

(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2013-533875

(P2013-533875A)

(43) 公表日 平成25年8月29日 (2013.8.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y 4 C 0 8 5
A 6 1 K 38/48 (2006.01)	A 6 1 K 37/475	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)		

(21) 出願番号 特願2013-518254 (P2013-518254)
 (86) (22) 出願日 平成23年6月30日 (2011.6.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年1月16日 (2013.1.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2011/004796
 (87) 国際公開番号 W02012/002745
 (87) 国際公開日 平成24年1月5日 (2012.1.5)
 (31) 優先権主張番号 10-2010-0062860
 (32) 優先日 平成22年6月30日 (2010.6.30)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 512188720
 ハンミ サイエンス カンパニー リミテッド
 HANMI SCIENCE CO., LTD.
 大韓民国, 445-813 キョンギード, ファソン-シ, ドンタン-ミョン, ドンタンキヒョン-ロ, 550
 550, Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-813, Republic of Korea
 (74) 代理人 100090343
 弁理士 濱田 百合子

最終頁に続く

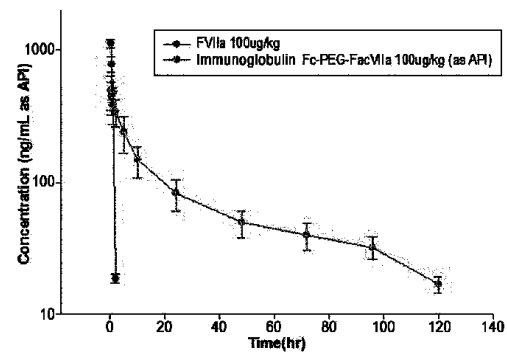
(54) 【発明の名称】 免疫グロブリン断片を用いた第7因子 (Factor VIIa) 薬物結合体

(57) 【要約】

【課題】 F a c V I I a、非ペプチド性重合体及び免疫グロブリン F c 領域が相互共有結合によって連結されており、生体内持続性及び安定性が向上した血液凝固結合体、及びその利用を提供すること。

【解決手段】 本発明の血液凝固結合体は、F a c V I I a の生体内活性が比較的高く維持され、血中半減期が顕著に増加して血液凝固治療の際に服薬順応度を著しく改善することができる。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

F a c V I I a 及び免疫グロブリン F c 領域が、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール - プロピレングリコールの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカライド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、ヒアルロン酸、及びこれらの組み合わせよりなる群から選ばれる非ペプチド性重合体を介して連結された、F a c V I I a 結合体。

【請求項 2】

非ペプチド性重合体の各末端がそれぞれ免疫グロブリン F c 領域と F a c V I I a の N 末端に結合した、請求項 1 に記載の F a c V I I a 結合体。

10

【請求項 3】

前記非ペプチド性重合体の各末端がそれぞれ免疫グロブリン F c 領域と F a c V I I a の軽鎖の N 末端に結合した、請求項 1 に記載の F a c V I I a 結合体。

【請求項 4】

免疫グロブリン F c 領域が非グリコシル化されることを特徴とする、請求項 1 に記載の F a c V I I a 結合体。

【請求項 5】

免疫グロブリン F c 領域が、C H 1、C H 2、C H 3 及び C H 4 よりなる群から選ばれた 1 つ ~ 4 つのドメインからなる、請求項 1 に記載の F a c V I I a 結合体。

20

【請求項 6】

免疫グロブリン F c 領域がヒンジ領域をさらに含む、請求項 5 に記載の F a c V I I a 結合体。

【請求項 7】

免疫グロブリン F c 領域が、I g G、I g A、I g D、I g E 又は I g M に由来する F c 領域である、請求項 1 に記載の F a c V I I a 結合体。

【請求項 8】

免疫グロブリン F c 領域のそれぞれのドメインが、I g G、I g A、I g D、I g E、及び I g M よりなる群から選ばれる免疫グロブリンに由来する相異なる起源を有するドメインのハイブリッドである、請求項 7 に記載の F a c V I I a 結合体。

30

【請求項 9】

免疫グロブリン F c 領域が、同一起源のドメインからなる単鎖免疫グロブリンで構成された二量体または多量体である、請求項 7 に記載の F a c V I I a 結合体。

【請求項 10】

免疫グロブリン F c 領域が I g G 4 F c 領域である、請求項 7 に記載の F a c V I I a 結合体。

【請求項 11】

免疫グロブリン F c 領域がヒト非グリコシル化 I g G 4 F c 領域である、請求項 10 に記載の F a c V I I a 結合体。

【請求項 12】

非ペプチド性重合体の反応基が、アルデヒド基、プロピオンアルデヒド基、ブチルアルデヒド基、マレイミド基及びスクシニミド誘導体よりなる群から選ばれる、請求項 1 に記載の F a c V I I a 結合体。

40

【請求項 13】

スクシニミド誘導体がスクシニミジルプロピオネート、スクシニミジルカルボキシメチル、ヒドロキシスクシニミジル又はスクシニミジルカルボネートである、請求項 12 に記載の F a c V I I a 結合体。

【請求項 14】

非ペプチド性重合体が両末端又は 3 末端に反応アルデヒド基の反応基を有する、請求項 12 に記載の F a c V I I a 結合体。

50

【請求項 15】

非ペプチド性重合体が各末端に反応アルデヒド基の反応基を有する、請求項 12 に記載の F a c V I I a 結合体。

【請求項 16】

非ペプチド性重合体がポリエチレングリコールである、請求項 15 に記載の F a c V I I a 結合体。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項の F a c V I I a 結合体を含む、血液凝固用薬学的組成物。

【請求項 18】

(1) 各末端にアルデヒド、マレイミド、又はスクシニミド誘導体反応基を有する非ペプチド性重合体を用いて免疫グロブリン F c 領域のアミン基又はチオール基に共有結合によって連結する段階と、

(2) 前記(1)の反応混合物から、非ペプチド性重合体が共有結合した免疫グロブリン F c 領域を含む連結体を分離する段階と、

(3) 分離された連結体の非ペプチド性重合体の他方の末端に F a c V I I を共有結合によって連結し、非ペプチド性重合体の末端がそれぞれ免疫グロブリン F c 領域及び F a c V I I に結合した F a c V I I 結合体を生成する段階と、

(4) 前記(3)で生成された F a c V I I 結合体を活性化させ、F a c V I I a 及び免疫グロブリン F c 領域が非ペプチド性重合体を介して連結される F a c V I I a 結合体を生成する段階とを含む、F a c V I I a 結合体の製造方法。

【請求項 19】

(1) 各末端にアルデヒド反応基を有する非ペプチド性重合体を用いて免疫グロブリン F c の N 末端に p H 5 . 0 ~ p H 7 . 0 で共有結合によって連結する段階と、

(2) 前記(1)の反応混合物から、N 末端に非ペプチド性重合体が共有結合した免疫グロブリン F c 領域を含む連結体を分離する段階と、

(3) 分離された連結体の非ペプチド性重合体の他方の末端に F a c V I I を共有結合によって連結し、非ペプチド性重合体の末端がそれぞれ免疫グロブリン F c 領域及び F a c V I I に結合した F a c V I I 結合体を生成する段階と、

(4) 前記(3)で生成された F a c V I I 結合体を活性化させ、F a c V I I a 及び免疫グロブリン F c 領域が非ペプチド性重合体を介して連結される F a c V I I a 結合体を生成する段階とを含む、F a c V I I a 結合体の製造方法。

【請求項 20】

前記(1)段階が、各末端にアルデヒド反応基を有する非ペプチド性重合体を用いて F a c V I I の軽鎖の N 末端に共有結合によって連結する段階である、請求項 18 に記載の F a c V I I a 結合体の製造方法。

【請求項 21】

前記 F a c V I I は F a c V I I の N 末端が非ペプチド性重合体と結合する、請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の F a c V I I a 結合体の製造方法。

【請求項 22】

前記活性化がオンカラム (O n - c o l u m n) 活性化又はインソリューション (I n s o l u t i o n) 活性化によって行われる、請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の F a c V I I a 結合体の製造方法。

【請求項 23】

前記 F a c V I I 及び F a c V I I a が天然型 F a c V I I 及び天然型 F a c V I I a である、請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の F a c V I I a 結合体の製造方法。

【請求項 24】

前記非ペプチド性重合体がポリエチレングリコールである、請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の F a c V I I a 結合体の製造方法。

【請求項 25】

請求項 1 の F a c V I I a 結合体を、血液凝固が必要である或いは血液凝固の必要可能性がある個体に投与する段階を含む、血液凝固関連疾病の治療方法。

【請求項 2 6】

請求項 1 7 の組成物を血液凝固が必要であるとか、或いは血液凝固の必要可能性がある個体に投与する段階を含む、血液凝固関連疾病の治療方法。

【請求項 2 7】

前記血液凝固関連疾病が血友病、出血、急性脳内出血、外傷又は F a c V I I 欠乏である、請求項 2 5 又は 2 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

本発明は、第 7 因子 (F a c t o r V I I a 、 F a c V I I a) の持続型剤形のための血液凝固結合体に関し、具体的には、F a c V I I a 、非ペプチド性重合体及び免疫グロブリン F c 領域を共有結合によって相互連結して血中半減期を顕著に増加させ、血液凝固機能を維持しながら服薬順応度を著しく向上させた血液凝固結合体に関するものである。また、本発明は、血液凝固因子結合体の製造方法に関するものである。

【背景技術】

【0 0 0 2】

現在、世界の血友病患者数は 1 4 万人に達するものと推定されており、その発病率は毎年 2 0 % の増加趨勢を示している。遺伝的に 1 万人当たり 1 人の比率で血友病が発生しているが、患者全体の 2 5 % 内外のみが診断又は治療を受けている。血液凝固因子治療の最も大きい問題点は、既存の治療剤に対する抗体が生成される部分にある。血液凝固因子 V I I が欠乏して発病する血友病を A 型、血液凝固因子 X I が欠乏して発病する血友病を B 型に分けて区分する。A 型血友病が全体血友病患者の 8 0 % 、B 型血友病患者が全体血友病患者の 2 0 % をそれぞれ占めるが、A 型血友病患者のうち 1 0 ~ 1 5 % が血液凝固因子治療の際に抗体が生成され、B 型血友病患者のうち 1 ~ 3 % が血液凝固因子治療の際に抗体が生成される。

20

【0 0 0 3】

F a c V I I a は F a c V I I の活性型である。肝臓で生成される F a c V I I は、4 0 6 個のアミノ酸からなる酵素であって、1 0 番のアミノ酸であるグルタミン酸が - カルボキシル化されており、1 4 5 番及び 3 2 2 番のアミノ酸であるアスパラギンが N - グリコシル化されており、5 2 番及び 6 0 番のアミノ酸であるセリンが O - グリコシル化されている。2 つの E G F 様ドメインと一つのセリンプロテアーゼドメインを有し、F a c V I I の 1 5 2 番目のアルギニンと 1 5 3 番目のイソロイシンの間が切断されながら重鎖の活性部位が露出して活性を有する。この過程で、軽鎖と重鎖がついている単鎖構造の F a c V I I が、軽鎖と重鎖が離れている 2 つの鎖構造の F a c V I I a に変形する。

30

【0 0 0 4】

F a c V I I a は、既存の様々な血液凝固因子とは異なり、血液凝固過程で補助血液凝固経路として作用して抗体が生成されず、それによる高用量投与が可能な血液因子である。したがって、血友病治療方法において、A 型及び B 型の血友病に全て適用可能であり、抗体生成及び高用量投与に高い安定性を有する F a c V I I a への代替治療が行われている。また、血液因子の治療過程で生成された抗体によりそれ以上既存の血液因子への血友病治療は不可能であり、F a c V I I a のみの治療が可能なのが現実である。

40

【0 0 0 5】

これに対し、F a c V I I a は、抗体は生成されないが、様々な血液凝固因子の中では最も短い血中半減期を有する。よって、頻繁な薬物投与により患者に苦痛を引き起こし、過量の薬物投与により患者に経済的負担を倍加させた。このような欠点を補完するために、F a c V I I a は必ず持続型製剤の開発が行われなければならない、それにより出血があるたびに血液因子を補充する補充療法だけでなく、予防目的の治療が可能になると期待している。

50

【0006】

F a c V I I a の C 末端にアルブミンを融合させた r V I I a - F P (C S L B e h r i n g) は、前臨床段階にあり、ラットにおいて血中半減期が天然型 F a c V I I a に比べて 6 . 7 倍増加したが、依然として 4 . 3 8 h と非常に短くて効果的な血友病治療及び予防への使用には適さない。

【0007】

ペグ化リポソーム剤形 (P e g y l a t e d l i p o s o m e f o r m u l a t i o n) を用いた P E G L i p - F V I I a (O m r i) の場合、やはり前臨床段階であるが、血中半減期が天然型 F a c V I I a に比べて 2 倍増加して微々たる水準である。

【0008】

F a c V I I a の G l a d m e i n 変異 (d o m a i n m u t a t i o n) 及びハイパーグリコシル化 (h y p e r g l y c o s y l a t i o n) を介して血中半減期を延長させた M A X Y - V I I (B a y e r / M a x y g e n) 、 4 0 K P E G グリコシル化を用いて血中半減期を延長させた N N 7 1 2 8 (N o v o / N e o s e) の 2 つの製品がそれぞれ臨床 1 床及び臨床 2 床進行中であるが、天然型 F a c V I I a に比べて 5 倍の血中半減期の増加により依然として効果的な血友病治療及び予防に適さない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明者は、F a c V I I a の血中半減期の増加及び生体内活性の維持を同時に極大化することが可能な方法として、免疫グロブリン F c 領域、非ペプチド性重合体及び F a c V I I a を共有結合によって位置特異的に相互連結させる製造方法を使用した。その結果、血液凝固機能結合体の血中半減期を 6 0 時間に画期的に増加させ、従来のペグ化方法又はインフレーション融合 (i n f r a m e f u s i o n) 方法より著しく改善された血中半減期増加効果を確認することにより、本発明を完成した。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の目的は、F a c V I I a の生体内活性を相対的に高く維持しながら血中半減期を延長させて著しく優れた血液凝固機能を有する F a c V I I a 結合体、これを含む持続型製剤、及びその製造方法を提供することにある。

【発明の効果】

【0011】

これまで述べたように、本発明の F a c V I I a 結合体は、F a c V I I a の生体内活性が比較的高く維持され、血中半減期が顕著に増加して、血液凝固機能を必要とする患者の服薬順応度を高めることが可能な F a c V I I a 持続型剤形の開発に有用に利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図 1】S D ラットにおける F a c V I I a と免疫グロブリン F c - P E G - F a c V I I a の時間別血中濃度変化を示すグラフである。

【図 2】N o v o s e v e n 、 F a c V I I a 、免疫グロブリン F c - P E G - F a c V I I a の i n v i t r o 効力を比較試験した結果である。

【図 3】N o v o s e v e n 、 F a c V I I a 、免疫グロブリン F c - P E G - F a c V I I a の i n v i v o 効力を比較試験した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明において使用される用語、「 F a c V I I a 」は凝固因子 V I I の活性型を意味する。

【0014】

好ましくは、本発明の F a c V I I a 結合体は、F a c V I I 結合体を活性化させて生成される。F a c V I I 、非ペプチド性重合体及び免疫グロブリン F c 領域から持続型結合体が生

10

20

30

40

50

成され、その後、F a c V I I a、非ペプチド性重合体及び免疫グロブリン F c 領域から構成された F a c V I I a 結合体を形成する活性化過程を経るが、この際、結合体の体内活性は増加し、構造的に同質化 (h o m o g e n e o u s) される。

【 0 0 1 5 】

本発明において、F a c V I I 結合体を F a c V I I a 結合体に活性化させる方法は、オンカラム (O n - c o l u m n) 活性化方法及びインソリューション (I n s o l u t i o n) 活性化方法を含むが、これに限定されるものではない。好ましくは、本発明の F a c V I I 結合体はオンカラム活性化方法を用いて活性化される。

【 0 0 1 6 】

固相 (S o l i d - p h a s e) 活性化方法とも呼ばれるオンカラム活性化過程において、F a c V I I 結合体は、陰イオン交換カラムに固定され、以後、別途の添加物なしでも「自己活性化 (a u t o a c t i v a t i o n) 」される。

【 0 0 1 7 】

インソリューション活性化方法は、オンカラム活性化方法とは異なり、F a c V I I の活性化に必要ないろいろの要素、例えばカルシウムイオンの濃度、p H、温度及び F a c V I I の濃度などを全て考慮して F a c V I I の活性化を誘導する方法である。

【 0 0 1 8 】

本発明の F a c V I I a は、補助血液凝固経路を介して血液凝固過程に作用する F a c V I I の活性型ペプチドである。このようなペプチドは、天然型 F a c V I I の活性型、F a c V I I a アゴニスト (a g o n i s t)、前駆物質 (p r e c u r s o r s)、誘導体 (d e r i v a t i v e s)、断片 (f r a g m e n t)、変異体 (v a r i a n t s) などを含む。

【 0 0 1 9 】

本発明において使用される用語「F a c V I I a アゴニスト」は、F a c V I I a の構造を問わず、F a c V I I a と同一の生物学的活性を示す物質を意味する。

【 0 0 2 0 】

本発明において使用される用語、「F a c V I I a 誘導体」は、体内で血液凝固を調節する機能を保有したペプチドを意味するもので、天然型 F a c V I I a と比較するときになくとも 8 0 % のアミノ酸配列で相同性を示し、アミノ酸残基の一部グループが化学的に置換 (例えば、アルファ - メチル化 (a l p h a - m e t h y l a t i o n)、アルファ - ヒドロキシル化 (a l p h a - h y d r o x y l a t i o n)、除去 (例えば、脱アミノ化 (d e a m i n a t i o n)) 又は修飾 (例えば、N - メチル化 (N - m e t h y l a t i o n)) された形態であってもよい。

【 0 0 2 1 】

本発明において使用される用語、「F a c V I I a 誘導体」は、F a c V I I a 配列に対して一つ又はそれ以上のアミノ酸が追加又は削除された形態を意味し、体内で血液凝固を調節する機能を保有する。追加されたアミノ酸は天然には存在しないアミノ酸 (例えば、D 型アミノ酸) であってもよい。

【 0 0 2 2 】

本発明において使用される用語、「F a c V I I a 変異体」は、F a c V I I a とアミノ酸配列が一つ以上異なるペプチドであって、体内で血液凝固を調節する機能を保有したペプチドを意味する。

【 0 0 2 3 】

それぞれの F a c V I I a アゴニスト、誘導体、断片及び変異体においてそれぞれ使用された製造方法は、独立して或いは組み合わせて適用できる。例えば、アミノ酸配列が一つ以上異なり、N 末端のアミノ酸残基に脱アミノ化された、体内での血液凝固調節機能を保有したペプチドも含まれる。

【 0 0 2 4 】

好ましくは、本発明の F a c V I I a 結合体は、非ペプチド性重合体、免疫グロブリン F c 領域及び F a c V I I a から構成されているが、非ペプチド性重合体の一方の末端と免疫

10

20

30

40

50

グロブリン F c 領域間、及び非ペプチド性重合体の他方の末端と F a c V I I a の N 末端部位間が結合している。

【 0 0 2 5 】

さらに好ましくは、本発明の F a c V I I a 結合体において、非ペプチド性重合体の一方の末端は免疫グロブリン F c 領域に連結され、非ペプチド性重合体の他方の末端は F a c V I I a の軽鎖の N 末端に連結されている。

【 0 0 2 6 】

F a c V I I a に関連して使用される用語、「N末端」とは、F a c V I I a の N 末端を含む領域を含む意味である。よって、F a c V I I a 結合体において、非ペプチド性重合体は、F a c V I I a の N 末端アミノ酸残基に結合するか、或いは F a c V I I a 結合体の機能が維持される限り、多少遠くにあるアミノ酸残基とも結合できる。

10

【 0 0 2 7 】

活性化前の F a c V I I は、軽鎖と重鎖とが連結された単鎖構造であるから、軽鎖の N 末端のみが露出している。F a c V I I が F a c V I I a の形態になると、F a c V I I の 1 5 2 番目のアルギニンと 1 5 3 番目のイソロイシンの間が切断されながら重鎖の活性部位が露出する。この際、露出する 1 5 3 番目のイソロイシンが重鎖の N 末端になる。重鎖の N 末端は F a c V I I a の活性に重要な役割を果たす部分であるから、重合体は重鎖ではなく軽鎖の N 末端に結合する場合に力価が高くなる。

【 0 0 2 8 】

具体的な一実施例として、免疫グロブリン F c 領域の N 末端に P E G に結合させ、ここに F a c V I I の軽鎖の N 末端に選択的に結合して F a c V I I - P E G - 免疫グロブリン F c 結合体を製造した。その後、別途の活性化過程を経て F a c V I I a - P E G - 免疫グロブリン F c 結合体を完成した。本発明で製造した F a c V I I a - P E G - 免疫グロブリン F c 結合体は、従来の治療物質に比べて一層増加した約 6 0 時間の血中半減期を有するとともに、モデル動物で卓越した血液凝固効果を示して生体内活性を維持した。よって、新規な持続型 F a c V I I a 剤形を製造することができた。

20

【 0 0 2 9 】

免疫グロブリン F c 領域は、生体内で代謝される生分解性のポリペプチドであるため、薬物のキャリアとして使用するには安全である。また、免疫グロブリン F c 領域は、免疫グロブリンの全体分子に比べて相対的に分子のサイズが小さいため、結合体の製造、精製及び収率の面で有利である。それだけでなく、アミノ酸配列が抗体ごとに異なるため、高い不均質性を示す F a b 部分を除去することにより、物質の同質性が大きく増加し、血中抗原性の誘発可能性も低くなる効果も期待することができる。

30

【 0 0 3 0 】

本発明において使用される用語、「免疫グロブリン F c 領域」は、免疫グロブリンの重鎖と軽鎖の可変領域、重鎖不変領域 1 (C H 1) と軽鎖不変領域 (C L 1) を除いた、重鎖不変領域 2 (C H 2) 及び重鎖不変領域 3 (C H 3) 部分を意味する。任意に重鎖不変領域にヒンジ部分を含むこともある。また、本発明の免疫グロブリン F c 領域は、免疫グロブリンの軽鎖と重鎖の可変領域のみを除いた典型的な F c 領域に比べて実質的に同等又はより向上した効果を有する限り、重鎖の不変領域 2 と 3 (C H 2 と C H 3) だけでなく、重鎖の不変領域 1 (C H 1) 及び / 又は軽鎖不変領域 1 (C L 1) の一部又は全部を含む拡張された F c 領域であってもよい。また、C H 2 及び / 又は C H 3 に該当する相当長い一部のアミノ酸配列が除去された領域であってもよい。すなわち、本発明の免疫グロブリン F c 領域は、1) C H 1 ドメイン、C H 2 ドメイン、C H 3 ドメイン及び C H 4 メイン、2) C H 1 ドメイン及び C H 2 ドメイン、3) C H 1 ドメイン及び C H 3 ドメイン、4) C H 2 ドメイン及び C H 3 ドメイン、5) 1 つ又は 2 つ以上のドメインと免疫グロブリンヒンジ領域 (又はヒンジ領域の一部) との組み合わせ、6) 重鎖不変領域の各ドメインと軽鎖不変領域の二量体であってもよい。

40

【 0 0 3 1 】

また、本発明の免疫グロブリン F c 領域は、野生型 F c だけでなく、そのアミノ酸配列

50

変異体 (mutant) を含む。アミノ酸配列変異体とは、一つ以上のアミノ酸残基が欠失、挿入、非保全的又は保全的置換、又はこれらの組み合わせによって野生型とは異なる配列を有するものを意味する。例えば、IgG Fc の場合、結合に重要であると知られている 214 ~ 238、297 ~ 299、318 ~ 322、又は 327 ~ 331 番のアミノ酸残基が変形のために適当な部位として利用できる。また、二硫化結合を形成することが可能な部位が除去されるか、或いは天然型 Fc から幾つかの N 末端のアミノ酸が除去されるか、或いは天然型 Fc の N 末端にメチオニン残基が付加されるなど、多様な種類の誘導体が可能である。また、天然型 Fc 領域からエフェクター機能を無くすために補体結合部位、例えば C1q 結合部位が除去されることも、ADCC 部位が除去されることも可能である。このような免疫グロブリン Fc 領域の配列変異体を製造する技術は、国際公開第 97/34631 号、国際公開第 96/32478 号などに開示されている。

10

【0032】

分子の活性を全体的に変更させないタンパク質又はペプチドにおけるアミノ酸置換は、当該分野における公知となっている (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。最も一般に起こる置換は、アミノ酸残基 Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、Asp/Gly 間の置換である。

20

【0033】

場合に依りては、リン酸化 (phosphorylation)、硫化 (sulfation)、アクリル化 (acrylation)、グリコシル化 (glycosylation)、メチル化 (methylation)、ファルネシル化 (farnesylation)、アセチル化 (acetylation)、アミル化 (amidation) などで修飾されることも可能である。

【0034】

前述した Fc 誘導体は、野生型の Fc 領域と同一の生物学的活性を示すが、熱や pH などに対する構造的安定性を増大させた誘導体である。

【0035】

また、このような Fc 領域は、ヒトや牛、ヤギ、豚、マウス、ウサギ、ハムスター、ラット、モルモットなどの動物の生体内から分離した天然型から得られてもよく、形質転換された動物細胞又は微生物から得られた組み換え型又はその誘導体であってもよい。天然型 Fc 領域は、ヒト又は動物の生体から分離された免疫グロブリン全体のプロテアーゼ分解によって得ることができる。免疫グロブリンは、パバインを処理する場合には Fab 及び Fc に切断され、ペプシンを処理する場合には pF'c 及び F(ab')₂ に切断された後、サイズ排除クロマトグラフィー (size-exclusion chromatography) などを用いて Fc 又は pF'c を分離することができる。

30

【0036】

好ましくは、微生物から収得した組み換えヒトの Fc 領域である。

40

【0037】

また、本発明で有用な免疫グロブリン Fc 領域は、天然型糖鎖、天然型に比べて増加した糖鎖、天然型に比べて減少した糖鎖、又は糖鎖が除去された形態であってもよい。このような免疫グロブリン Fc 糖鎖の増減又は除去には、化学的方法、酵素学的方法、及び微生物を用いた遺伝工学的な方法などの通常の方法が利用できる。ここで、Fc から糖鎖が除去された免疫グロブリン Fc 領域は、補体 (C1q) の結合力が顕著に低下し、抗体依存性細胞毒性又は補体依存性細胞毒性が減少又は除去されるので、生体内で不要な免疫反応を誘発しない。このようなことからみて、薬物のキャリアとしての本来の目的により良く符合する形態は脱グリコシル化或いは非グリコシル化された免疫グロブリン Fc 領域であるといえる。

50

【0038】

本発明において、「脱グリコシル化 (Deglycosylation)」はFc領域からの酵素による糖の除去を意味する。「非グリコシル化 (Aglycosylation)」は原核動物、好ましくは大腸菌からの糖がないFc領域を意味する。

【0039】

一方、免疫グロブリンFc領域は、ヒトや牛、ヤギ、豚、マウス、ウサギ、ハムスター、ラット、モルモットなどの動物起源であり、好ましくはヒト起源である。また、免疫グロブリンFc領域は、IgG、IgA、IgD、IgE、IgM由来又はこれらの組み合わせ (combination)、又はこれらの混成 (hybrid) によるFc領域でありうる。好ましくはヒトの血液中に最も豊富なIgG又はIgM由来であり、最も好ましくはリガンド結合タンパク質の血中半減期を向上させるものと知られたIgG由来である。

10

【0040】

一方、本発明において、「組み合わせ (combination)」とは、二量体又は多量体を形成するとき、同一起源の単鎖免疫グロブリンFc領域を暗号化するポリペプチドが、異なる起源の単鎖ポリペプチドと結合を形成することを意味する。すなわち、IgG1 Fc、IgG2 Fc、IgG3 Fc及びIgG4 Fc断片よりなる群から選ばれた2つ以上の断片から二量体又は多量体の製造が可能である。

【0041】

本発明において、「ハイブリッド (hybrid)」とは、単鎖の免疫グロブリンFc領域内に2つ以上の異なる起源の免疫グロブリンFc断片に該当する配列が存在することを意味する用語である。本発明の場合、様々な形態のハイブリッドが可能である。すなわち、IgG Fc、IgM Fc、IgA Fc、IgE Fc及びIgD FcのCH1、CH2、CH3及びCH4よりなる群から選ばれた1つ～4つのドメインからなるドメインのハイブリッドが可能であり、ヒンジを含むことができる。

20

【0042】

一方、IgGはIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4のサブクラスに分けることができ、本発明ではこれらの組み合わせ又はこれらの混成化も可能である。好ましくはIgG2及びIgG4サブクラスであり、最も好ましくは補体依存的細胞毒性 (CDC、Complement dependent cytotoxicity) などのエフェクター機能 (effector function) が殆どないIgG4のFc領域である。

30

【0043】

すなわち、最も好ましい本発明の薬物のキャリア用免疫グロブリンFc領域は、ヒトIgG4由来の非グリコシル化Fc領域である。ヒト由来のFc領域は、ヒト生体において抗原として作用し、これに対する新しい抗体を生成するなどの好ましくない免疫反応を引き起こすことが可能な非ヒト由来のFc領域に比べてさらに好ましい。

【0044】

本発明において使用される用語、「非ペプチド性重合体」は、繰り返し単位が2つ以上結合した生体適合性重合体を意味し、前記繰り返し単位は、ペプチド結合ではなく、任意の共有結合によって互いに連結される。このような非ペプチド性重合体は2つ又は3つの末端反応基を有する。

40

【0045】

本発明に使用可能な非ペプチド性重合体は、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール-プロピレングリコールの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカライド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、PLA (ポリ乳酸) 及びPLGA (ポリ乳酸グリコール酸) などの生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、ヒアルロン酸、及びこれらの組み合わせよりなる群から選択でき、最も好ましくはポリエチレングリコールである。当該分野における公知のこれらの誘導体及び当該分野の技術水準で容易に製造することが可能な誘導体も、本発明の範囲に含まれる。

50

【0046】

既存のインフレーション融合 (in frame fusion) 方法によって製造された融合タンパク質で使用されたペプチド性重合体の欠点は、生体内でタンパク質分解酵素によって容易に切断され、キャリアによる活性薬物の血中半減期増加効果を期待するほど得ることができない。ところが、本発明では、タンパク質分解酵素に抵抗性のある重合体を用いてキャリアと同様にペプチドの血中半減期を維持することができる。よって、生体内でタンパク質分解酵素に対する抵抗性を有する限り、本発明ではいずれの非ペプチド重合体でも制限なく使用できる。非ペプチド性重合体は、分子量 1 ~ 100 kDa の範囲、好ましくは 1 ~ 20 kDa の範囲である。また、前記免疫グロブリンFc領域と結合する非ペプチド性重合体は、1種類の重合体でなく、異なる種類の重合体の組み合わせも使用できる。

10

【0047】

本発明に有用に使用される非ペプチド性重合体は、免疫グロブリンFc領域とタンパク質薬物が結合できる反応基を有する。

【0048】

前記非ペプチド性重合体の両末端又は3末端を有する。そして、反応基は、反応アルデヒド基、プロピオンアルデヒド基、ブチルアルデヒド基、マレイミド基、及びスクシニミド (succinimide) 誘導体よりなる群から選ばれることが好ましい。ここで、前記スクシニミド誘導体としては、スクシニミジルプロピオネート、ヒドロキシスクシニミジル、スクシニミジルカルボキシメチル又はスクシニミジルカルボネートが利用できる。特に、前記非ペプチド性重合体が両末端に反応アルデヒド基の反応基を有する場合、非特異的反応を最小化し、非ペプチド性重合体の両末端で生理活性ポリペプチド及び免疫グロブリンとそれぞれ結合するのに効果的である。アルデヒド結合による還元性アルキル化で生成された最終産物は、アミド結合で連結されたものより一層安定的である。アルデヒド反応基は低いpHでアミノ末端に選択的に反応し、高いpH、例えばpH9.0条件ではリシン残基と共有結合を形成することができる。

20

【0049】

前記非ペプチド性重合体の両末端又は3末端の反応基は互いに同じでも異なってもよい。例えば、一方の末端にはマレイミド基、他方の末端にはアルデヒド基、プロピオンアルデヒド基、又はブチルアルデヒド基を有してもよい。両方の末端にヒドロキシ反応基を有するポリ(エチレングリコール)を非ペプチド性重合体として用いる場合には、ヒドロキシ基を本発明で使用する前に前記反応基として活性化させることができる。そうでない場合には、変形した反応基を有する商業的に入手可能なポリ(エチレングリコール)を用いて本発明のタンパク質結合体を製造することができる。

30

【0050】

また、本発明の他の様態として、本発明は、FacVIIa結合体を含む血液凝固用薬学的組成物を提供する。

【0051】

好ましくは、本発明は、血友病、出血、急性脳内出血、外傷及びFacVII欠乏を含む血液凝固関連疾病の治療用薬学的組成物を提供する。

40

【0052】

本発明において使用される用語、「投与」は、ある適切な方法で患者に所定の物質を導入することを意味する。前記結合体の投与経路は、薬物が目的組織に到達することができる限り、ある一般的な経路を介して投与できる。多様な方法の投与、例えば腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、経口投与、局所投与、鼻腔内投与、肺内投与、直腸内投与などが使用できるが、本発明はこれに制限されない。ところが、経口投与の際に、ペプチドは消化がなされるため、経口用組成物は活性薬剤をコートし、或いは胃における分解から保護されるように剤形化することが好ましい。好ましくは、注射剤として投与できる。また、本発明の薬学的組成物は、活性物質が標的細胞に移動することが可能な任意の装置によって投与できる。

50

【0053】

本発明の結合体を含む薬学的組成物は、薬学的に許容される担体を含むことができる。薬学的に許容される担体は、経口投与の場合には結合剤、滑沢剤、崩壊剤、賦形剤、可溶化剤、分散剤、安定化剤、懸濁化剤、色素、香料などを使用することができる。注射剤の場合には緩衝剤、保存剤、無痛化剤、可溶化剤、等張化剤、安定化剤などを混合して使用することができる。局所投与用の場合には基剤、賦形剤、潤滑剤、保存剤などを使用することができる。本発明の薬学的組成物の剤形は、上述したような薬学的に許容される担体と混合して様々に製造できる。例えば、経口投与の場合には錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル剤、サスペンション、シロップ、ウエハーなどの形で製造することができる。注射剤の場合には単位投薬アンブル又は多数回投薬の形態で製造することができる。その他、溶液、懸濁液、錠剤、丸薬、カプセル、徐放型製剤などに剤形化することができる。

10

【0054】

一方、製剤化に適した担体、賦形剤及び希釈剤の例としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリトリトール、マルチトール、澱粉、アカシア、アルギン酸塩、ゼラチン、リン酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、微晶質セルロース、ポリビニルピロリドン、水、ヒドロキシ安息香酸メチル、ヒドロキシ安息香酸プロピル、タルク、ステアリン酸マグネシウム又は鉱物油などが使用できる。また、充填剤、抗凝集剤、潤滑剤、湿潤剤、香料、防腐剤などをさらに含むことができる。

20

【0055】

本発明の薬学的組成物は、治療する疾患、投与経路、患者の年齢、性別、体重及び疾患の重症度などの様々な関連因子と共に、活性成分である薬物の種類によって決定される。本発明の薬学的組成物は、生体内持続性及び力価に優れるので、本発明の薬学的製剤の投与回数及び頻度を著しく減少させることができる。

【0056】

また、本発明の他の様態として、本発明は、前記 F a c V I I a 結合体又は本発明の薬学的組成物を血液凝固が必要である或いは血液凝固の必要可能性がある個体に投与する段階を含む、血液凝固関連疾病の治療方法を提供する。

【0057】

好ましくは、前記疾病は、血液凝固が不十分であって発生したものであって、その例として血友病、出血、急性脳内出血、外傷又は F a c V I I 欠乏を含み、これに限定されない。

30

【0058】

本発明において、個体はヒトを含むマウス、豚、牛、イヌ、羊などの哺乳動物を制限なく含むことができるが、好ましくはヒトである。

【0059】

F a c V I I a 結合体、組成物、投与などは前述したとおりである。

【0060】

本発明の他の様態として、本発明は、

【0061】

(1) 末端にアルデヒド、マレイミド、又はスクシニミド誘導体反応基を有する非ペプチド性重合体を用いて免疫グロブリン F c 領域のアミン基に共有結合によって連結する段階と、

【0062】

(2) 前記(1)の反応混合物から、非ペプチド性重合体が共有結合した免疫グロブリン F c 領域を含む連結体を分離する段階と、

【0063】

(3) 分離された連結体の非ペプチド性重合体の他方の末端に F a c V I I を共有結合によって連結し、非ペプチド性重合体の末端がそれぞれ免疫グロブリン F c 領域及び F a c V I I に結合した F a c V I I 結合体を生成する段階と、

40
50

【 0 0 6 4 】

(4) 前記 (3) で生成された F a c V I I 結合体を活性化させ、 F a c V I I a 及び免疫グロブリン F c 領域が非ペプチド性重合体を介して連結される F a c V I I a 結合体を生成する段階とを含む、 F a c V I I a 結合体の製造方法を提供する。

【 0 0 6 5 】

本発明の別の様態として、本発明は、

【 0 0 6 6 】

(1) 各末端にアルデヒド反応基を有する非ペプチド性重合体を用いて免疫グロブリン F c の N 末端に p H 5 . 0 ~ p H 7 . 0 で共有結合によって連結する段階と、

【 0 0 6 7 】

(2) 前記 (1) の反応混合物から、 N 末端に非ペプチド性重合体が共有結合した免疫グロブリン F c 領域を含む連結体を分離する段階と、

【 0 0 6 8 】

(3) 分離された連結体の非ペプチド性重合体の他方の末端に F a c V I I を共有結合によって連結し、非ペプチド性重合体の末端がそれぞれ免疫グロブリン F c 領域及び F a c V I I に結合した F a c V I I 結合体を生成する段階と、

【 0 0 6 9 】

(4) 前記 (3) で生成された F a c V I I 結合体を活性化させ、 F a c V I I a 及び免疫グロブリン F c 領域が非ペプチド性重合体を介して連結される F a c V I I a 結合体を生成する段階とを含む、 F a c V I I a 結合体の製造方法を提供する。

【 0 0 7 0 】

本発明の別の様態として、本発明は、

【 0 0 7 1 】

(1) 各末端にアルデヒド反応基を有する非ペプチド性重合体を用いて F a c V I I に共有結合によって連結する段階と、

【 0 0 7 2 】

(2) 前記 (1) の反応混合物から、非ペプチド性重合体が共有結合した F a c V I I を含む連結体を分離する段階と、

【 0 0 7 3 】

(3) 分離された連結体の非ペプチド性重合体の他方の末端に免疫グロブリン F c 領域を共有結合によって連結し、非ペプチド性重合体の両方の末端がそれぞれ免疫グロブリン F c 領域及び F a c V I I に結合した F a c V I I 結合体を製造する段階と、

【 0 0 7 4 】

(4) 前記 (3) で製造された F a c V I I 結合体を活性化させ、 F a c V I I a 及び免疫グロブリン F c 領域が非ペプチド性重合体を介して連結される F a c V I I a 結合体を生成する段階とを含む、 F a c V I I a 結合体の製造方法を提供する。

【 0 0 7 5 】

好ましくは、本発明の F a c V I I a 結合体の製造方法において、 F a c V I I 結合体は、陰イオン交換カラムに付着し、オンカラム活性化方法 (a u t o a c t i v a t i o n) によって F a c V I I a 結合体に活性化される。

【 0 0 7 6 】

好ましくは、本発明の F a c V I I a 結合体の製造方法の F a c V I I は、 F a c V I I の N 末端が非ペプチド性重合体と結合する。

【 0 0 7 7 】

さらに好ましくは、本発明の F a c V I I 結合体の製造方法の F a c V I I は、 F a c V I I の軽鎖の N 末端が非ペプチド性重合体と結合する。

【 0 0 7 8 】

好ましくは、本発明の F a c V I I a 結合体の製造方法の F a c V I I は、天然型 F a c V I I 、 F a c V I I アゴニスト (a g o n i s t) 、前駆物質 (p r e c u r s o r s) 、誘導体 (d e r i v a t i v e s) 、断片 (f r a g m e n t) 、又は変異体 (v a r i a n

10

20

30

40

50

t s) であり、最も好ましくは天然型 F a c V I I である。

【 0 0 7 9 】

好ましくは、本発明の F a c V I I a 結合体の製造方法の F a c V I I a は、天然型 F a c V I I a、F a c V I I a アゴニスト (A g o n i s t)、前駆物質 (p r e c u r s o r s)、誘導体 (d e r i v a t i v e s)、断片 (f r a g m e n t)、又は変異体 (v a r i a n t s) であり、最も好ましくは天然型 F a c V I I a である。

【 0 0 8 0 】

好ましくは、本発明の F a c V I I a 結合体の製造方法の非ペプチド性重合体は、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール - プロピレングリコールの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカライド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、P L A (ポリ乳酸) 及び P L G A (ポリ乳酸 - グリコール酸) などの生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、ヒアルロン酸及びこれらの組み合わせよりなる群から選択でき、最も好ましくはポリエチレングリコールである。

10

【 0 0 8 1 】

好ましくは、本発明の F a c V I I a 結合体の製造方法の非ペプチド性重合体は、末端にアルデヒド誘導体反応基を持っており、さらに好ましくは 3 末端のアルデヒド反応基を有する非ペプチド性重合体である。

【 実施例 1 】

【 0 0 8 2 】

以下、下記実施例によって本発明をより詳細に説明する。但し、これらの実施例は、本発明を例示するためのもので、本発明の範囲を限定するものではない。

20

【 0 0 8 3 】

実施例 1 : 免疫グロブリン F c - P E G - F a c V I I a 結合体の製造

免疫グロブリン F c は、5 K P r o p i o n A L D (3) P E G (末端プロピオンアルデヒド基を 3 つ持っている P E G、N O F、日本) によって N 末端でペグ化された。このために、免疫グロブリン F c と P E G のモル比を 1 : 2、免疫グロブリン F c 濃度を 6 m g / m L にして 4 で 4 . 5 時間反応した。この際、反応は p H 6 . 0 の 1 0 0 m M 濃度のリン酸カリウム緩衝液内で行われた。還元剤として 2 0 m M S C B (N a C N B H 3) を添加して反応させた。反応液は S O U R C E Q (L R C 2 5 8 5 m L、P a l l C o r p o r a t i o n) を用いてモノペグ化免疫グロブリン F c を精製した。その後、F V I I と免疫グロブリン F c - 5 K P E G のモル比を 1 : 1 0 (F V I I : 免疫グロブリン F c - 5 K P E G)、全体タンパク質濃度 2 0 m g / m L にして 4 で 1 8 時間反応した。カップリング反応は 1 0 0 m M リン酸カリウムの下で行なわれ、p H 6 . 0 を有し、還元剤として 2 0 m M S C B を添加した。カップリング反応液は 2 つの精製カラムを経て精製される。まず、カップリング反応に参加していない免疫グロブリン F c - 5 K P E G を除去するために、S O U R C E Q (L R C 2 5 8 5 m L、P a l l C o r p o r a t i o n) を用いた。2 0 m M T r i s (p H 7 . 5) で 1 M N a C l を用いて塩勾配を与えると、相対的に結合力が弱い免疫グロブリン F c - 5 K が先に溶出し、その後で免疫グロブリン F c - 3 a r m P E G - F V I I が溶出する。その後、F V I I 及び F V I I 多量体不純物から免疫グロブリン F c - 3 a r m P E G - F V I I を分離するために、S O U R C E I S O (G E H e a l t h c a r e) カラムで二次精製を行った。F V I I、免疫グロブリン F c - 3 a r m P E G - F V I I、F V I I 多量体の不純物が順次溶出した。

30

40

【 0 0 8 4 】

免疫グロブリン F c - 3 a r m P E G - F V I I の活性化のために、精製された免疫グロブリン F c - 3 a r m P E G - F V I I を S O U R C E Q に再結合させた後、1 . 7 5 m M のカルシウムイオンが含有された移動相を 6 時間流した。3 5 m M のカルシウムイオンとして溶出させて免疫グロブリン F c - 3 a r m P E G - F V I I a を得た。

【 0 0 8 5 】

50

カラム：Source Q (LR C25 85 mL、Pall Corporation)

【0086】

流速：4 mL / 分

【0087】

勾配：A 0 7% 1分 B、7% 40% 80分 B (A：20 mM Tris pH 7.5、B：A + 1 M NaCl)

【0088】

カラム：SOURCE ISO (23 mL、16 / 10 HRカラム、GE Healthcare)

10

【0089】

流速：2 mL / 分

【0090】

勾配：B 100 40% 60分 A (A：20 mM Tris pH 7.5、B：A + 1.6 M (NH₄)₂SO₄)

【0091】

カラム：Source Q (15 mL、16 / 10 HRカラム、GE Healthcare)

【0092】

流速：1 mL / 分

20

【0093】

移動相：20 mM Tris pH 7.5 + 1.75 mM CaCl₂ + 1.25 mM NaCl

【0094】

実施例 2：20 k PEG-FacVIIa (N) 結合体の製造

FVII (FacVII) は、20 k mPEGブチルアルデヒド (Nektar、米国) によって N 末端でペグ化された。このために、FVII と 20 k PEG のモル比を 1 : 5、FVII の濃度を 5 mg / mL にして 4 で 10 時間反応した。この際、反応は pH 5.0 の 100 mM 濃度の酢酸ナトリウム緩衝液内で行われた。還元剤として 20 mM SCB (NaCNBH₃) が添加された。モノペグ化 FVII は、RESOURCE Q (1 mL、prepacked、GE Healthcare) を介して精製された。20 mM Tris (pH 7.5) で 1 M NaCl を用いて塩勾配を与えると、マルチペグ化 FVII、モノペグ化 FVII、FVII の順に溶出する。その後、FVII 及び FVII 多量体不純物からモノペグ化 FVII を分離するために、Superdex __ 200 (Hiroad 16 / 60、GE Healthcare) カラムで二次精製を行った。精製されたモノペグ化 FVII の活性化のために、該当物質を SOURCE Q に結合させた後、1.75 mM カルシウムイオンが含有された移動相を 1 時間流した。35 mM のカルシウムイオンとして溶出させてモノペグ化 FVIIa を得た。

30

【0095】

カラム：RESOURCE Q (1 mL、prepacked、GE Healthcare)

40

【0096】

流速：0.5 mL / 分

【0097】

勾配：A 0 50% 50分 B (A：20 mM Tris pH 7.5、B：A + 1 M NaCl)

【0098】

カラム：Superdex __ 200 (Hiroad 16 / 60 HRカラム、GE Healthcare)

【0099】

50

流速：1 mL / 分

【0100】

移動相：PBS

【0101】

カラム：RESOURCE Q (1 mL、prepacked、GE Healthcare)

【0102】

流速：0.5 mL / 分

【0103】

移動相：20 mM Tris pH 7.5 + 1.75 mM CaCl_2 + 1.25 mM NaCl

10

【0104】

実施例 3：20 k PEG-FacVIIa (Lys) 結合体の製造

FVIIは、20 k mPEG SPA (Nektar、米国) によってリシン (lysine) 残基でペグ化された。このために、FVIIと20 k PEGのモル比を1:5、FVIIの濃度を3 mg/mLにして常温で3時間反応した。この際、反応はpH 8.0の100 mM濃度のリン酸ナトリウム緩衝液内で行われた。モノペグ化FVIIは、RESOURCE Q (1 mL、prepacked、GE Healthcare) を介して精製された。20 mM Tris (pH 7.5) で1 M NaClを用いて塩勾配を与えると、マルチペグ化FVII、モノペグ化FVII、FVIIの順に溶出する。その後、FVII及びFVII多量体不純物からモノペグ化FVIIを分離するために、Superdex__200 (Hiroad 16/60、GE Healthcare) カラムで二次精製を行った。精製されたモノペグ化FVIIの活性化のために、該当物質をSOURCE Qに結合させた後、1.75 mMのカルシウムが含有された移動相を1時間流した。35 mMのカルシウムイオンとして溶出させてモノペグ化FVIIaを得た。

20

【0105】

カラム：SOURCE Q (23 mL、HRカラム、GE Healthcare)

【0106】

流速：2 mL / 分

【0107】

勾配：A 0 50% 50分 B (A: 20 mM Tris pH 7.5、B: A + 1 M NaCl)

30

【0108】

カラム：Superdex__200 (Hiroad 16/60 HRカラム、GE Healthcare)

【0109】

流速：1 mL / 分

【0110】

移動相：PBS

【0111】

カラム：RESOURCE Q (1 mL、prepacked、GE Healthcare)

40

【0112】

流速：0.5 mL / 分

【0113】

移動相：20 mM Tris pH 7.5 + 1.75 mM CaCl_2 + 1.25 mM NaCl

【0114】

実施例 4：FVIIaと免疫グロブリンFc-PEG-FVIIaの血中半減期の測定

正常SDラットに100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のFVIIaと免疫グロブリンFc-PEG-FVIIa

50

を静脈投与した後、E L I S A法を用いて血中濃度を求め、2試験物質の薬物動力学係数を比較した。

【0115】

FVIIaを投与したラットは薬物投与0.25、0.5、1、2、5、10、24、48時間後、免疫グロブリンFc-PEG-FVIIaを投与したラットは投与0.25、0.5、1、2、5、10、24、48、72、96、120時間後に頸静脈から0.5mLの血液を採血した。クエン酸ナトリウムを含有するチューブに血液試料を集めて凝固を防止し、エッペンドルフ社の高速マイクロ遠心分離機で5分間遠心分離して血漿を分離した。血漿内タンパク質の量はFVIIaに特異的な抗体を用いてE L I S A法(I M U B I N D、Factor VIIa E L I S A Kit、american diagnostic inc.)で測定した。

10

【0116】

FVIIaと免疫グロブリンFc-PEG-FVIIaの血中濃度グラフ及び薬物動力学的分析結果をグラフ1と表1に示す。表において、Tmaxは最高薬物濃度に到達する時間、T1/2は薬物の血中半減期、MRT(mean residence time)は薬物分子の平均的な体内滞留時間をそれぞれ意味する。

【0117】

表1及び図1から分かるように、免疫グロブリンFc-PEG-FVIIaの血中半減期は、約60時間であって、優れた血中半減期を示すことを確認した。

【0118】

20

【表1】

SDラットにおけるFVIIaと免疫グロブリンFc-PEG-FVIIaの薬物動力学試験の結果

	F VII a	免疫グロブリンFc-PEG-F VII a
Tmax (hr)	0.25	0.25
T1/2 (hr)	0.284	60.4
MRT (hr)	0.63	32.71

【0119】

実施例5：FVIIaと免疫グロブリンFc-PEG-FVIIaのin vitro活性の測定

30

天然型FVIIa、及び実施例1で製造した免疫グロブリンFc-PEG-FVIIaのin vitro活性を測定するために、商用kit(Chromogenicix、COASE T)を用いてchromogenic assayを行った。商用対照品として使用されたNovosevenは、Novo nordisk社から販売されている遺伝子組み換えFVIIaであって、血友病患者の出血と手術の際に止血作用を適応症としている医薬品である。

【0120】

活性測定試験は、ヨーロッパ薬局方「2.7.10 ASSAY OF HUMAN COAGULATION FACTOR VII」に記述された内容に基づいて行った。濃度別に希釈されたNovoseven、FVIIa及び免疫グロブリンFc-PEG-FVIIaがFXをFXaに活性化させ、活性化されたFXaによって、基質として使用されたS-2765が加水分解されてペプチドと発色団(chromophoric group)としてのpNAに分解される。分解されたpNAは黄色を帯びるので、E L I S Aリーダーを用いて405nmで吸光度を測定した。測定された吸光度値と処理された薬物の濃度値を用いて用量反応曲線(dose response curve)とEC50値を確認した。試験結果、免疫グロブリンFc-PEG-FacVIIaのEC50値は50.72ng/mLであって、Novosevenに比べて27倍高かった(図2)。

40

【0121】

50

【表 2】

商用対照品 Novoseven、FVIIa、免疫グロブリンFc-P

EG-FVIIa の EC50 と比活性度 (specific activity) 数値

	Lot. No.	EC50 (as FVIIa)
Novoseven	PU60399	1.87 ng/mL
FVIIa	B13160-PJE271	1.77 ng/mL
免疫グロブリンFc-P EG-FacVIIa	B13160-LJE131	50.72 ng/mL

10

【0122】

実施例 6：FVIIa と免疫グロブリンFc-PEG-FVIIa の in vivo 効力の測定

FVIIa と免疫グロブリンFc-PEG-FVIIa の in vivo 活性を測定するために、ワルファリン (warfarin) 前に投与した SD ラットから試験物質投与による in vivo FVII(a) の活性を測定した。商用対照品として使用された Novoseven は、Novo nordisk 社から販売されている遺伝子組み換え FVIIa であって、血友病患者の出血と手術の際に止血作用を適応症としている医薬品である。

【0123】

Factor II、IX、X、VII などのビタミン K 依存性凝固因子の -カルボキシル化を阻害する物質であるワルファリンを 24 時間前に投与した SD ラットに Novoseven、FVIIa 及び免疫グロブリンFc-PEG-FVIIa 250 µg を静脈投与した。投与 25 分、4、24、48 時間後に頸静脈を流れる 1 mL の血液をクエン酸ナトリウム含有チューブを用いて採血した。遠心分離によって血清を分離し、分離された血清から FVII (%) の活性を ACL9000 (Werfen group) を用いて測定した。

20

【0124】

試験結果、FVIIa の in vivo 活性は Novoseven と類似した活性を持った。免疫グロブリンFc-PEG-FVIIa の活性は、投与 25 分後と 4 時間後に Novoseven に比べて低い活性を示したが、投与 24 時間後には Novoseven に比べて 6.5 倍高い活性を維持した (表 3、図 3)。

30

【0125】

【表 3】

商用対照品 N o v o s e v e n、F VII a 及び免疫グロブリン F c -
P E G - F VII a の時間による i n v i v o 活性結果

グループ		F VII (%)			
		2 5 分	4 時間	2 4 時間	4 8 時間
無 処 置 (Non-treat)	ビヒクル (Vehicle)	218.8± 39.1	183.6± 9.4	240.8± 40.1	239.4± 24.6
ワルファリ ン前処理 1 0 m g / k g	ビヒクル	3.5±1.5	2.6±0.7	3.0±0.8	16.9± 11.5
	N o v o s e v e n	762.6± 138.1	298.2± 169.1	3.2±0.8	28.7± 26.0
	F VII a	838.8± 147.9	303.8± 59.2	4.7±3.6	39.5± 44.2
	免疫グロブ リン F c - P E G - F a c VII a	295.8± 51.3	217.6± 34.1	20.8±5.3	27.9± 24.0

10

20

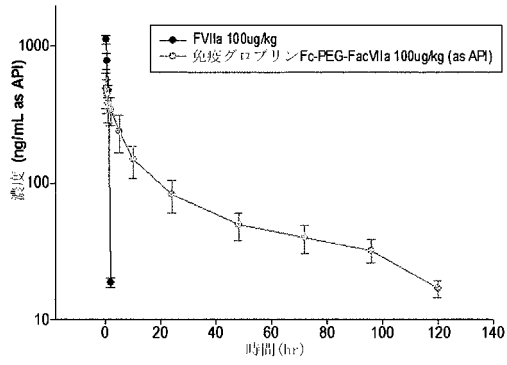
【 0 1 2 6 】

前述したように、本発明の F a c VII a 結合体は、F a c VII a の生体内活性を保障し、F a c VII a の血中半減期を相当増加させることにより、血液凝固が起こらない患者の行動に対する F a c VII a の持続型剤形の開発に有用であった。

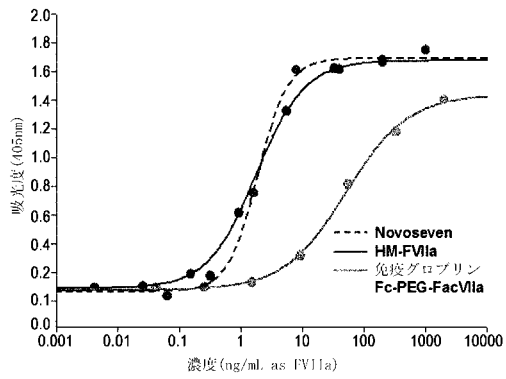
【 0 1 2 7 】

たとえ本発明の実施例が例示するためのものであっても、当該分野における技術者であれば、添付した請求の範囲に開示された本発明の範囲及び意味の範疇内において、多様な変形、追加及び置換を加え得るであろう。

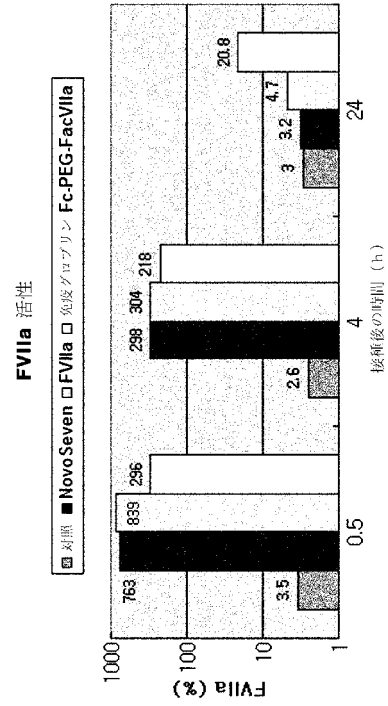
【図 1】





【図 2】



【図 3】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2011/004796
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i, C07K 14/745(2006.01)i, C07K 16/18(2006.01)i</i>		
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 47/48; A61K 39/395; C07C 237/12; A61K 38/36; C12P 21/02; C12N 9/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) cKOMPASS(KIPO internal), PubMed, JPO, USPTO, Google & Keywords: Factor VIIa, immunoglobulin, Fc region, non-peptidyl polymer		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006-0269553 A1 (YOUNG MIN KIM et al.) 30 November 2006 See abstract; paragraph [0074]; claims 1,15,18.	1-24
A	US 2009-0305967 A1 (SHAWN DEFREES et al.) 10 December 2009 See abstract; all claims.	1-24
A	US 2009-0285780 A1 (LEE CHYI) 19 November 2009 See abstract; all claims.	1-24
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 23 FEBRUARY 2012 (23.02.2012)		Date of mailing of the international search report 24 FEBRUARY 2012 (24.02.2012)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Kim, Moon kyoung Telephone No. 82-42-481-5610 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/004796

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 25-27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 25-27 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/004796

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006-0269553 A1	30.11.2006	AU 2004-282984 A1	14.07.2005
		AU 2004-282984 A8	18.09.2008
		AU 2008-330315 A1	04.06.2009
		CA 2512657 A1	26.05.2005
		CA 2512933 A1	26.05.2005
		CA 2706627 A1	04.06.2009
		CN 101878036 A	03.11.2010
		CN 1723219 A	18.01.2006
		CN 1723219 B	26.05.2010
		EP 1682581 A1	26.07.2006
		EP 1682581 A4	05.11.2008
		EP 1682582 A1	26.07.2006
		EP 2227243 A2	15.09.2010
		EP 2239273 A1	13.10.2010
		EP 2256134 A1	01.12.2010
		JP 04-762904 B2	17.06.2011
		JP 2007-531513 A	08.11.2007
		JP 2007-531513 T	08.11.2007
		JP 2007-532098 A	15.11.2007
		JP 2007-532098 T	15.11.2007
		JP 2007-536211 A	13.12.2007
		JP 2007-536211 T	13.12.2007
		JP 2007-537992 A	27.12.2007
		JP 2007-537992 T	27.12.2007
		JP 2011-505355 A	24.02.2011
		KR 10-0725314 B1	07.06.2007
		KR 10-0725315 B1	07.06.2007
		KR 10-0775343 B1	08.11.2007
		KR 10-2005-0047030 A	19.05.2005
		KR 10-2006-0054252 A	22.05.2006
		KR 10-2009-0056796 A	03.06.2009
		RU 2005120239 A	20.04.2006
		RU 2005120240 A	20.04.2006
		RU 2352583 C2	20.04.2009
		RU 2356909 C2	27.05.2009
		US 2006-0275254 A1	07.12.2006
		US 2006-0276633 A1	07.12.2006
		US 2007-0041967 A1	22.02.2007
		US 2008-0085862 A1	10.04.2008
		US 2008-0124347 A1	29.05.2008
		US 2009-0238838 A1	24.09.2009
		US 2010-0255014 A1	07.10.2010
		US 2010-0261248 A1	14.10.2010
		US 2010-0330108 A1	30.12.2010
		US 2011-0245472 A1	06.10.2011
		US 7736653 B2	15.06.2010
		US 7737260 B2	15.06.2010
		US 8029789 B2	04.10.2011
		WO 2005-047334 A1	26.05.2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/004796

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009-0305967 A1	10.12.2009	WO 2005-047335 A1	26.05.2005
		WO 2005-047336 A1	26.05.2005
		WO 2005-047337 A1	26.05.2005
		WO 2009-069983 A2	04.06.2009
		WO 2009-069983 A3	04.06.2009
US 2009-0305967 A1	10.12.2009	AU 2006-280932 A1	22.02.2007
		CA 2619969 A1	22.02.2007
		CN 101374861 A	25.02.2009
		EP 1937719 A2	02.07.2008
		EP 1937719 A4	24.11.2010
		JP 2009-515508 A	16.04.2009
		JP 2009-515508 T	16.04.2009
		KR 10-2008-0080081 A	02.09.2008
		MX 2008002395 A	18.03.2008
		US 2007-0105755 A1	10.05.2007
		US 2010-0113743 A1	06.05.2010
		US 2010-0330645 A1	30.12.2010
		WO 2007-022512 A2	22.02.2007
		WO 2007-022512 A3	04.10.2007
US 2009-0285780 A1	19.11.2009	EP 2089052 A1	19.08.2009
		EP 2089052 A4	16.02.2011
		WO 2007-140282 A1	06.12.2007

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 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, CL, 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, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100105647

弁理士 小栗 昌平

(74)代理人 100105474

弁理士 本多 弘徳

(74)代理人 100108589

弁理士 市川 利光

(72)発明者 ソン, デ ハエ

大韓民国, 4 4 5 - 7 9 2 キョンギ - ド, ファソン - シ, ネウン - ドン, ジャウエオン - シン デ
シアン アパートメント, 8 7 5 - 1 4 0 1

(72)発明者 リム, スン イン

大韓民国, 4 4 5 - 1 6 0 キョンギ - ド, ファソン - シ, バンソン - ドン, 8 6 - 7, オフィス
タワー, 1 0 1 1

(72)発明者 キム, チャン フワン

大韓民国, 4 4 1 - 7 3 7 キョンギ - ド, スウォン - シ, グウォンソン - グ, グウォンソン - ド
ン, グウォンソン エスケー ビュー アパートメント, 1 0 6 - 1 0 1

(72)発明者 ホン, スン カップ

大韓民国, 4 4 6 - 7 2 4 キョンギ - ド, ヨンギン - シ, ギヒュング - グ, ジュン - ドン, ワー
ルド メリディアン アパートメント, 1 1 1 - 7 0 2

(72)発明者 イム, デ ソン

大韓民国, 4 4 6 - 5 6 9 キョンギ - ド, ヨンギン - シ, ギヒュング - グ, グガル - ドン, 3 5
9 - 2, 3 0 2

(72)発明者 クウォン, セ チャン

大韓民国, 1 4 3 - 7 5 1 ソウル, グワンジン - グ, グワンジン - ドン, ケウクドン アパート
メント, 1 0 - 1 2 0 4

F ターム(参考) 4C076 CC11 EE23A EE59A FF31

4C084 AA02 AA03 DC15 MA05 NA12 ZA531 ZA532

4C085 AA35 BB42 EE01