入する必要性を避けるための、大きな医学的ニーズがある。

40

FV IIIは非常に大きくそして不安定な分子であるため、皮下、筋肉内又は皮内、即ち血管外に投与した場合、不十分な吸収及び激しい分解に因り非常に低いバイオアベイラビリティを示す。

【0013】

特許文献4には、1,000 IU/ml以上濃度のBドメイン欠失FV IIIのFV III製剤が、皮下、筋肉内又は皮内投与に好適であって、サルにs.c.投与後、活性（FV III：C）－時間曲線下面積を測定して、5～10%のバイオアベイラビリティが記載されている。

50

【0014】

特許文献5には、有機添加物と共に少なくとも500IU/mlの濃度のBドメイン欠失FVIIを含有するFVII製剤は、皮下投与した場合、6時間より長時間の間、正常なFVIIレベルの少なくとも1.5%のFVII血漿レベルに導くことができることが記載されている。有機添加物として加水分解したゼラチン又はダイズ油乳剤、及び1,100IU/mlの濃度及び10,000IU/kgの用量のBドメイン欠失FVIIを用いて、活性(FVII:C)－時間曲線下面積で測定して50%以上のバイオアベイラビリティがカニクイザルで見られた。

【0015】

特許文献6には、Bドメイン欠失FVII(比活性度15,000IU/mg;用量2,500IU/kg)を皮下投与した場合の5.3%のバイオアベイラビリティだが、一方FVIIのPEG化接合体では、カニクイザルでそれぞれ22%及び19%のバイオアベイラビリティを達成したことが記載されている。

10

【0016】

特許文献7及び6には、PEG化Bドメイン欠失FVIIのバイオアベイラビリティの増加が記載され、そして更に、VWF及び／又は接合によるFVIIとVWFの組み合わせを安定化し、血友病A又はVWDを処置するための皮下、筋肉内又は皮内投与のそれぞれを可能にすることを提案している。

【0017】

特許文献8は、静脈内、筋肉内、又は腹腔内注射など、注射により投与できるVWFのPEG化を教示している。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0018】

【特許文献1】欧州特許第05503991号

【特許文献2】欧州特許第0784632号

【特許文献3】米国特許第4757006号

【特許文献4】欧州特許第0710114号

【特許文献5】欧州特許第0772452号

【特許文献6】欧州特許第1258497号

30

【特許文献7】欧州特許第0871649号

【特許文献8】国際公開公報第2006/071801号

【非特許文献】

【0019】

【非特許文献1】Fischer et al., FEBS Lett. 351: 345-348, 1994

【非特許文献2】Ruggeri et al. Thromb. Haemost. 82: 576-584, 1999

【非特許文献3】Kaufman, Transfusion Med. Revs. 6:235 (1992)

【非特許文献4】Kaufman et al. 1989, Mol Cell Biol

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

40

【0020】

今回驚くべきことに、並みはずれて大きい分子(VWFマルチマーは、1MDa～20MDaの範囲にわたる)ではあるが、VWFは、いかなる共有結合修飾がなくても、免疫反応のリスク増加を伴い得る血管外投与により血流中に取込み得ること、そしてVWFは、FVIIと非静脈内で共投与した(co-administered)場合、FVIIの取込みを増強するのに使用し得ることを見出した。

【0021】

本発明は、このようにフォンビルブラント因子(VWF)を含む、フォンビルブラント疾患(VWD)及び／又は血友病Aの治療における、血管外投与に適した組成物に関する。

50

【0022】

当然のことながら本発明の意味では、VWF対FVIII（VWF over FVIII）の比は、VWF抗原単位対FVIII活性単位の比である。

【0023】

VWF抗原（VWF：Ag）は種々の免疫分析により定量化し得るが、そのうちローレル（Laurell）ロケット電気泳動法、電気免疫分析（electroimmunoassay）及び固相酵素免疫検定法（ELISA）[Dalton & Savidge, 1989]が最も汎用されている。Seghatchian MJ & Savidge GF (eds): 「第VIII因子—フォンビルブラント因子（Factor VIII - von Willebrand Factor）」, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida 1989, Vol. I, pp. 129-145の中の、Dalton RG, Savidge GF., 「vWf方法の進歩とVWDとの関連性（Progress in vWf methodology and its relevance in VWD）」。全てのこれらに基準として同じ標準を適用しており、全ての市販の試験は本質的に同一の結果を生ずる。

【0024】

第VIII因子活性は、一般法（1つの単一反応ステップでフィブリン形成時間を測定する（Bloom 編集、「血友病（The Hemophilias）」、NY Churchill Livingston 1992）の中の、Rizza et al. 1982. 「FVIII：C及びFIXaの凝固分析（Coagulation assay of FVIII:C and FIXa）」）、又は発色分析（酵素が形成する速度を、発色基質の開裂酵素を用いることにより測定する（S. Rosen, 1984. Scand J Haematol 33: 139-145, suppl.）により定量し得る。両方法は本質的に同じ所見を生じ、そしてまた、全く同じにFVIII：Cと名前が付けられている。

【0025】

VWF：Ag及びFVIII：Cの両方に対して、1つの国際単位（IU）が世界保健機構によって確立された現在の国際標準で規定されており、1IUのFVIII：C又はVWF：Agは、新鮮プールヒト血漿の1.0mL中に認められるFVIII又はVWFのレベルにほぼ等しい。

【0026】

本発明の別の実施態様は、フォンビルブラント因子（VWF）、又はFVIII及びVWFを含む薬剤組成物を含む、フォンビルブラント病（VWD）及び／又は血友病Aの治療における、血管外投与に適した薬剤組成物の使用であって、ここでVWF抗原対FVIII活性の比が2：1より大きい、使用である。血管外投与する場合のVWD及び／又は血友病Aを処置する薬剤を製造するためである。

【0027】

非限定的な一例として、VWF抗原対FVIII活性の比は、2：1より大きく、好ましくは3：1より大きく、更に好ましくは5：1より大きく、尚更に好ましくは15：1より大きく、そして最も好ましくは25：1より大きくてよい。

【0028】

また、VWD及び／又は血友病Aを処置する薬剤を製造するためのVWFの使用であって、ここでFVIIIの前記薬剤組成物が、同じ濃度、用量で、そして同じ様式の血管外投与であるがVWFなしで投与される場合のそれぞれのパラメータと比較して、FVIIIの薬物製剤との血管外共投与後の、

a) 注射後、血漿中のFVIII活性を、少なくとも0.01U/ml高める期間が、好ましくは3倍、より好ましくは5倍、最も好ましくは10倍延長される；又は、

b) 血漿中のFVIII活性の最大濃度が、好ましくは3倍、より好ましくは10倍、最も好ましくは20倍増加する；又は、

c) FVIII活性のデータ曲線下面積（AUC）が、好ましくは5倍、より好ましくは15倍、最も好ましくは30倍増加する；

のいずれかである、使用も、本発明に包含される。

【発明を実施するための形態】

【0029】

好ましくは精製VWFが使用される。本発明の意味する精製VWFは、血漿中濃度に比

10

20

30

40

50

べて、少なくとも20倍、好ましくは少なくとも75倍、より好ましくは少なくとも150倍高い濃度で、VWF：Agが液体で又は凍結保存の場合は注射前の再構成後に液体で存在するVWF組成物を包含する。好ましくは再懸濁クリオプレシピテート及び他の低純度製剤のVWFは使用されず、そして精製VWFは、クリオプレシピテート中より高純度に濃縮される。好ましくは1UのVWF：Ag/mg総タンパク質（安定化タンパク質無添加）より大きい純度のVWF、より好ましくは10UのVWF：Ag/mg総タンパク質（安定化タンパク質無添加）より高い純度のVWF、更により好ましくは25UのVWF：Ag/mg総タンパク質（安定化タンパク質無添加）より高い純度のVWFが使用される。

【0030】

好ましくは精製FVIIが使用される。本発明の意味する精製FVIIは、血漿純度に比べて、少なくとも10倍、好ましくは少なくとも30倍、より好ましくは少なくとも70倍で、FVII：Cが液体で又は凍結保存の場合は注射前の再構成後に液体で存在するFVII組成物を包含する。望ましくは再懸濁クリオプレシピテートは使用されず、そして精製FVIIは、クリオプレシピテート中のFVIIより高純度に濃縮される。好ましくは、1IU/mgの、又はより好ましくは5IU/mgより大きい、又は更により好ましくは10IU/mgより大きい比活性（安定化タンパク質無添加のFVII：C/mg総タンパク質）のFVIIが使用される。

【0031】

好ましくは、VWF又はFVIIと組み合わせのVWFを含む製剤は皮下投与される。しかしながら、全ての他の血管外投与方法、例えば筋肉内又は皮内投与も包含される。

限定されないが一例として、VWFの濃度は、150U（VWF：Ag）/mL以上、好ましくは450U（VWF：Ag）/mL以上、最も好ましくは1,500U（VWF：Ag）/mL以上である。

【0032】

通常用量は、225U（VWF：Ag）/kg以上又は75U（VWF：Ag）/kg以上、又は15U（VWF：Ag）/kg以上であり得る。

限定されないが一例として、FVIIに対する通常用量は、75U/kg以上又は25U/kg以上又は5U/kg以上であり得る。

【0033】

VWF又はFVII源は重要ではなく、例えば、ヒト血漿から誘導し又は組み換えて生産し得る。

【0034】

FVIIが組み換えの場合、完全長型か又は好ましくはその欠失誘導体であり得る。更に好ましくは、欠失誘導体は、組み換え第VII因子SQ（r-VII SQ）である。欠失誘導体は、本発明ではBドメインの全部又は一部が欠落している凝固第VII因子を意味する。加えて、第VII因子分子、及び特にr-VII SQ分子は、インビボでの分子の安定性を向上させるために、例えばPEG化、共有結合した糖質又はポリペプチドにより化学修飾され得る。

【0035】

本発明は、更に本出願に記載の修飾VWF又はFVIIをコードするポリヌクレオチドに関する。用語「ポリヌクレオチド」は、一般的に非修飾RNA若しくはDNA又は修飾RNA若しくはDNAであってもよい任意のポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドを意味する。ポリヌクレオチドは一本鎖又は二本鎖DNA、一本鎖又は二本鎖RNAであってもよい。本明細書で使用される用語「ポリヌクレオチド」は、また、1つ又はそれ以上の修飾塩基及びイノシンなどの特異塩基を含むDNA又はRNAをも含む。当然のことながら、当業者に公知の多くの有用な目的にかなう様々な修飾を、DNA及びRNAに対して行ない得る。本明細書で用いられる用語「ポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドのそのような化学的、酵素的又は代謝的修飾型、並びにウイルス、及び例えば単純型及び複合型細胞を含む、細胞に特徴的なDNA及びRNAの化学型を包含する。

10

20

30

40

50

【0036】

当業者には当然のことながら、遺伝コードの縮重に因り、所定のポリペプチドは異なるポリヌクレオチドによりコード化され得る。これらの「変異体」は本発明に包含される。

好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは精製ポリヌクレオチドである。用語「精製」ポリヌクレオチドは、他の染色体及び染色体外のDNA及びRNAなどであるがそれらに限定されない、他の核酸配列を実質的に含まないポリヌクレオチドを意味する。精製ポリヌクレオチドは宿主細胞から精製してもよい。精製ポリヌクレオチドを得るために、当業者に知られた従来の核酸精製法を使用してもよい。この用語は、また、組み換えポリヌクレオチド及び化学合成ポリヌクレオチドをも含む。

【0037】

本発明の更に別の側面は、本発明のポリヌクレオチドを含むプラスミド又はベクターである。好ましくは、プラスミド又はベクターは発現ベクターである。特定の実施態様では、ベクターはヒト遺伝子治療に使用する導入ベクターである。

【0038】

本発明の尚別の側面は、本発明のポリヌクレオチド又は本発明のプラスミド若しくはベクターを含む宿主細胞である。

【0039】

本発明の宿主細胞は、本発明の一部である組み換えVWF及び／又は組み換えFVIIを生産する方法において使用し得る。その方法は：

a) VWF及び／又はFVIIが発現するような条件下で本発明の宿主細胞を培養すること；及び

b) 場合により、宿主細胞又は培地からVWF及び／又はFVIIを選択的に回収すること；を含む。

【0040】

グリコシル化又は他の翻訳後修飾の程度及び位置は、選択した宿主細胞及び宿主細胞環境の特性により変動し得る。特異的なアミノ酸配列に関する場合、そのような配列の翻訳後修飾は、本出願に包含される。

【0041】

本出願で使用される「FVII」は、不活性型(FVII)から成る生産物を意味する。本発明で使用される「FVII」及び「VWF」は、それぞれ天然のヒトFVII及びVWFのアミノ酸配列を有するタンパク質を含む。それは、また、それらのタンパク質が、それぞれ実質的にFVII又はVWFの活性を保持する限り、若干修飾したアミノ酸配列を有するタンパク質、例えばN末端アミノ酸欠失又は付加を含む修飾N末端を有するタンパク質をも含む。上記の定義内の「FVII」及び「VWF」は、また、個体ごとに存在し、生じる可能性のある天然の対立遺伝子変異をも含む。上記の定義内の「FVII」又は「VWF」は、更にFVII又はVWFの変異体をも含む。そのような変異体は、1つ又はそれ以上のアミノ酸残基において野生型配列と異なる。そのような相異の例は、1つ又はそれ以上のアミノ酸残基（例えば、1～10のアミノ酸残基）によるN-及び／又はC-末端のトランケーション、又はN-及び／又はC-末端での1つ又はそれ以上の過剰残基の付加、例えばN末端でのメチオニン残基の付加、並びに保存アミノ酸置換、即ち類似の特性を有するアミノ酸群、例えば（1）小型アミノ酸、（2）酸性アミノ酸、（3）極性アミノ酸、（4）塩基性アミノ酸、（5）疎水性アミノ酸、（6）芳香族アミノ酸の中で行われる置換を含んでもよい。そのような保存置換の例は以下の表に示される。

【0042】

10

20

30

40

【表 1】

表 1:

(1)	アラニン	グリシン		
(2)	アスパラギン酸	グルタミン酸		
(3 a)	アスパラギン	グルタミン		
(3 b)	セリン	トレオニン		
(4)	アルギニン	ヒスチジン	リジン	
(5)	イソロイシン	ロイシン	メチオニン	バリン
(6)	フェニルアラニン	チロシン	トリプトファン	

10

【0043】

用語「組み換え」とは、例えば、変異体が遺伝子工学技術により宿主生物中に生産されることを意味する。本発明の F V I I I 又は V W F 変異体は、通常は組み換え変異体である。

【0044】

提案変異体の発現:

20

好適な宿主細胞における高レベルの組み換えタンパク質の生産は、当業者に知られた方法により種々の発現系中で成長し得る、組み換え発現ベクターにおける好適な調節要素と共に、効率的な転写単位への上記修飾 c D N A の集合を必要とする。好適には、シミアンウイルス 40、アデノウイルス、BK ポリオーマウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、若しくはラウス肉腫ウイルスの長末端反復由来のプロモーター-エンハンサー組み合わせ、又は β アクチン若しくは G R P 78 のように動物細胞中で強力な構成的転写遺伝子を含むプロモーター-エンハンサー組み合わせが使用できる。c D N A から転写された安定で高レベルの m R N A を達成するために、転写ユニットは、転写終結-ポリアデニル化配列をコードする D N A 領域をその 3' -近位部に含有しなければならない。好適には、この配列は、シミアンウイルス 40 初期転写領域、ウサギ β グロビン遺伝子、又はヒト組織プラスミノーゲンアクチベータ遺伝子から誘導される。

30

【0045】

次いで、c D N A は、F V I I I 又は V W F の発現のために適した宿主細胞のゲノム中に組み込まれる。正しい折畳み、G l a ドメイン合成、ジスルフィド結合形成、アスパラギン結合グリコシル化、O 結合グリコシル化、及び他の翻訳後修飾、並びに培養培地への分泌を確実にするために、好ましくは、この細胞系は脊椎動物起源の動物細胞系であるべきである。他の翻訳後修飾の例は、新生ポリペプチド鎖のヒドロキシル化及びタンパク質分解プロセッシングである。使用できる細胞系の例は、サル C O S 細胞、マウス L 細胞、マウス C 1 2 7 細胞、ハムスター B K H - 2 1 細胞、ヒト胚腎臓 2 9 3 細胞、及びハムスター C H O 細胞である。

40

【0046】

対応する c D N A をコードする組み換え発現ベクターは、幾つかの異なる方法で動物細胞系へ導入し得る。例えば、組み換え発現ベクターは、異なる動物ウイルスに基づくベクターから作製し得る。これらの例は、バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、及び好ましくはウシバビローマウイルスに基づくものである。

【0047】

対応する D N A をコードする転写単位は、また、別の組み換え遺伝子と併せて動物細胞へ導入でき、組み換え D N A をそれらのゲノムへ統合している特異的細胞クローンの分離を促進するために、これらの細胞中で優性選択可能なマーカーとして機能し得る。このタイプの優性選択可能なマーカー遺伝子の例は、ゲネチシン (G 4 1 8) に耐性を付与する

50

Tn5アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ、ハイグロマイシンに耐性を付与するハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ、ピューロマイシンに耐性を付与するピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼである。このような選択可能なマーカーをコードする組み換え発現ベクターは、所望のタンパク質をコードするベクターと同じベクター上に残り得るか、又はそれは宿主細胞のゲノムに同時に導入され組み込まれて、高頻度に異なる転写単位間で緊密な物理的連結をもたらす、分離ベクター上にコードされ得る。

【0048】

所望のタンパク質のcDNAと併せて使用し得る他のタイプの選択可能なマーカー遺伝子は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(dhfr)をコードする種々の転写単位に基づいている。内因性dhfr活性を欠如している細胞、好ましくはCHO細胞(DUKX-B11、DG-44)へこのタイプの遺伝子を導入した後、これらをヌクレオシド欠乏培地で生育させることができる。このような培地の例は、ヒポキサンチン、チミジン、及びグリシンのないHamF12である。これらのdhfr遺伝子は、同じベクター上か又は異なるベクター上で連結して、凝固因子cDNA転写単位と併せて上記タイプのCHO細胞に導入され、このようにして組み換えタンパク質を生産するdhfr陽性細胞系を作出し得る。

10

【0049】

上記細胞系が細胞毒性dhfr阻害剤メトトレキサートの存在下に生育する場合、メトトレキサートに耐性を有する新しい細胞系が出現する。これらの細胞系は、連結dhfr及び所望のタンパク質の転写単位の数の増幅に因り、組み換えタンパク質を速度を増大して生産し得る。メトトレキサートの濃度を増加させて(1~10, 000nM)これらの細胞系を成長させる場合、非常に高い率で所望のタンパク質を生産する新しい細胞系を得ることができる。

20

【0050】

所望のタンパク質を生産する上記細胞系は、懸濁培養か又は種々の固体支持体上で、大規模に増殖し得る。これらの支持体の例は、デキストラン若しくはコラーゲンマトリックスによるマイクロキャリア、又は中空糸若しくは種々のセラミック材料の形態での固体支持体である。細胞懸濁培養で又はマイクロキャリアで増殖する場合、上記細胞系の培養は、槽培養としてか、又長期間にわたる馴化培地の連続的生産による灌流培養として行い得る。このように本発明に記載の上記細胞系は、所望の組み換えタンパク質生産の工業的方法の開発に好適である。

30

【0051】

上記タイプの分泌細胞の培地に蓄積する組み換えタンパク質は、細胞培養培地中の所望のタンパク質と他の物質間の、サイズ、電荷、疎水性、溶解度、特異親和性等の差を利用する方法を含み、種々の生化学的及びクロマトグラフィー法により濃縮及び精製し得る。

【0052】

そのような精製法の例は、固体支持体に固定化されたモノクローナル抗体への組み換えタンパク質の吸着である。脱着後、タンパク質は、上記性質に基づいて種々のクロマトグラフィー法により更に精製される。

【0053】

本発明の生物活性FVIII又はVWFは、 $\geq 80\%$ 純度、より好ましくは $\geq 95\%$ 純度まで精製することが望ましく、そして夾雑高分子物質、特に他のタンパク質及び核酸に関して99.9%純度より高く、且つ、感染及び発熱因子のない薬剤的に純粋な状態が特に好ましい。好ましくは、本発明の単離又は精製した生物活性FVIII又はVWFは、FVIII及びVWFと併用して投与される場合を除いて、実質的に他のポリペプチドを含まない。

40

【0054】

本発明に記載の組み換えタンパク質は、治療上使用するための薬物製剤に製剤化し得る。精製タンパク質は、従来の生理的適合性の水性緩衝液に溶解され、場合により、薬学的賦形剤を添加して薬物製剤を得ることができる。

50

【0055】

そのような薬剤用担体及び賦形剤、及び好適な薬物製剤は当業者によく知られている（例えば、「ペプチド及びタンパク質の医薬製剤開発（“Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins”）」, Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000)）又は「医薬品賦形剤便覧（“Handbook of Pharmaceutical Excipients”）」, 3rd edition, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000)を参照）。特に、本発明のポリペプチド変異体を含む薬剤組成物は、凍結乾燥又は安定な可溶形態に製剤化し得る。ポリペプチド変異体は、当業者によく知られた種々の手法により凍結乾燥し得る。凍結乾燥製剤は、注射用滅菌水又は滅菌生理食塩水などの1つ又はそれ以上の薬学的に許容される希釈剤の添加によって、使用前に再構成される。

10

【0056】

組成物の製剤は、非静脈内投与の任意の薬剤的に適切な方法により個体に送達される。種々の送達システムが公知であり、そして任意の簡便な経路によって組成物を投与するために使用し得る。好ましくは本発明の組成物は、皮下、筋肉内、腹腔内、大脳内、肺内、鼻腔内又は経皮投与用に、最も好ましくは皮下、筋肉内又は経皮投与用に従来法により製剤化される。製剤は注入により、又はボラス注入により連続的に投与し得る。特定の製剤としては、徐放システムを包含する。

【0057】

本発明の修飾された生物活性F V I I I及びV W Fポリペプチドは治療的有效用量で患者に投与されるが、治療的有效用量の意味するところは、所望の効果を生み出すのに十分に、耐えられない有害副反応をもたらす用量に到達することなしに、治療される病態又は適応症の重症度又は拡大を予防し又は軽減する用量である。的確な用量は、例えば適応症、製剤、投与方法のような多くの要素によって決まり、そしてそれぞれの適応症に対する前臨床及び臨床試験で決定されるべきである。

20

【0058】

本発明の薬剤組成物は、単独で又は他の治療薬と併せて投与し得る。これらの薬剤は同じ薬剤の一部として組み込まれてもよい。

本発明の別の側面は、血液凝固障害を処置又は予防する薬剤を製造するための、本明細書に記載のV W F又はF V I I Iと組み合わせたV W F、本発明のポリヌクレオチド、本発明のプラスミド若しくはベクター、又は本発明の宿主細胞の使用である。血液凝固障害は、血友病A及びV W D、又はF V I I I / F V I I a 欠乏症を含むが、これらに限定されるものではない。むしろこれらの疾患は、それぞれの凝固因子に対する自己抗体により引き起こされ、又は先天性型がそれにより悪化する。特定の実施態様では、処置しようとする患者は第F V I I I因子に対するインヒビター抗体を有する。好ましくは、処置はヒト遺伝子療法を含む。

30

【0059】

投与方法は、好ましくは皮下であるが、全ての血管外投与経路を包含する。このことは、表面投与、即ち静脈内注射と対照的な非血管内投与が、患者にとって最も好ましいことを意味する。大部分の表面投与は上皮表面を経て（皮膚に）投与されることになる。パッチ経由の投与は特に臨床的に有用である。この局所投与は、皮膚を介する取り込みを必要とし、これはしかしながら、表在びらんだけでなく無傷の皮膚も完全に選ばれ、そして点眼薬及び鼻内投与を含む。上皮表面を介する投与としては吸入が含まれ、タンパク質で覆われた異常に大きい表面のために好適であり、迅速取込み及び肝臓の迂回をもたらす。上皮表面への投与としては、口腔内又は舌下に保持される剤形、即ちパッカール又は舌下剤形が含まれ、チューインガムとしてさえも可能である。口内のp Hは相対的に中性（酸性の胃環境と対照的）なので、これはF V I I Iなどの不安定なタンパク質に対して有利である。また、腔内及び直腸投与でさえも、また、直腸から水分を抜く静脈のいくつかが直接全身循環系へ至るので考慮することができる。一般的に、これは若い小児のように経口経路を経由して物質を取込むことができない患者に最も有用である。

40

【0060】

50

皮内注射（皮膚内）はより侵襲的な投与方法であるが、介助又は経験者による実行さえない処置のために尚好適であり得る。皮内投与に続いて、皮下注射（皮膚直下）が行なわれる。一般的に取り込みは全く十分であり、そして注射部位を加温又はマッサージすることにより増加し得る。代わりに、血管収縮を起こすことができ、逆の挙動をもたらす、即ち吸着を低減するが効果を持続させることができる。

【0061】

更により侵襲性の血管外投与としては、筋肉内送達（筋肉体内へ）が含まれる。これは脂肪組織を迂回することにより利点をもたらし得るが、しかし一般に皮下注射より痛みを伴い、そして特に注射で改善すべき欠乏凝固系によって特徴付けられる患者では、出血を引き起こす組織病変のリスクがある。

【0062】

侵襲の程度に無関係に、VWF：FVⅢⅢ複合体は、上皮表面に高親和性を有するようにデザインし、そして吸着を改善するためにVWF：FVⅢⅢ複合体を担持し得る、生分解性微粒子に担持させてもよい。

【0063】

本発明は、また、血友病A又はFVⅢⅢ／FVⅢⅢa欠乏症などの血液凝固障害に罹患している個体を処置する方法に関し、好ましくはこれらの疾患は、それぞれの凝固因子に対する自己抗体により引き起こされ、又は先天性型はそれにより悪化する。この方法は、本明細書に記載の有効量のVWF又はFVⅢⅢⅢと組み合わせたVWFを含む薬剤組成物を、該個体に投与することを含む。別の実施態様においては、この方法は、有効量の本発明のポリヌクレオチド又は本発明のプラスミド若しくはベクターを、個体に投与することを含む。代わりに、この方法は、本明細書に記載の本発明の有効量の宿主細胞を個体に投与することを含んでもよい。

【0064】

血友病Aの治療における主要課題の1つは、FVⅢⅢⅢに対する中和抗体の発現である。これらの患者の約25%は、FVⅢⅢⅢの活性を中和する阻害抗体を発現する。従って、FVⅢⅢⅢの補充は、患者の止血を補正するのにもはや役に立たない。そのような阻害抗体は一般的に最初の2、3の治療により発現するが、現時点ではどのような患者がこの合併症に罹るかを予測するのは非常に困難である。使用された特定のFVⅢⅢⅢ濃縮物がこの役割を果たしているか否かが、科学文献において議論的になっている。最大の免疫応答を達成するようにデザインされた他のタンパク質から、投与方法が重要な役割を果たす、即ち、静脈内注射が一般的には皮下注射よりも免疫原性が小さいことは、少なくとも明らかである。しかしながら、驚くべきことに、皮下注射で投与しても、FVⅢⅢⅢをVWFと共に製剤化した場合、この製剤は、血友病Aマウスにおいて、静脈内投与したFVⅢⅢⅢよりも阻害抗体を生成するのが少なく、そしてFVⅢⅢⅢの皮下投与よりも阻害抗体を生成するのが確実に少ないことを見出した。

【0065】

従って、本発明の別の実施態様は、VWD及び／又は血友病Aを処置する薬剤を製造するためのVWFの使用であって、ここでFVⅢⅢⅢの薬物製剤による血管外共投与（co-administration）後に、FVⅢⅢⅢの該薬物製剤が同じ濃度、用量で、そして同じ様式の血管外投与であるがVWFなしで投与する場合に比べて、FVⅢⅢⅢに対する阻害抗体の生成がより少ない使用である。

【0066】

FVⅢⅢⅢの静脈内投与では、VWFとのFVⅢⅢⅢの製剤が、FVⅢⅢⅢに対する阻害抗体の生成リスクを低減し得るかについての科学文献で議論が進行中である。本発明者のデータ（実施例10）は、VWF配合FVⅢⅢⅢを投与した場合、FVⅢⅢⅢに対する阻害抗体の生成低下を示す。

【0067】

本発明の好ましい実施態様では、VWF製剤をFVⅢⅢⅢの薬物製剤と血管外で共投与する場合、FVⅢⅢⅢの前記薬剤組成物を同じ濃度、用量で、そして同じ様式の血管外投

10

20

30

40

50

与であるがVWFなしで投与する場合に比べて、阻害抗体の生成が少なくとも15%少なく、ここで、阻害抗体のタイターはベセズダ（Bethesda）分析によって測定される（Goudemand J., Haemophilia, Vol. 13 Suppl. 5: 47-51, 2007; Ettingshausen C.E., Kreuz W., Haemophilia, Vol. 12 Suppl. 6: 102-106, 2006）。

【0068】

好ましくは、VWF製剤をFVIIの薬物製剤と血管外で共投与する場合、FVIIの前記薬剤組成物を同じ濃度、用量で、そして同じ様式の血管外投与であるがVWFなしで投与する場合に比べて、阻害抗体の生成が、25%少なく、ここで、阻害抗体のタイターはベセズダ（Bethesda）分析によって測定される（Goudemand J., Haemophilia, Vol. 13 Suppl. 5: 47-51, 2007; Ettingshausen C.E., Kreuz W., Haemophilia, Vol. 12 Suppl. 6: 102-106, 2006）。 10

【0069】

より好ましくは、VWF製剤をFVIIの薬物製剤と血管外で共投与する場合、FVIIの前記薬剤組成物を同じ濃度、用量で、そして同じ様式の血管外投与であるがVWFなしで投与する場合に比べて、阻害抗体の生成が、50%少なく、ここで、阻害抗体のタイターはベセズダ（Bethesda）分析によって測定される。

【0070】

最も好ましくは、VWF製剤をFVIIの薬物製剤と血管外で共投与する場合、FVIIの前記薬剤組成物を同じ濃度、用量で、そして同じ様式の血管外投与であるがVWFなしで投与する場合に比べて、阻害抗体の生成が、75%少なく、ここで、阻害抗体のタイターはベセズダ（Bethesda）分析によって測定される。 20

【0071】

本発明の別の好ましい実施態様においては、FVIIに対する阻害抗体の生成は、これまで未治療の血友病A患者が受けるFVIIの初期投与量時に最も起こり易いことから、そのようなVWF配合FVIIは、未治療患者に対して血管外投与される。

【0072】

FVIIをVWFと組み合わせて血管外で投与する場合、本発明の更に別の好ましい実施態様においては、投与VWFは、1:0.35より小さく、好ましくは1:1.05と同等かそれより小さいVWF:RCOF/VWF:Ag比を有する。

【0073】

本発明の別の好ましい実施態様は、VWD及び／又は血友病Aを処置する薬剤を製造するためのVWFの使用であって、投与されるVWFが血管外で投与され、そして1:0.35より小さく、又は好ましくは1:1.05より小さいVWF:RCOF/VWF:Ag比を有する使用である。 30

【図面の簡単な説明】

【0074】

【図1】図1は、静脈又は皮下注射した200U/kgのMonoclalte-P（登録商標）の薬物動態（n=2/群；平均+SD）である。

【図2】図2は、100U/kgのMonoclalte-P（登録商標）の静脈内又は皮下、及び1,800U/kgの皮下後のFVIIノックアウト・マウスの血漿FVII活性（平均+SD；n=4~5/時点）である。 40

【図3】図3は、1,800U（FVII:C）/kgのMonoclalte-P（登録商標）又はHaemate P（登録商標）後のFVIIノックアウト・マウスのFVII活性の血漿レベル（平均+SD；n=4~5/時点）である。

【図4】図4は、900又は1,800U（FVII:C）/kgのHaemate P（登録商標）の、皮下注射後2日までの平均FVII活性+SD（n=5/時点）である。

【図5】図5は、変化したVWF:Ag/FVII:C比で特徴付けられる、400U（FVII:C）/kgのHaemate P（登録商標）の、皮下注射後2日までの平均FVII活性±SD（n=5/時点）である。

【図6】図6は、標準及び増加したVWF:Ag/FVII:C比で特徴付けられる、 50

200 U (F V I I I : C) / k g の Haemate P (登録商標) の、皮下注射後 2 日までの平均 F V I I I 活性 + S D の経時変化 (n = 5 / 時点) である。

【図 7】図 7 は、V W F : A g / F V I I I : C 比の増加による A U D C (F V I I I) の増加である。

【図 8】図 8 は、Haemate P (登録商標) の皮下注射後の、血餅形成時間 (T E M で) (n = 7 ~ 24 ; 平均 + S D) である。

【図 9】図 9 は、Haemate P (登録商標) の皮下注射後の、アルファ (T E M で) (n = 7 ~ 24 ; 平均 + S D) である。

【図 10】図 10 は、100 U (F V I I I : C) / k g の Haemate P (登録商標) 又は Helixate の静脈内注射後の F V I I I ノックアウト・マウスにおける、ヒト F V I I I : A g 薬物動態の比較 (平均 + S D ; n = 3 ~ 5 / 時点) である。 10

【図 11】図 11 は、50 U (F V I I I : C) / k g の Haemate P (登録商標) 又は Monoclate-P の静脈内注射後の V W F ノックアウト・マウスにおける、ヒト F V I I I : A g 薬物動態の比較 (平均 + S D ; n = 5 ~ 6 / 時点) である。

【図 12】図 12 は、F V I I I ノックアウト及び V W F ノックアウト・マウスに対する 400 U (F V I I I : C) / k g の Haemate P (登録商標) の皮下注射後の、血漿中 F V I I I 活性の比較 (平均 + S D ; n = 4 ~ 5 / 時点) である。

【図 13】図 13 は、ウサギに 2, 300 U (V W F : A g) / k g の Haemate P (登録商標) の皮下注射後の、V W F : A g の経時変化 (平均 + S D ; n = 4 / 時点) である。

【図 14】図 14 は、523 U (V W F : A g) / k g の皮下注射後 3 日までの、平均 V W F : A g、V W F : R C o 及び F V I I I : C 血漿レベルの経時変化 (n = 5 / 時点) である。 20

【図 15】図 15 は、F V I I I の静脈内又は皮下投与後の、抗 F V I I I 抗体及び F V I I I 阻害抗体 (ベセズダ (Bethesda) 分析) の生成に対する V W F の役割である。

【図 16】図 16 は、異なる V W F : R C o / V W F : A g 比によって特徴付けられる、500 U (F V I I I : C) / k g の Haemate P (登録商標) 製剤の皮下注射後の平均 F V I I I 活性血漿レベル ± S D の経時変化 (n = 4 / 時点) である。

【実施例】

【0075】

[実施例 1]

ウサギに皮下投与した Monoclate-P (登録商標) のバイオアベイラビリティの評価

200 U / k g の F V I I I (Monoclate-P (登録商標)) を、t = 0 に静脈内 (耳介静脈) 経路を介し、又は t = 0 に皮下 (頸部) 経路を介して、約 2.5 ~ 3 k g の重量の C H B ウサギに単回注射で投与した。F V I I I : 抗原の測定のために、投薬前 (ベースライン) 及び 5、15、30、45 分、1、2、4、6、8 及び 24 時間に、血液試料を耳介静脈 (静脈内注射の場合は反対側の) から採血した (表 1)。血液は 10 % クエン酸血液で抗凝固処理した。ヒト F V I I I : A g は、血液を遠心分離で処理し、市販の E L I S A ; Cedarlane Laboratories Ltd. を用いて血漿で定量した。血漿は、分析前に -20 °C で保存した。図 1 に、皮下投与した高純度の血漿 F V I I I の低いバイオアベイラビリティが例証される。皮下注射した微量の F V I I I が血流に達していた。ピーク血漿レベルはおよそ 0.05 U / m l に達したが、それは 0.03 U / m l のベースライン値に近く、ウサギタンパク質に対する E L I S A の交差反応に対応していた。ベースラインを補正した Monoclate-P (登録商標) の相対的 A U D C (バイオアベイラビリティ) は低く、言い換えれば < 5 % であった。 40

A U D C は、血漿中濃度 - 時間データ曲線下面積 (台形公式により計算した) であり、そしてバイオアベイラビリティは (A U D C (皮下) × 用量 (静脈)) / A U D C (静脈) × 用量 (皮下)) として計算される。

【0076】

【表 2】

表 1：皮下投与 Monoclate-P（登録商標）のバイオアベイラビリティ評価のための処置群(ウサギ)

No.	処 置	用量 (FVIII : C) /容積/ スケジュール/経路	FVIII 濃度	N (m/f)
1	Monoclate-P ^(R)	200 U/kg / 2.2 mL/kg / 静脈内	91 U/mL	1 m 1 f
2	Monoclate-P ^(R)	200 U/kg / 2.2 mL/kg / 皮下	91 U/mL	1 m/1 f

【 0 0 7 7 】

[実施例 2]

10

血友病 A モデルにおける皮下投与 Monoclate-P（登録商標）のバイオアベイラビリティ評価（F V I I I ノックアウト・マウス）

実施例 1 において Monoclate-P（登録商標）の相対的バイオアベイラビリティを評価するモデルとして用いられた健常ウサギは、生理的に正常レベルの内因性 F V I I I を有していた。この状況は、皮下注射後の Monoclate-P（登録商標）の再吸収を抑制し、その結果その相対的バイオアベイラビリティを過小評価すると考えられた。加えて、抗原に基づくアプローチは、ウサギモデルでは内因性と体外投与のヒト F V I I I の差別化を可能にする特異的な定量法が必要とされた。しかしながら、抗原に基づく方法は、再吸収した F V I I I の機能活性に関する結論をもたらさない。

【 0 0 7 8 】

20

これらの問題に対処するために、約 25 g の重量の F V I I I ノックアウト・マウスを血友病 A モデルとして使用した。これらのマウスは、F V I I I を発現しない (Bi L. et al, Nature genetics, 1995, Vol 10(1), 119-121; Bi L. et al, Blood, 1996, Vol 88 (9), 3446-3450)。このことが、F V I I I ノックアウト・マウスの血漿中に実験的に投与した F V I I I 活性の定量を可能にした。100 U/kg 又は 1,800 U/kg の F V I I I (Monoclate-P (登録商標)) を、単回注射により $t = 0$ で静脈内(尾静脈)経路で投与した。同じデザインにより、100 U/kg の F V I I I (Monoclate-P (登録商標)) を、皮下(頸部)経路で投与した。短時間麻酔下に、血液試料を眼窩後方で採取し、クエン酸カルシウムを用いて 10 から 20 % のクエン酸血液に抗凝固処理し、血漿に処理し、そして F V I I I 活性の定量のために -20°C で保存した。静脈内注射でのサンプリング時間は：ベースライン時点、5、30 分、2、4、6 及び 24 時間とし、皮下注射では、追加試料を $t = 8$ 時間で採取した(表 2)。血漿中の F V I I I 活性の定量は、標準の、a P T T に基づく方法 (Behring 凝固タイマー) により実施した。

30

【 0 0 7 9 】

F V I I I ノックアウト・マウスの結果を併せると、ウサギで得られた結果と一致した。100 U (F V I I I : C) / kg の Monoclate-P (登録商標) 静脈内に対する A U D C_{0-1d} は約 27.8 時間・U/mL で、同じ用量の皮下投与では 1.5 時間・U/mL となり、約 5 % のバイオアベイラビリティに相当した。1,800 U/kg まで殆ど 20 倍皮下投与量を増加した場合、僅かに約 2.5 倍だけの A U D C_{0-1d} の上昇をもたらした(図 2)。

40

【 0 0 8 0 】

【表 3】

表 2：皮下投与 Monoclate-P (登録商標) のバイオアベイラビリティ評価のための処置群 (FVIII ノックアウト・マウス)

No.	処置	用量 (FVIII:C) / 容積 / スケジュール / 経路	FVIII 濃度	N (合計)
1	Monoclate-P ^(R)	100 U/kg / 0.2 mL/20g / 静脈内	10 U/mL	35
2	Monoclate-P ^(R)	100 U/kg / 0.2 mL/20g / 皮下	10 U/mL	30
3	Monoclate-P ^(R)	1,800 U/kg / 0.4 mL/kg / 皮下	90 U/mL	40

10

【0081】

[実施例 3]

血友病 A モデル (F V I I I ノックアウト・マウス) における皮下投与 Haemate P (登録商標) のバイオアベイラビリティ評価

驚くべきことに、同じ用量の F V I I I を V W F 含有製品 (Haemate P (登録商標)) を用いて F V I I I ノックアウト・マウスに皮下投与した場合、血漿の F V I I I 活性の明らかな上昇が認められた (図 3)。実施例 2 と同じ研究デザインと方法を用いての A U D C_{0-2d} は、同じ用量の Monoclate-P (登録商標) に比べて、Haemate P (登録商標) ではなんと約 2 倍も高かった (表 3) : Haemate P (登録商標) で達成されたピーク血漿中濃度は約 2.5 ~ 3 倍高く、10 倍までの最大差を示した。この差から、皮下腔からの F V I I I の再吸収に対する V W F の有益な役割についての確固たる結論を引き出すことができる。V W F の役割を更に検討するために、Haemate P (登録商標) の用量を、反復実験において 900 U (F V I I I : C) / k g まで 50 % 減らした (表 4 ; 図 4)。驚くべきことに、これはより小さい A U D C_{0-1d} をもたらさなかった (表 5)。この結果の背景に対しては、このような高用量では再吸収メカニズムが飽和する可能性があると考えるのが妥当と考えられる。従って、V W F 含有溶液によって達成可能な改善を評価すると、達成し得る F V I I I の血漿レベルの上昇を過小評価する。

20

【0082】

【表 4】

表 3：1,800 U/kg の Monoclate-P (登録商標) 又は Haemate P (登録商標) 後の FVIII ノックアウト・マウスの FVIII 活性血漿レベルに対する A U D C の比較

No.	処 置	AUDC _{0-2d} [h. U/mL]	VWF:Ag/FVIII:C 比
1	1800 U(FVIII:C)/kg Haemate ^(R) P	11.2	3:1
2	1,800 U(FVIII:C)/kg Monoclate-P ^(R)	5.6	

30

【0083】

【表 5】

表 4：用量減量の効果を検討するための処置群 (FVIII ノックアウト・マウス)

No.	処置	用量 (FVIII:C) / 容積 / スケジュール / 経路	FVIII 濃度	N (合計)
1	Haemate ^(R) P	1800 U/kg / 0.56 mL/20g 体重 / 単回 t=0 / 皮下	64 U/mL	40
2	Haemate ^(R) P	900 U/kg / 0.64 mL/20g 体重 / 単回 t=0 / 皮下	28 U/mL	40

40

【0084】

【表 6】

表 5 : 900 及び 1,800U (FVIII:C)/kg の Haemate P(登録商標)後の FVIII ノックアウト・マウスの FVIII 活性血漿レベルに対する AUC_{0-1d} の比較

No.	処 置	AUC _{0-1d} [h. U/mL]	VWF:Ag/FVIII:C 比
1	1800 U(FVIII:C)/kg Haemate ^(R) P	9.8	3:1
2	900 U(FVIII:C)/kg Haemate ^(R) P	9.2	

【0085】

10

〔実施例 4〕

血友病 A マウスの FV I I I のバイオアベイラビリティに対する VWF : A g / F V I I I : C 比の役割の評価

VWF の影響の驚くべき所見を考慮して、投与溶液中の VWF : A g 対 F V I I I : C 比を系統的に変化させた。Haemate P (登録商標) 中の VWF : A g / F V I I I : C 比は、一般的に約 3 : 1 の範囲である。次の段階として、0.9 : 1 の VWF : A g / F V I I I : C 比を試験した (表 6)。実施例 2 と同じ方法を用いた。図 5 は、400 U (F V I I I : C) / k g の用量レベルでは、F V I I I : C のベースラインレベルが、Haemate P (登録商標) (VWF : A g / F V I I I : C 比 3 : 1) に対して約 48 時間後でも尚到達しなかったことを示す。「低い VWF : A g」溶液に対して、F V I I I : C レベルは、約 30 時間後に殆どベースラインに戻った。さらに、VWF : A g / F V I I I : C 比 3 : 1 では、ピーク F V I I I 血漿レベルは、0.9 : 1 の比に比べて約 2 倍～3 倍高かった。3 : 1 ~ 0.9 : 1 の VWF : A g / F V I I I : C 比の減少により、3 : 1 の比の製剤で達成された AUC_{0-2d} の丁度 22 % AUC_{0-2d} が低減した。この用量レベルでの VWF : A g / F V I I I : C 比の増加は、AUC 及び F V I I I のピーク血漿レベルを上昇させ、そして長期間血漿中の F V I I I レベルの上昇をもたらすと結論し得る。更なる実験において、6.5 : 1 の VWF : A g / F V I I I : C 比 (表 6) を 200 U (F V I I I : C) / k g の用量レベルで試験した。驚くべきことに 3 : 1 から 6.5 : 1 への VWF : A g / F V I I I : C 比の上昇は、同様に高い F V I I I : C ピークレベルをもたらしたが、しかし F V I I I : C は、約 2 倍～3 倍長い期間血漿中に認められた (図 6)。これに相応して、AUC_{0-1d} は約 2.7 倍上昇した。外見からみて、VWF : A g は、F V I I I : C のインビボ回復に影響を与えるだけでなく、F V I I I の高いピークレベル及び長期間の F V I I I : C レベルの上昇をももたらし得る。

20

30

【0086】

前記の実施例からの F V I I I の用量補正 AUC に関する結果を要約し補間すると、VWF : A g / F V I I I : C 比と循環系に到達する F V I I I の画分との明瞭な関係が導かれる (図 7)。広い範囲にわたって、この関係はかなり直線性と思われる。この関係は、これまで試験したものよりも高い VWF : A g / F V I I I : C 比においても、循環系へ輸送された F V I I I の画分が更に増加し得るという確固たる結論を可能にする。この関係の直線性の急勾配に因り、少なくとも 10 : 1 及び可能なら 20 : 1 の比で、これまで試験した最大比の約 2 倍又は 3 倍で、皮下投与後の AUC (F V I I I : C) の更なる増加が期待し得ると仮定することは妥当と考えられる。

40

【0087】

【表 7】

表 6 : VWF:Ag/FVIII:C 比の役割評価のための処置群(FVIII ノックアウト・マウス)

No.	処 置	用量／容積／ スケジュール／経路	FVIII 濃度	N(合計)
1	Haemate ^(R) P ^(R) 一般的比 (3:1)	400 U(FVIII:C)/kg + 1, 150 U(VWF:Ag)/kg/kg /0.2 mL/20g 体重 / 単回 t=0 時間 / 皮下	40 U/mL	25
2	Humate-P ^(R) ”低 VWF”(0.9:1)	400U/kg(FVIII:C)/kg + 370U(VWF:Ag)/kg/kg /0.2 mL/20g 体重 / t=-0 時間 / 皮下	40 U/mL	25
3	Haemate ^(R) P ^(R) 一般的な比 (3:1)	200 U(FVIII:C)/kg + 570 U(VWF:Ag)/kg/kg /0.2 mL/20g 体重 / 単回 t=0 時間 / 皮下	20 U/mL	20
4	Humate-P ^(R) ”高 VWF”(6,5:1)	200U/kg(FVIII:C)/kg+1, 300U(VWF:Ag)/kg kg/ 0.2 mL/20g 体重 / t=-0 時間 / 皮下	20 U/mL	25

【0088】

[実施例 5]

血友病 A マウスの凝固の補正に必要な最小 Haemate P (登録商標) 用量 (皮下) の決定
次の段階として、どの用量の Haemate P (登録商標) (一般的な VWF : Ag / F V I
I I : C 比 3 : 1) が F V I I I ノックアウト・マウスの凝固障害の補正に必要とされる
かという問題について検討した。このために、F V I I I ノックアウト・マウスを Haemat
e P (登録商標) で皮下処置し、そして凝固の結果を標準トロンボエラストグラフィー装
置で定量した。Roteg (登録商標) 05 アナライザーにより、全血を用いて in-TEM (登録商
標) 分析を実施した。血液を眼窩後方でサンプリングし、そしてサンプリング直後に分析
し、in-TEM (登録商標) 試薬を用いてトロンボエラストグラフィーを開始した；使用した
プロトコールは、装置メーカー (Pentapharm, GmbH, Munich, Germany) から提供された
ヒト血液分析の手引きを基本的に反映している。簡潔にいうと、反応は、ROTEG 装置内
において 37℃ でインキュベートした血液試料に in-TEM (登録商標) 試薬を加えることによ
り開始した。全体としてこの操作は、K. A. Landskroner et.al., Haemophilia (2005),
11, 346-352 中の血友病 A マウスについて記載された方法を反映している。in-TEM (登録
商標) 分析を F V I I I 欠乏血液に適用すると、一般的に凝固時間、C T、及び血餅形成
時間、C F T は延長し、 α 角 (及び対応して最大速度、max Vel) が増加し、最大速
度の観測までの時間、t - Max Vel が増加した；仮に最小であっても、凝固曲線下積
分面積 (AUC) にいくらかの変化が認められ、そして最大血餅硬度、MCF は正常のま
まであった。

【0089】

100、50 又は 25 U (F V I I I : C) / k g の Haemate P (登録商標) の皮下注
射は、F V I I I ノックアウト・マウスの α 角及び血餅形成時間 (C F T) の用量依存的
逆転をもたらした (表 7 ~ 10 ; 図 8 及び 9)。表 11 は 25 U (F V I I I : C) / k
g の Haemate P (登録商標) の静脈内注射で得られた結果を詳述している。補正の度合は
、静脈内注射の 100 U (F V I I I : C) / k g の Haemate P (登録商標) の皮下注射
にほぼ相当し、即ち F V I I I の VWF 含有製剤による皮下処置は、同レベルの止血の補
正を達成するために、静脈内注射より丁度約 4 倍高い用量を必要とした。

【0090】

Haemate P (登録商標) を用いた場合、50 U (F V I I I : C) / k g と同じ低用量
が、約 1 日間で凝固障害の完全な補正に十分であった。止血の補正は、投与用量が高いほ
ど一層長く持続した；即ち、100 U (F V I I I : C) / k g によって達成された補正
は約 2 日間持続した。これに基づいて血友病 A 患者において実質的に凝固を改善するの
に必要な用量を推定するために、健常マウスは、健常ヒトに比べて約 2 倍 ~ 3 倍高い内因性
F V I I I レベルを有することを考慮に入れなければならない。従って、50 U (F V I

I I : C) / k g の用量は、ヒトでは約 1 5 ~ 2 5 U (F V I I I : C) / k g と等量になる。これは、予防的処置時の血友病 A 患者が、従来の治療法により静脈内投与を介して受ける F V I I I の用量に対応する。これは、また、成人に対してさえも、皮下注射に対して十分好適な注射量に対応すると考えられる。加えて、この考え方は、V W F による製剤に基づく完全長 F V I I I の皮下注射によって達成される止血の、顕著な補正を説明するものである。これは、また、患者で達成された F V I I I 血漿レベルは、少なくとも予防的処置に十分であり—非静脈内注射の利便性が患者のクオリティ・オブ・ライフに対して主要な役割を果たしている状況であるという結論を示す。

【 0 0 9 1 】

【表 8】

10

表 7 : 処置群又はトロンボエラストグラフィー評価

No.	処 置	用量 (FVIII:C) / 容積 / スケジュール / 経路 静脈	FVIII 濃度	N (m / f)
1	非処置	該当せず ^a	該当せず ^a	19 (12/7)
2	Haemate ^(R) P	100 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t=0 時間 / 皮下	10 U/mL	56 (37/19)
3	Haemate ^(R) P	50 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t=0 時間 / 皮下	5 U/mL	24 (20/4)
4	Haemate ^(R) P	25 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t=0 時間 / 皮下	2.5 U/mL	48 (25/23)
5	Haemate ^(R) P	25 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t=0 時間 / 静脈内	2.5 U/mL	25 (25/0)

20

【 0 0 9 2 】

【表 9】

表 8 : 100 U(FVIII:C) / kg の Haemate P (登録商標) を皮下投与した後の in-TEM (登録商標) の結果

No.	時点 [h]	CT [sec]	CFT [sec]	α - 角 [°]	Max Vel	t-Max x Vel [sec]	AUC	MCF [mm]	N
1	0	199 ± 68	68 ± 27	76 ± 5	22 ± 8	250 ± 89	7184 ± 609	72 ± 6	19
2	5	190 ± 57	45 ± 15	82 ± 3	37 ± 9	232 ± 69	7541 ± 519	76 ± 5	9
3	8	177 ± 36	38 ± 6	82 ± 1	36 ± 4	205 ± 41	7037 ± 152	71 ± 2	12
4	16	240 ± 60	58 ± 11	79 ± 2	26 ± 3	289 ± 67	7306 ± 306	72 ± 3	8
5	20	199 ± 48	58 ± 13	78 ± 2	26 ± 5	241 ± 58	6795 ± 295	68 ± 3	7
6	24	207 ± 50	54 ± 14	79 ± 3	27 ± 7	242 ± 57	6933 ± 314	69 ± 3	8
7	32	189 ± 25	50 ± 5	81 ± 1	29 ± 3	238 ± 34	7548 ± 161	76 ± 2	4
8	48	230 ± 99	70 ± 27	76 ± 5	22 ± 8	293 ± 38	7161 ± 278	72 ± 3	8

30

【 0 0 9 3 】

40

【表 10】

表 9 : 50U(FVIII:C)/kg の Haemate P(登録商標)を皮下投与した後の in-TEM(登録商標)の結果

No.	時点 [h]	CT [sec]	CFT [sec]	α -角 [°]	Max Vel	t-Max Vel [sec]	AUC	MCF [mm]	N
1	0	199 ± 68	68 ± 27	76 ± 5	22 ± 8	250 ± 89	7184 ± 609	72 ± 6	19
2	5	167 ± 71	46 ± 13	81 ± 2	31 ± 6	206 ± 88	7211 ± 398	72 ± 4	8
3	8	211 ± 43	51 ± 13	80 ± 3	32 ± 12	258 ± 54	7281 ± 567	73 ± 6	8
4	16	225 ± 89	66 ± 24	77 ± 5	22 ± 8	283 ± 113	7102 ± 305	71 ± 3	8
5	20	172 ± 35	49 ± 12	80 ± 2	28 ± 6	214 ± 54	7083 ± 337	71 ± 3	8

10

【0094】

【表 11】

表 10 : 25U(FVIII:C)/kg の Haemate P(登録商標)を皮下投与した後の in-TEM(登録商標)の結果

No.	時点 [h]	CT [sec]	CFT [sec]	α -角 [°]	Max Vel	t-Max× Vel [sec]	AUC	MCF [mm]	N
1	0	199 ± 68	68 ± 27	76 ± 5	22 ± 8	250 ± 89	7184 ± 609	72 ± 6	19
2	5	223 ± 54	60 ± 14	78 ± 3	23 ± 5	271 ± 71	7072 ± 200	71 ± 2	16
3	8	181 ± 66	53 ± 22	79 ± 4	28 ± 9	224 ± 90	7143 ± 335	72 ± 3	24
4	16	248 ± 83	75 ± 28	75 ± 5	21 ± 9	313 ± 110	7304 ± 598	73 ± 6	12
5	20	191 ± 47	66 ± 15	77 ± 3	20 ± 5	231 ± 57	7009 ± 343	70 ± 3	8

20

【表 12】

表 11 : 25U(FVIII:C)/kg の Haemate P(登録商標)を静脈内投与した後の in-TEM(登録商標)の結果

No.	時点 [h]	CT [sec]	CFT [sec]	α -角 [°]	Max Vel	t-Max Vel [sec]	AUC	MCF [mm]	N
1	0	199 ± 68	68 ± 27	76 ± 5	22 ± 8	250 ± 89	7184 ± 609	72 ± 6	19
2	4	158 ± 24	36 ± 4	83 ± 1	39 ± 5	184 ± 24	7206 ± 150	73 ± 1	4
3	8	192 ± 15	40 ± 4	80 ± 1	35 ± 3	222 ± 16	7300 ± 119	74 ± 1	4
4	16	196 ± 14	40 ± 3	82 ± 1	35 ± 3	228 ± 14	7059 ± 118	71 ± 1	4
5	24	192 ± 75	47 ± 5	80 ± 1	29 ± 3	228 ± 81	6778 ± 410	68 ± 4	4
6	32	181 ± 19	37 ± 3	83 ± 1	42 ± 4	215 ± 20	7465 ± 170	75 ± 2	4

30

40

【0095】

【実施例 6】

皮下注射時にバイオアベイラビリティを増加させる VWF : Ag の有益な効果の位置としての筋肉内コンパートメントの排除

VWF は多機能タンパク質である。止血における直接的な役割に加えて、VWF は、また、循環系の FV III を安定化し、そして保護する重要な役割を果たしている。VWF : Ag が実質的に検出不能の III 型 VWF 病に罹った患者は、彼らが FV III の二次欠乏も患っているように、明瞭にこのことを示す。この背景に対して、フォンビルブラント病患者では、非 VWF 製剤化 FV III のバイオアベイラビリティが、VWF 製剤化 F

50

V I I I と実際は異なる可能性がある」と仮定することができる。第 1 の例では、F V I I I は循環系から正に迅速に排除されると考えられ、一方第 2 の例では、V W F により循環系において安定化する。

【0096】

この仮説を試験するために、F V I I I ノックアウト・マウスに、100 U (F V I I I : C) / k g の Helixate 又は Haemate P (登録商標) を、 $t = 0$ 、静脈内(尾静脈)単回処置で注射した。加えて、V W F ノックアウト・マウスに、50 U (F V I I I : C) / k g の Helixate 又は Haemate P (登録商標) を、 $t = 0$ 、静脈内(尾静脈)単回処置で注射した。これらの V W F ノックアウト・マウスは、エキソン 4 及び 5 を欠失しており、そして内因性 V W F を発現しない (Denis C. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, Vol 95, 9524-9529)。血液試料を短時間麻酔下に眼窩後方で採取し、実施例 2 では更なる試料処理を行った。全試料について、市販の E L I S A (Cedarlane Laboratories Ltd.) を用いてそれらのヒト F V I I I : A g 濃度を定量した。

10

【0097】

図 10 は、F V I I I ノックアウト・マウスに静脈内注射後の、高純度 F V I I I 及び V W F 製剤化 F V I I I 医薬品の殆ど同一の薬物動態を例証する。これは、ヒト F V I I I が、循環系において安定化のためにマウスではヒト V W F を必要としないことを示す。しかしながら、循環系においてヒト F V I I I を安定化する内因性 V W F が存在しない場合、根本的な相違がある (図 11) : 循環系に内因性 V W F をもたないマウス (V W F ノックアウト・マウス) では、高純度 F V I I I 製品 (Monoclade-P (登録商標)) の回復は、V W F 製剤化製品 (Haemate P (登録商標)) に比べて低く、むしろ迅速に消失する。

20

【0098】

F V I I I ノックアウト・マウスの結果 (図 10) を総合すれば、これは、また、ヒト F V I I I がヒト V W F に比べて動物の異種 V W F により同等に安定化されることを示す。循環系における明らかに追加的なヒト V W F : A g は、F V I I I ノックアウト・マウスに静脈投与後、ヒト F V I I I : C を更には安定化しないことから、皮下投与後の V W F : A g 含有製剤による F V I I I : C の安定化は、血管系とは異なるコンパートメントに介在していなければならない。これらの結果をまとめると、十分な V W F : A g が循環系に存在している限り、V W F : A g 製剤化 F V I I I の皮下注射後に認められるバイオアベイラビリティの向上は、循環系における F V I I I : C を安定化する結果ではなく、循環系への到達に関与している過程に従っていると結論することができる。これらの過程は、循環系に到達する前にタンパク質を分解するプロテアーゼからの F V I I I の保護を包含していると考えられる。バイオアベイラビリティの向上は、また、潜在的に活性な輸送メカニズムの結果を表わすと考えられる。それらは V W F に対してより効率的に作用し、V W F は、次いで受動的に F V I I I を共輸送する、又はそれらは、F V I I I 単独よりも V W F - F V I I I 複合体に更に効率的に作用する可能性がある。

30

【0099】

【表 1 3】

表 1 2 : FVIII ノックアウト及び VWF ノックアウト・マウスにおける、高純度 FVIII と VWF : Ag 製剤化 FVIII との薬物動力学比較のための処置群

No.	種属	処置	用量 (FVIII:C) / 容積 / スケジュール / 経路	N
1	FVIII ノックアウト・マウス	Helixate	100 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t=0 時間 / 静脈内	6
2	FVIII ノックアウト・マウス	Haemate ^(R) P	100 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t=0 時間 / 静脈内	6
3	VWF ノックアウト・マウス	Monoclate-P ^(R)	50 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t=0 時間 / 静脈内	20
4	VWF ノックアウト・マウス	Haemate ^(R) P	50 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t=0 時間 / 静脈内	20

【0100】

【実施例 7】

皮下注射によるフォンビルブラント病関連 F V I I I 欠乏症の治療－VWF : A g 製剤化 F V I I I 溶液の利点

減少した V I I I : C レベルは、血友病 A における出血表現型の原因であるばかりでなく、フォンビルブラント病 (VWD) において重要な役割を果たしている。実施例 7 で詳述したように、減少した F V I I I : C レベルは、VWF による安定化障害に起因する。VWF : A g 製剤化 F V I I I は血友病 A への皮下投与に好適であることが示されたので、F V I I I : C レベルが VWD でも増加するかどうかについて試験した (表 1 3)。400 U (F V I I I : C) / k g の Haemate P (登録商標) を VWF ノックアウト及び F V I I I ノックアウト・マウスに皮下注射し、そしてそれらの血漿の F V I I I : C 活性を分析した。実施例 2 と同じ研究デザインと方法を用いた。約 3 U / m L の内因性 F V I I I : C レベルを有する健常対照マウスと比べて、F V I I I : C ベースラインレベルの減少は、VWF ノックアウト及び F V I I I ノックアウト・マウスの両方に共通であったが、VWF ノックアウト・マウスは、更にそれらの内因性 VWF が欠如していた。従って、皮下投与 VWF : A g の有益な役割は、循環系に到達する F V I I I に関与する過程が、皮下投与 VWF : A g に完全に利用可能であると考えられることから、これらのマウスにおいて最も顕著であると考えられる。図 1 2 は、実際に F V I I I : C の上昇は、F V I I I ノックアウト・マウスに比べて VWF ノックアウト・マウスで一層顕著なことを示す。ベースラインを調整すると、ピークレベルは 6 倍まで高く、そして A U D C は VWF ノックアウト・マウスでは少なくとも 3 倍高かった。このことは、VWF : A g は 2 倍の効果、即ち、a) 皮下投与した F V I I I の取り込みの安定化 / 増強、及び b) いったん血漿に到達した場合、F V I I I のその後の安定化、を有するので、VWD においては、患者は、血友病 A 患者よりも潜在的にはるかに多く、VWF : A g 製剤化 F V I I I 製品を用いた皮下治療からも利益を得る可能性があることを示唆する。

【0101】

【表 1 4】

表 1 3 : FVIII ノックアウト及び VWF ノックアウト・マウスにおける VWF:Ag 製剤化 FVIII の薬物動力学比較のための処置群

No.	種属	処置	用量 (FVIII:C) / 容積 / スケジュール / 経路	N
1	FVIII ノックアウト・マウス	Haemate ^(R) P	400 U/kg / 0.2 mL / 20g 体重 / t=0 時間 / 皮下	25
2	VWF ノックアウト・マウス	Haemate ^(R) P	400 U/kg / 0.2 mL / 20g 体重 / t=0 時間 / 皮下	25

【0102】

[実施例8]

VWF:Agの皮下注射後のフォンビルブラント病におけるVWF欠乏症の治療

実施例8では、VWDにおけるFVII欠乏症の、皮下注射による潜在的治療を示すデータをまとめた。VWF欠乏症がVWF製品の皮下注射で治療できるかどうかを試験するために、CHBウサギに皮下経路経由で2,300 U/kgのVWF:Ag (Haemate^(R)P)を、単回注射によりt=0で注射した。ウサギの重量は約2.5~3 kgであった。ヒトVWF:Agの測定のために、血液試料を投薬前(ベースライン)及び処置後1、2、4、6、24、30時間、2及び3日に、耳介静脈を経て採取した(表14)。血液を10%クエン酸血液として抗凝固処理した。ヒトVWF:Agを血漿で定量し、市販ELISA; Roche Diagnosticsを用いて遠心分離により血液から処理した。血漿は分析前に-20℃で保存した。驚くべきことに、FVIIより大きくても、VWFがまた、循環系に入り、これがまたVWF:Agの皮下投与に基づくフォンビルブラント病治療の選択肢を提供することを見出した(図13)。

【0103】

【表15】

表14:ウサギに皮下注射した後のVWF:Agの再吸収評価のための処置群

No.	処置	用量 / 容積 / スケジュール / 経路	N
1	Haemate ^(R) P	2,300 U/kg VWF:Ag / 12.6 mL/kg 体重 / t=0 時間 / 皮下	4

【0104】

血漿試料のヒトVWF:Agを、市販ELISAキット(VWF:Ag、Roche Diagnostics)を用いて分析した。驚くべきことに、FVIIより大きくても、VWFも、また、循環系に入り、VWF:Agの皮下投与に基づいてフォンビルブラント病治療の選択肢となることが見出された。

【0105】

[実施例9]

VWDノックアウト・マウスにおけるFVIIなしVWF:Agの皮下投与

高純度VWFを、523 U (VWF:Ag) / kgの用量でVWFノックアウト・マウスに皮下注射した(表15)。ヒトVWF:Agの測定のために、血液試料を、投薬前(ベースライン)及び前投与、並びに処置後2、4、6、16時間、1、2及び3日に、眼窩後方で採取した。血液を10%クエン酸血液として抗凝固処理した。ヒトVWF:Agを血漿で定量し、市販ELISA; Roche Diagnosticsを用いて遠心分離により血液から処理した。血漿は分析前に-20℃で保存した。VWF:Ag血漿レベルは、この処置後約0.1~0.2 U (VWF:Ag) / mLのピークレベルに上昇した(図14)。VWF:RCの経時変化はやや急であり、血漿への輸送とそこからの消失の組み合わせを反映していた。このVWDモデルにおける血漿への輸送のヒトVWFの評価に加えて、血漿(ヒト)VWFレベルのこの上昇が、内因性FVII:Cの安定化の回復に因り、血漿中の内因性FVII:Cレベルの二次的上昇をもたらすかどうか、同時点で分析された。実際に、血漿中のFVII:Cレベルの上昇が認められ、これはVWFの経時変化にやや遅れて起こった。このことは、皮下投与VWFは血漿に輸送されるだけでなく、VWF:RCレベルで示されるように機能活性並びに内因性FVII:Cを安定化するその機能を更に保持するという結論を示す。しかしながら、FVIIの上昇は実施例7に認められるほど顕著ではなく、従って、VWF製剤化FVII溶液の皮下注射後のFVII:Cの上昇は、皮下腔からのFVIIの輸送並びに内因性FVIIの安定化の両者をもたらす。

【0106】

【表 16】

表 15：VWF ノックアウト・マウスへの純粋VWF の皮下投与のための処置群

No.	処置	用量 / 容積 / スケジュール / 経路	N
1	ヒトフォンビルブ兰特因子	523 U(VWF:Ag)/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t=0 に単回 / 皮下	40

【0107】

[実施例 10]

血友病 A モデル (F V I I I ノックアウト・マウス) における V W F 製剤化 F V I I I の免疫原性の評価

F V I I I に対する中和抗体の高頻度の生成は、重度血友病 A 患者の処置に対する主要な問題である。これらの患者の約 25% は、F V I I I の活性を中和するこれらの阻害抗体を生成する。従って、F V I I I の補充はもはや患者の止血の補正に役立たない。そのような阻害抗体は、一般的に最初の数回の処置により生成するものであって、例えば、未治療患者 (P U P) では、現時点でどんな患者がこの合併症に罹るかを予測するのは非常に困難である。使用した特定の F V I I I 濃縮物がこれに関与しているかどうかは、科学文献において論争中の話題である。最大の免疫反応を達成するようにデザインされた他のタンパク質から、投与方法が重要な役割を果たすこと、即ち、少なくとも、静脈内注射が一般的には皮下注射よりも免疫原性が少ないことは、明らかである。

【0108】

本実施例では、重度血友病 A 患者を顕わす動物モデルにおいて、V W F 製剤による F V I I I バイオアベイラビリティの増加が F V I I I の免疫原性増加と対応しているかという問題に取り組んだ。

【0109】

抗 F V I I I 総タイターを、Helixate (登録商標) でコーティングした E L I S A プレートを用いて測定した。簡潔に述べると、第 1 の免疫反応は、マイクロタイターウェル上にコーティングしたヒト F V I I I に対する血漿試料中の抗体の結合であった。洗浄工程に続いて、これらの捕捉抗体はペルオキシダーゼ標識抗マウス I g G、即ち、第 2 の免疫反応で検出された。ペルオキシダーゼ活性は、テトラメチルベンジジンを加えた後、0.5 N 硫酸により所定の時間後に反応を停止して光度測定法で定量した。

【0110】

以下の手順によりベセズダ (Bethesda) 分析を実施した。簡潔に述べると、1 B U を、37℃で 2 時間インキュベーションした後、F V I I I の総活性の 50% を阻害する、試験血漿の希釈の逆数と定義した。血漿試料希釈液及び健常ヒト対照血漿を混合して 37℃で 2 時間インキュベートした。残存 F V I I I 活性をインキュベーション後に定量した。従って、データはベセズダ (Bethesda) 単位 (B U) として報告し、そして直接比較を可能にするために抗 F V I I I の最大総タイターに標準化した。

【0111】

表 17 にまとめたデータは、静脈内注射後、V W F 製剤化 F V I I I (Haemate P (登録商標)) が V W F 無し F V I I I 製品 (Helixate (登録商標)) よりわずかに低い抗 F V I I I タイターを生んだことを示す。このような観察は科学文献での傾向と一致しており、V W F 製剤化製品による阻害抗体の生成に対し潜在的に低いリスクを示唆する (Goudem and J., Haemophilia, Vol. 13 Suppl. 5: 47-51, 2007; Ettingshausen C.E., Kreuz W., Haemophilia, Vol. 12 Suppl. 6: 102-106, 2006)。その比較が全抗 F V I I I 抗体に基づくか又はより特異的に F V I I I 活性を阻害するものに基づくかについて、実質的な差異はなかった。

【0112】

完全フロイントアジュバント (c F A) と併用した V W F 製剤化又は V W F 無し F V I I I のいずれかで、そしてわずかに異なるスケジュールで皮下処置した群において、免疫

反応は予想通り静脈群より高かった。しかしながら、更に重要なこととして、皮下注射のためにF V I I IをV W Fで製剤化した場合、免疫反応は、V W Fで製剤化しなかったF V I I Iの皮下注射よりかなり低かった。

【0113】

これは、抗F V I I I総タイター並びに阻害剤両方の場合であった。この驚くべき観察が、アジュバント並びに処置スケジュールの免疫賦活効果の妨害に因ることを排除するために、静脈比較について、アジュバントなしに同一処置スケジュールで実験を反復した。アジュバントとの併用の結果に一致して、Helixate（登録商標）（図1）の皮下注射後の高いタイターが、Helixate（登録商標）の静脈内注射に比べて認められた。その結果は、わずかに異なるデザインでも、V W F製剤は、V W Fで製剤化しなかったF V I I Iに比べて皮下注射後F V I I Iへの免疫反応を低下させることを確認した。これを2用量レベルで評価した。100 U（F V I I I：C）／k g用量のHaemate P（登録商標）を選択して、それらの皮下投与後に、200 U（F V I I I：C）／k gのHelixate（登録商標）で達成される血漿レベルに類似した血漿中F V I I Iレベルを達成した。観察された免疫反応のレベルに欠かせないと考えられる両コンパートメントで、即ち、低用量による循環系で又は高用量による皮下腔で、類似したF V I I Iレベルを達成するために、200 U（F V I I I：C）／k g用量のHaemate P（登録商標）を選択して、Helixate（登録商標）によるのと同じF V I I I用量を局所的に適用した。用量並びに免疫反応を定量する方法とは無関係に、V W F製剤化F V I I I（Haemate P(登録商標)）に対する反応は、Helixate（登録商標）に比べてそれほど顕著ではなかった。Helixate（登録商標）の特異的F V I I I活性はHaemate P（登録商標）に比べてかなり高かったものの、免疫反応はなお不活性化F V I I Iにも同様に向けられる筈であるので、V W Fの有益な効果は本実施例では過小評価されているようである。

【0114】

これらのデータを総合すると、驚くべきことに、皮下投与時に抗F V I I I抗体形成の最小化を達成し、そして特異的に抗F V I I I抗体を阻害するというV W F製剤の大きな利点があり、これは静脈投与後よりもかなり大きいことが実証される。このことは、Haemate P（登録商標）の高用量皮下群の血漿レベルが、V W F製剤による高いバイオアベイラビリティのために、Helixate（登録商標）の皮下投与で達成される血漿レベルより高いということを背景にして、更に驚くべきことでさえあった。

【0115】

【表 1 7】

表 1 6 : 皮下投与 FVIII の免疫原性に対する VWF の役割評価のための処置群
(FVIII ノックアウト・マウス)

No.	処置	用量 (FVIII:C) / 容積 / スケジュール / 経路	N
1	Helixate ^(R)	100 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t= 0, 4, 7, 11 日 / 静脈内	10
2	Haemate ^(R) P	100 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t= 0, 4, 7, 11 日 / 静脈内	10
3	Helixate ^(R)	100 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t= 0, 14, 25 日 / 皮下 (+ cFA / 0 日)	5
4	Haemate ^(R) P	100 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t= 0, 14, 25 日 / 皮下 (+ cFA / 0 日)	5
5	Helixate ^(R)	200 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t= 0, 4, 7, 11 日 / 皮下	5
6	Haemate ^(R) P	100 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t= 0, 4, 7, 11 日 / 皮下	8
7	Haemate ^(R) P	200 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t= 0, 4, 7, 11 日 / 皮下	9

【 0 1 1 6 】

【表 18】

表 17 : FVIII の静脈又は皮下投与による処置後の抗 FVIII 抗体及び FVIII 阻害抗体の
タイターに対する VWF の役割

No.	処置	用量 (FVIII:C) / 容積 / スケジュール / 経路	抗-FVIII 総タイター	ベセズダ分析 ¹ [BU/mL]
1	Helixate ^(R)	100 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t= 0, 4, 7, 11 日 / 静脈内	571	854
2	Haemate ^(R) P	100 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t= 0, 4, 7, 11 日 / 静脈内	268	737
3	Helixate ^(R)	100 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t= 0, 14, 25 日 / 皮下 (+ cFA / 0 日)	16648	16648
4	Haemate ^(R) P	100 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t= 0, 14, 25 日 / 皮下 (+ cFA / 0 日)	739	619
5	Helixate ^(R)	200 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t= 0, 4, 7, 11 日 / 皮下	2417	4479
6	Haemate ^(R) P	100 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t= 0, 4, 7, 11 日 / 皮下	365	501
7	Haemate ^(R) P	200 U/kg / 0.2 mL/20g 体重 / t= 0, 4, 7, 11 日 / 皮下	489	1031

¹ 観測された抗 FVIII 最大タイターに標準化したデータ (3 群)

【0117】

[実施例 11]

皮下投与後の VWF 及び FV I I I : C (VWF で製剤化) のバイオアベイラビリティに
対する VWF : A g / VWF : R C o 比の役割

これまでの実施例は、皮下投与 VWF が驚くべきことに循環系に達することを示してい
る。加えて、VWF での F V I I I 製剤が、皮下投与後に F V I I I ノックアウト・マウ
スにおいて F V I I I : C のバイオアベイラビリティを増加させることが実証された。本
実施例では、この点に関して VWF マルチマーパターンの潜在的役割を調べた。このテー
マを検討するために、2 群の F V I I I ノックアウト・マウスを、同じ F V I I I : C 用
量 (500 U / k g) 及び本質的に同じ VWF : A g 用量 (500 又は 520 U / k g)
で皮下処置した。しかしながら、それらの VWF : R C o 用量は約 3 倍異なった。これは
、異なる VWF パターンによって特徴付けられる、即ち小さいか又は大きいマルチマーか
らなるかのいずれか、主に小さいか又は大きいマルチマーかのいずれかの VWF 液剤を用
いることによって達成された。VWF : R C o / VWF : A g 比は、1 : 1.05 ~ 1 :
0.35 まで対応して変動した (表 18)。非処置 F V I I I ノックアウト・マウスによる
追加群が、対照として含まれた。スケジュール、経路及び注射量を全群同じにして、即ち
、投与は t = 0 において、0.2 mL / 20 g 体重の注射量で皮下により実施した。

【0118】

【表 1 9】

表 1 8 : VWF:RCo/VWF:Ag 比の役割評価のための処置群 (FVIII ノックアウト・マウス)

No.	処 置	用 量					N
		FVIII:C [U/kg]	VWF:Ag [U/kg]	VWF:Rco [U/kg]	VWF:Ag / FVIII:C 比	VWF:RCo / VWF:Ag 比	
1	非処置	なし	なし	なし	なし	なし	5
2	“VWF-モノマー” Haemate ^(R) P	500	500	474	1:1	1:1, 05	20
3	“VWF-マルチマー” Haemate ^(R) P	500	520	1494	1, 04:1	1:0, 35	20

10

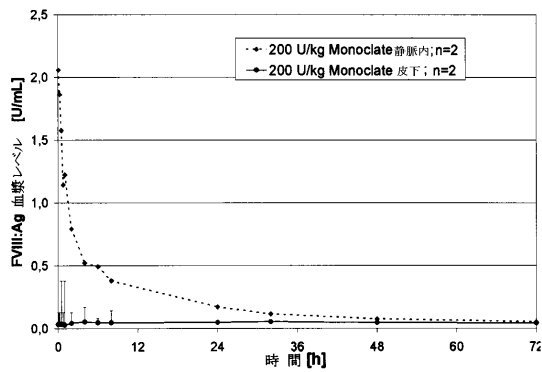
【0 1 1 9】

2 及び 3 群を同じ F V I I I : C 用量及び本質的に同じ V W F : A g 用量で処置したが、血漿中の F V I I I : C 濃度にかかなりの差が認められた(図 1 6)。V W F : A g 用量には有意差は見られなかったが、驚くべきことにベースラインを超える F V I I I : C 血漿レベルの増加は、「マルチマー」製剤で処置した群に比べて、Haemate P (登録商標) の「モノマー」製剤で処置した群において約 2 倍高かった。これと一致して、「モノマー」製剤で認められた F V I I I の上昇は、同等の用量の Haemate P (登録商標) で達成されるよりも高い F V I I I : C 血漿レベルをもたらしたようであった(図 5)。止血における役割と対照的に、マルチマーを含有する、即ち、約 1 : 0.35 の V W F : R C o / V W F : A g 比を有する多くの V W F 製剤は、多くのモノマーを含有する V W F 製剤によって達成される高く長く持続する F V I I I の増加に比べて、皮下投与した場合に F V I I I のバイオアベイラビリティ低下をもたらすと結論される。

20

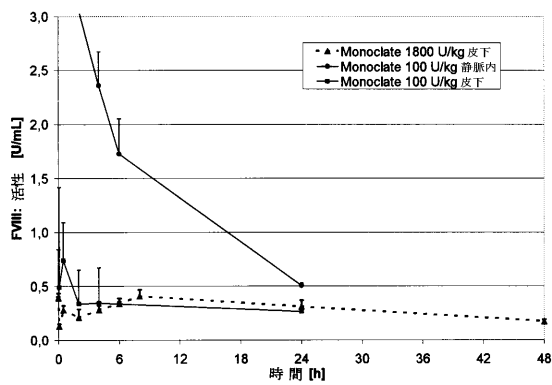
【図 1】

静脈又は皮下注射した200 U/kgのMonoclate-P（登録商標）の薬物動態
(n=2/群; 平均+SD)



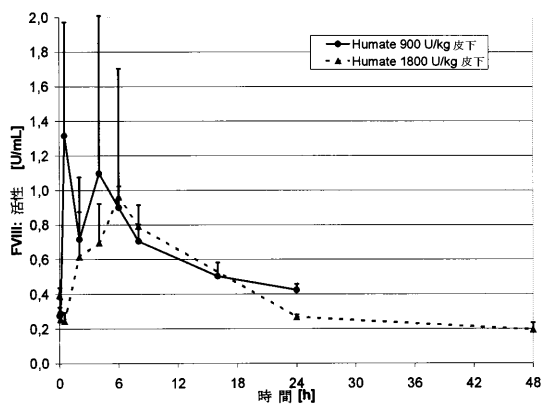
【図 2】

100 U/kgのMonoclate-P（登録商標）の静脈又は皮下及び1,800 U/kgの皮下後の、
FVIIIノックアウト・マウスの血漿のFVIII活性（平均+SD; n=4~5/時点）



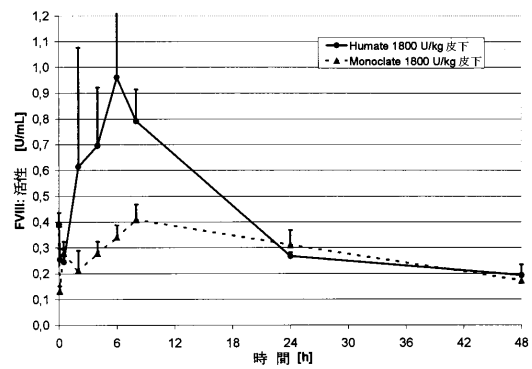
【図 4】

900又は1,800 U (FVIII:C) /kgのHaemate P（登録商標）の
皮下注射後2日までの平均FVIII活性+SD (n=5/時点)



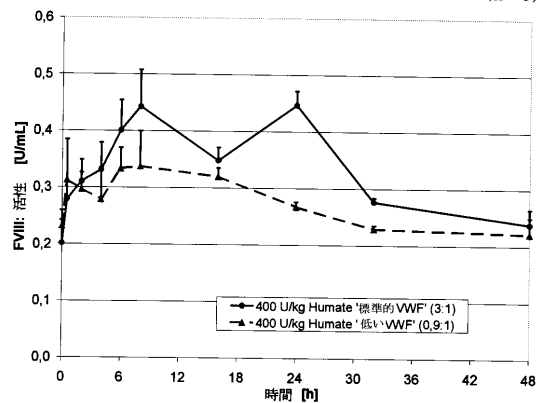
【図 3】

100 U (FVIII:C) /kgのMonoclate-P（登録商標）又はHaemate P（登録商標）後の
FVIIIノックアウト・マウスのFVIII活性血漿レベル（平均+SD; n=4~5/時点）



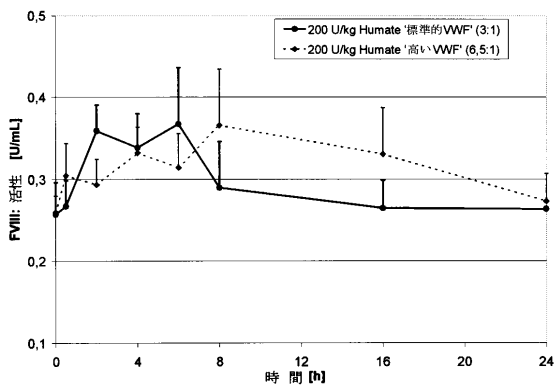
【図 5】

変化したVWF:Ag/FVIII:C比で特徴付けられる、400 U (FVIII:C) /kgの
Haemate P（登録商標）の皮下注射後2日までの平均FVIII活性+SD (n=5/時点)



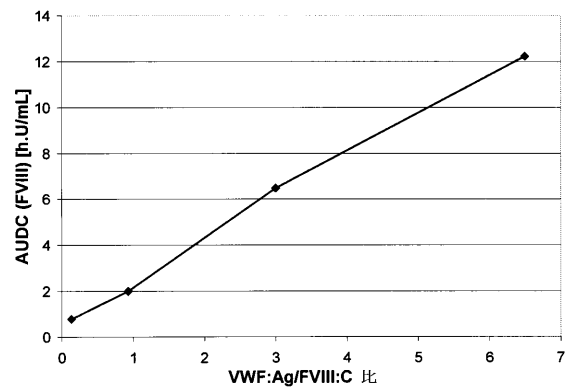
【図 6】

増加した VWF:Ag/FVIII:C 比で特徴付けられる、200U (FVIII:C)/kg の Haemate P (登録商標) の皮下注射後 2 日までの平均 FVIII 活性 + S D の経時変化 (n = 5/時点)



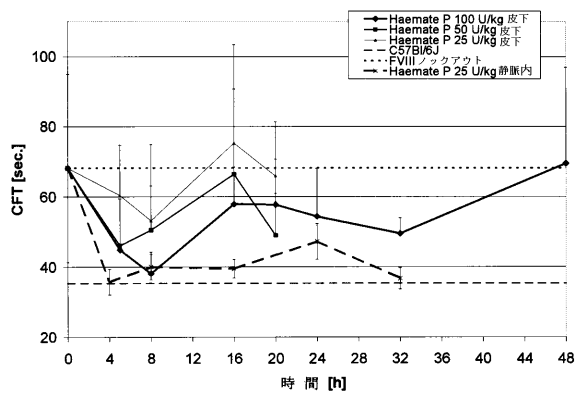
【図 7】

VWF:Ag/FVIII:C 比の増加による AUC (FVIII) の増加



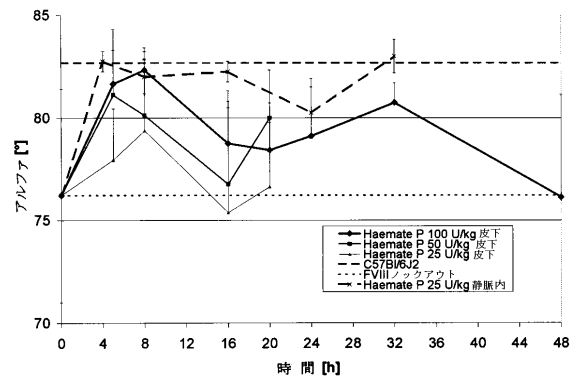
【図 8】

Haemate P (登録商標) の皮下注射後の血餅形成時間 (TEMIによる) (n = 7~24; 平均 + S D)



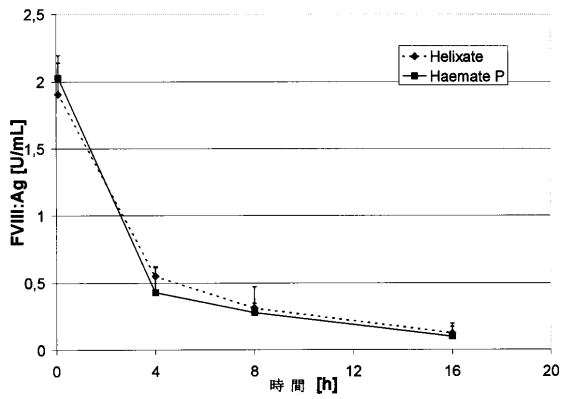
【図 9】

Haemate P (登録商標) の皮下注射後のアルファ (TEMによる) (n = 7~24; 平均 + S D)



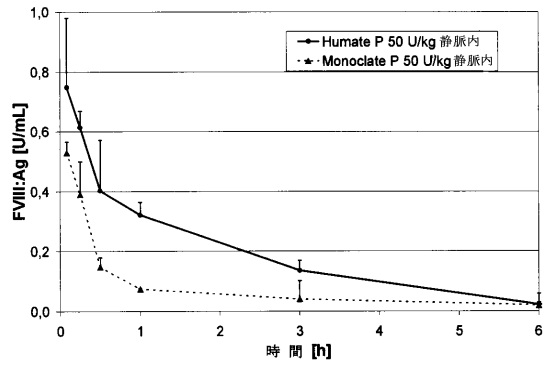
【図 10】

100 U (FVIII:C) / kg の Haemate P (登録商標) 又は Helixate の静脈注射後の、FVIII ノックアウト・マウスにおけるヒト FVIII : Ag 薬物動態の比較
(平均+SD ; n=3~5/時点)



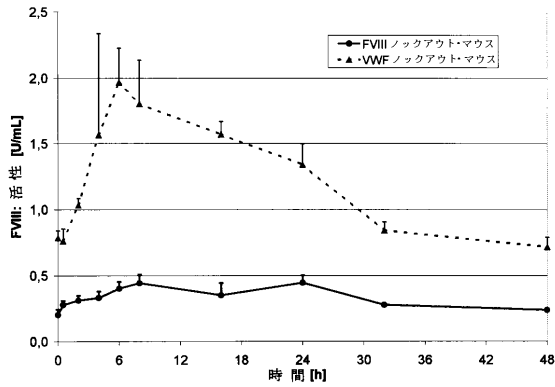
【図 11】

50 U (FVIII:C) / kg の Haemate P (登録商標) 又は Monoclate-P の静脈注射後の、VWF ノックアウト・マウスにおけるヒト FVIII : Ag 薬物動態の比較
(平均+SD ; n=5~6/時点)



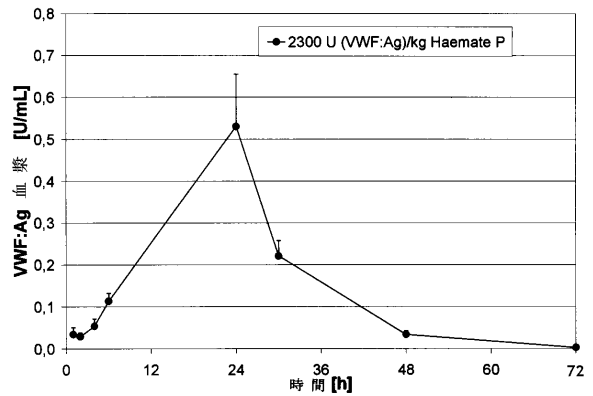
【図 12】

FVIII ノックアウト及びVWF ノックアウト・マウスに対する、400 U (FVIII:C) / kg の Haemate P (登録商標) の皮下注射後の血漿中 FVIII 活性の比較
(平均+SD, n=4~5/時点)



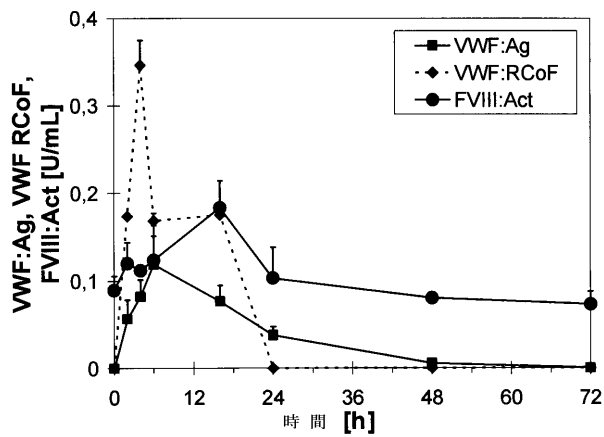
【図 13】

ウサギに 2,300 U (VWF:Ag) / kg の Haemate P (登録商標) を皮下注射した後の VWF:Ag 経時変化 (平均+SD ; n=4/時点)



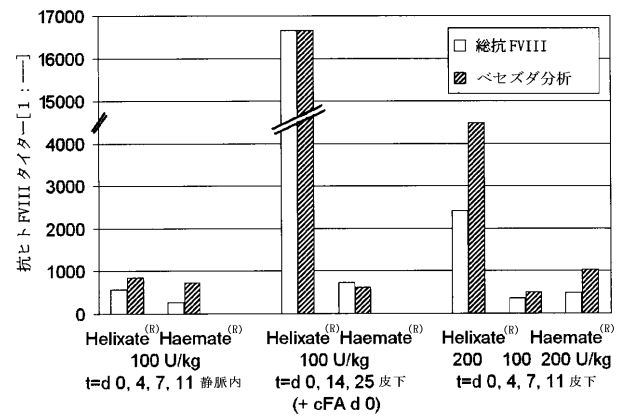
【図 14】

5.2.3 U (VWF:Ag) / kg の皮下注射後 3 日までの、平均の VWF:Ag、VWF:RCo 及び FVIII:C 血漿レベルの経時変化 (n=5/時点)



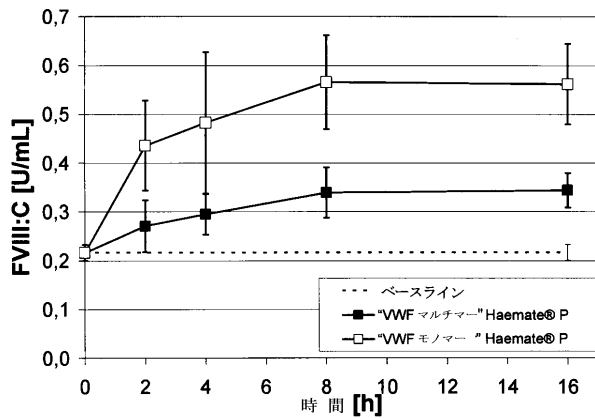
【図 15】

FVIII の静脈又は皮下投与後の、抗 FVIII 抗体及び FVIII 阻害抗体 (ベセスダ分析) の生成に対する VWF の役割



【図 16】

種々の VWF:RCo/VWF:Ag 比によって特徴付けられる、500U (FVIII:C) / kg の Haemate P (登録商標) 製剤の皮下注射後の平均 FVIII 活性血漿レベル ± S D の経時変化 (n=4/時点)



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/004770

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. A61K38/37	A61K38/36	A61P7/04
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 258 497 A2 (BIOVITRUM AB [SE]) 20 November 2002 (2002-11-20) cited in the application columns 27,47	5-8
Y		4,9,10
X	US 2006/160948 A1 (SCHEIFLINGER FRIEDRICH [AT] ET AL) 20 July 2006 (2006-07-20) columns 8,10,43 column 55	5-8
Y		4,9,10
X	EP 1 405 863 A (AVENTIS BEHRING GMBH [DE] CSL BEHRING GMBH [DE]) 7 April 2004 (2004-04-07) abstract columns 11,12,20	1-3
Y		4,9,10
-/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 August 2008		Date of mailing of the international search report 05/09/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5816 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bobkova, Dagmar

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/004770

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AMANO K, ARAI M, KOSHIHARA K, SUZUKI T, KAGAWA K, NISHIDA Y, FUKUTAKE K.: "Autoantibody to Factor VIII That Has Less Reactivity to Factor VIII/von Willebrand Factor Complex" AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY, vol. 49, no. 4, 1995, XP009086696 abstract page 311, columns 4,6 page 314, column 4	4,9,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/004770

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1258497	A2	20-11-2002	DK 1258497 T3	06-06-2005
			EP 1260582 A1	27-11-2002
US 2006160948	A1	20-07-2006	AU 2005322067 A1	06-07-2006
			CA 2591852 A1	06-07-2006
			EP 1835938 A2	26-09-2007
			KR 20070092754 A	13-09-2007
			WO 2006071801 A2	06-07-2006
EP 1405863	A	07-04-2004	AT 386055 T	15-03-2008
			AU 2003248466 A1	22-04-2004
			CA 2443463 A1	01-04-2004
			DE 10246125 A1	15-04-2004
			ES 2299653 T3	01-06-2008
			JP 2004123744 A	22-04-2004
			KR 20040030369 A	09-04-2004
			US 2004132654 A1	08-07-2004

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4C084 AA02 BA22 BA23 BA34 BA44 CA53 DC15 MA02 MA55 MA63
MA65 NA05 NA10 ZA532
4H045 AA30 BA10 CA40 DA65 DA66 EA24 FA72 FA74 GA21 GA26