

(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2012-508172

(P2012-508172A)

(43) 公表日 平成24年4月5日(2012.4.5)

(51) Int.Cl.

**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 7/04** (2006.01)  
**A61K 47/34** (2006.01)  
**A61K 47/36** (2006.01)  
**A61K 47/42** (2006.01)

F 1

A 61 K 47/48  
A 61 P 7/04  
A 61 K 47/34  
A 61 K 47/36  
A 61 K 47/42

テーマコード(参考)

4 C 0 7 6  
4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-534887 (P2011-534887)  
(86) (22) 出願日 平成21年11月3日 (2009.11.3)  
(85) 翻訳文提出日 平成23年6月1日 (2011.6.1)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2009/063151  
(87) 國際公開番号 WO2010/062768  
(87) 國際公開日 平成22年6月3日 (2010.6.3)  
(31) 優先権主張番号 61/110,809  
(32) 優先日 平成20年11月3日 (2008.11.3)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 503106111  
バイエル・ヘルスケア・エルエルシー  
アメリカ合衆国ニューヨーク州10591  
タリータウン・ホワイトプレインズロード  
555  
(74) 代理人 100081422  
弁理士 田中 光雄  
(74) 代理人 100084146  
弁理士 山崎 宏  
(74) 代理人 100122301  
弁理士 富田 憲史  
(74) 代理人 100127638  
弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血友病の治療方法

## (57) 【要約】

治療を必要とする患者に、1以上の生体適合性ポリマーに1以上のアミノ酸部位で共有結合した凝固因子またはそのムテインの有効量を皮下または皮内投与することを含む、血友病の治療方法。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

治療を必要とする患者に、1以上の生体適合性ポリマーに1以上のアミノ酸部位で共有結合した凝固因子またはそのムテインの有効量を皮下または皮内投与することを含む、血友病の治疗方法。

**【請求項 2】**

生体適合性ポリマーがポリアルキレンオキシド、デキストラン、コロミン酸、炭水化物ベースのポリマー、アミノ酸のポリマー、ビオチン誘導体、ポリビニルアルコール、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-リンゴ酸無水物、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ヘパリン、アルブミン、セルロース、キトサンの加水分解物、デンプン、グリコーゲン、アガロースおよびその誘導体、ゲーガム、フルラン、イヌリン、キサンタンガム、カラギナン、ペクチン、およびアルギン酸加水分解物から選択される、請求項1記載の方法。10

**【請求項 3】**

ポリアルキレンオキシドがポリエチレングリコールを含む、請求項2記載の方法。

**【請求項 4】**

ポリエチレングリコールがメトキシポリエチレングリコールを含む、請求項3記載の方法。

**【請求項 5】**

メトキシポリエチレングリコールが5kDa～150kDaのサイズ範囲を有する、請求項3記載の方法。20

**【請求項 6】**

デンプンがヒドロキシエチルデンプンおよびヒドロキシプロピルデンプンを含む、請求項2記載の方法。

**【請求項 7】**

生体適合性ポリマーが凝固因子またはそのムテイン上の所定の部位に共有結合している、請求項1記載の方法。

**【請求項 8】**

凝固因子がFVII、FVIII、およびFIX、およびそのムテインから選択される、請求項1記載の方法。30

**【請求項 9】**

生体適合性ポリマーが81、129、377、378、468、487、491、504、556、570、711、1648、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911、2091、2118および2284から選択される1以上のアミノ酸部位にてFVIIに共有結合している、請求項8記載の方法。

**【請求項 10】**

生体適合性ポリマー結合のための1以上の部位が、部位特異的システイン変異によって置換されている、請求項9記載の方法。

**【請求項 11】**

FVIIがBドメイン欠失型FVIIである、請求項8記載の方法。40

**【請求項 12】**

Bドメイン欠失型FVIIが81、129、377、378、468、487、491、504、556、570、711、1648、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911、2091、2118および2284から選択される1以上のアミノ酸置換を含む、請求項11記載の方法。

**【請求項 13】**

生体適合性ポリマーが1以上のアミノ酸部位置換にてBドメイン欠失型FVIIに共有結合している、請求項12記載の方法。

**【請求項 14】**

10

20

30

40

50

凝固因子またはそのムテインが予防的に投与される、請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2008年11月3日に出願された米国仮出願第61/110,809号の利益を請求し、その内容は、出典明示により全体として本明細書の一部とされる。

【0002】

発明の分野

本発明は、血友病の治療方法に向けられる。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

血友病Aは、男性5,000人あたり1人の推定発病率を有する最も一般的な遺伝的凝固障害である。それは、血液凝固の内在性経路の成分であるVII因子(FVII)の欠失または構造的欠陥によって引き起こされる。ヒトFVIIは、組み換え生産されており、血友病Aの置換療法として効果的であることが示された。

【0004】

血友病Aの現行の治療は、FVIIの静脈内注射または点滴を必要とする。患者は、出血が起きたときに(「オンデマンド治療」)、または週に数回投与される予防的治療として、処置されうる。例えば、予防的処置の場合、FVIIを週に3回投与してもよい。さらに、投与のために、静脈アクセス装置を外科的に埋め込んでもよい。しかしながら、これらの装置には、感染が問題となることがある。したがって、これらの煩わしい投与様式は、患者のコンプライアンスに大きな障壁を生じる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、患者のコンプライアンスを促進するために、別の投与様式を開発する必要性がある。本発明は、かかる治療方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

発明の概要

本発明は、1以上の生体適合性ポリマーに1以上のアミノ酸部位で共有結合した凝固因子またはそのムテインの有効量を皮下投与することを含む、血友病の治療方法に向けられる。凝固因子の例は、限定するものではないが、FVII、VII因子(FVII)、またはIX因子(FIX)を包含する。1以上の生体適合性ポリマーは、無作為な部位に結合されていてもよく、または部位特異的であってもよい。

【0007】

一の具体例において、生体適合性ポリマーは、ポリアルキレンオキシド、デキストラン、コロミン酸、炭水化物ベースのポリマー、アミノ酸のポリマー、ビオチン誘導体、ポリビニルアルコール、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリエチレン・コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン・コ-リンゴ酸無水物、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ヘパリン、アルブミン、セルロース、キトサンの加水分解物、デンプン、グリコーゲン、アガロースおよびその誘導体、ゲーガム、ブルラン、イヌリン、キサンタンガム、カラギーナン、ペクチン、およびアルギン酸加水分解物から選択される。一例として、ポリアルキレンオキシドは、ポリエチレングリコールであってもよい。さらに、ポリエチレングリコールは、5kDa～150kDaまたはその以上のサイズ範囲を有していてもよい。

【0008】

別の具体例において、生体適合性ポリマーは、ヒドロキシエチルデンプンまたはヒドロキシプロピルデンプンなどのデンプンである。一例として、ヒドロキシエチルデンプンの

10

20

30

40

50

サイズ範囲は、150kDa以上であってもよい。

【0009】

さらなる具体例において、生体適合性ポリマーは、凝固因子またはそのムテイン上の所定の部位に共有結合されている。例えば、生体適合性ポリマーは、81、129、377、378、468、487、491、504、556、570、711、1648、1795、1796、1797、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911、2091、2118および2284から選択されるFVIIIPolypeptideまたはFVIIIMutainの1以上のアミノ酸部位に共有結合していてもよい。

【0010】

一の具体例において、FVIIIMutainは、Bドメイン欠失型VIII因子である。  
別の具体例において、FVIIIMutainは、さらに、81、129、377、378、468、487、491、504、556、570、711、1648、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911、2091、2118および2284から選択される1以上のアミノ酸置換を含む。例えば、該アミノ酸置換は、システインである。

【0011】

別の具体例において、生体適合性ポリマーは、FVIIまたはFIX、またはそのムテイン上の無作為または所定の部位に共有結合している。

【0012】

別の具体例において、凝固因子またはムテインは、予防的に投与される。さらなる具体例において、凝固因子またはムテインは、最初の負荷投与量、次いで低い維持投与量で毎日投与される。別の具体例において、凝固因子またはムテインは、正常値の約1-2%のトラフ濃度を維持する投与量で投与される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】VIII因子を未処理のHemAマウスに皮内投与した。次いで、血漿FVII活性をコアテスト(Coatest)アッセイによって決定した。

【発明を実施するための形態】

【0014】

発明の記載

当然のことながら、本発明は、記載される特定の方法、プロトコール、細胞系統、動物種または属、構築物、および試薬に限定されず、それ自体、変更してもよい。また、当然のことながら、本明細書中で使用される用語は、特定の具体例を示すだけの目的であり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるであろう本発明の範囲を限定する意図はない。

【0015】

注目すべきは、本明細書および特許請求の範囲中で使用される場合、単数形「a」および「the」は、文脈が明らかに別の意味を示さない限り、複数形を包含する。かくして、例えば、「1つの剤」への言及は、1以上の剤への言及であり、当業者に知られたその等価物などを包含する。

【0016】

別記しない限り、本明細書中で使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野における通常の技術者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または等価のいずれの方法、装置および材料も、本発明の実施または試験に使用することができるが、好ましい方法、装置および材料をここに記載する。

【0017】

本明細書中に引用した全ての出版物および特許は、例えば、本発明と関連して使用されるかもしれない出版物中に記載の方法を記載および開示する目的で、出典明示により、本明細書の一部とされる。上記および本明細書中の出版物、本願の出願日より前の開示についてのみ提供する。本明細書中には、先行発明によって、発明者らがかかる開示に先立つ

10

20

30

40

50

権利をもたないという承認として解釈されるべきものはない。

【0018】

血友病Aの予防的治療は、そのイン・ビボでの半減期（8 - 12時間）によって必要とされるFVIIの頻繁な静脈内注射または点滴を必要とする。大容量の頻繁な静脈内注射は不都合であり、幼児への投与が困難であり、しばしば、静脈カテーテル関連の感染をもたらす。

【0019】

皮下投与は、代わりの投与様式を提供し、まだ応じられていない医学的要望を提供する。しかしながら、ヒトにおける治療としての皮下注射FVIIは、主としてその非常に低いバイオアベイラビリティ（<5%）のため、現在、実行可能ではない。低いバイオアベイラビリティは、高投与量を必要とし、経済的に禁止される。さらに、注射量の限界は、高度濃縮処方を必要とし、それは技術的に挑戦中である。

10

【0020】

本明細書中に記載のように、FVIIのPEG化は、血友病Aマウスモデルにおいて、皮内投与されたFVIIのバイオアベイラビリティを有意に改善した。マウスにおける皮内投与は、ヒトにおける皮下注射に類似する。

20

【0021】

本発明は、1以上の生体適合性ポリマーに1以上のアミノ酸部位で共有結合したFVIIまたはそのムテインがイン・ビボでの機能的に活性なFVIIの改善された回収を達成することを明らかにする。

20

【0022】

本発明は、1以上の生体適合性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、ポリシリアル酸(PSA)、他の親水性ポリマーに結合(conjugated)された凝固因子またはそのムテイン、または疎水性ポリマーと共に処方されたFVIIに向けられる。これらの複合体(conjugate)は、血友病Aの予防的治療のために皮下投与されうる。さらに、該複合体は、毎週皮下投与されてもよく、または最初の負荷投与量、次いで、正常値の約1-2%の一定の有効なトラフ濃度を維持するために少量の低い維持投与量で、毎日投与されてもよい。

30

【0023】

生体適合性ポリマーは、限定するものではないが、ポリアルキレンオキシド、例えば、限定するものではないが、ポリエチレングリコール(PEG)、メトキシポリエチレングリコール(mPEG)、デキストラン、コロミン酸または他の炭水化物ベースのポリマー、アミノ酸のポリマー、ビオチン誘導体、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロドン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-リンゴ酸無水物、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ヘパリン、アルブミン、セルロース、キトサンの加水分解物、デンプン、例えば、ヒドロキシエチル-デンプンおよびヒドロキシプロピル-デンプン、グリコーゲン、アガロースおよびその誘導体、ゲーガム、フルラン、イヌリン、キサンタンガム、カラギーナン、ペクチン、アルギン酸加水分解物、他のバイオポリマーおよびそのいずれかの等価物を包含する。他の有用なポリアルキレングリコール化合物は、ポリブロピレングリコール(PPG)、ポリブチレングリコール(PBG)、PEG-グリシジルエーテル(Epoxy-PEG)、PEG-オキシカルボニルイミダゾール(CDI-PEG)、分岐鎖ポリエチレングリコール、直鎖ポリエチレングリコール、三分岐鎖ポリエチレングリコールおよびマルチアームまたは「超分岐鎖」ポリエチレングリコール(star-PEG)である。

40

【0024】

「PEG」および「ポリエチレングリコール」は、本明細書で使用される場合、交換可能であり、いずれの水溶性ポリ(エチレンオキシド)も包含する。典型的には、本発明にしたがって使用されるためのPEGは、以下の構造「- - (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - -」(ここに、(n)は2~4000である)を含む。本明細書で使用される場合、PEGは、また、末端の酸素が置き換わっているか、いかによつて、「- - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> -

50

- O ( C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> O )<sub>n</sub> - - C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> - - および ' - - ( O C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> O - - を包含する。本明細書および特許請求の範囲を通して、「PEG」なる語は、種々の末端または「末端キャッピング」基、例えば、限定するものではないが、ヒドロキシルまたは C<sub>1</sub> - C<sub>20</sub> アルコキシ基を有する構造を包含することを忘れてはならない。「PEG」なる語は、また、大量の、すなわち、50%を超える - O C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> - 繰り返しサブユニットを含有するポリマーを意味する。特定の形態に関して、PEGは、種々の分子量のいくらでも、ならびに分岐鎖、直鎖、三分岐鎖および多官能性などの構造または形状を取ることができる。

## 【0025】

PEG化は、長鎖ポリエチレングリコール(PEG)分子のタンパク質または他の分子への共有結合である。PEGは、直鎖形態または分岐鎖形態であってもよい。さらに、PEG化は、ランダム(例えば、N末端およびリジンのような第一級アミンを標的化する)であってもよく、または部位特異的(例えば、特定のアミノ酸を標的化する)であってもよい。

10

## 【0026】

例えば、本発明の一の具体例において、生体適合性ポリマー(例えば、PEG)は、1以上のアミノ酸位置にて、例えば、限定するものではないが、81、129、377、378、468、487、491、504、556、570、711、1648、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911、2091、2118および2284にて、FVIIに共有結合する。

20

## 【0027】

凝固因子の例は、限定するものではないが、FVII、FVIIA、FIX、およびそのムテインを包含する。

## 【0028】

VII因子は、ヒト全長FVII分子を包含する。FVIIのムテインは、例えば、限定するものではないが、Bドメイン欠失型FVII(BDD)、機能的に活性なFVIIフラグメント、および位置81、129、377、378、468、487、491、504、556、570、711、1648、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911、2091、2118および2284にて1以上のアミノ酸置換を含むFVII分子またはそのフラグメントを包含する。一例として、アミノ酸置換は、1以上の位置81、129、377、378、468、487、491、504、556、570、711、1648、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911、2091、2118および2284にてシステインを包含しうる。

30

## 【0029】

付加的なFVIIムテインおよびかかるムテインの製造方法の例は、米国特許出願公報第2006/0115876号(本明細書の一部とされる)に記載される。

## 【0030】

FVIIの例は、ヒト全長FVII分子ならびにWO 99/20767、WO 00/66753、WO 01/58935、WO 03/093465、WO 04/029091、WO 04/083361、およびWO 04/111242に記載されるFVIIのムテインを包含する。

40

## 【0031】

FIXの例は、ヒト全長FIX分子ならびに米国特許第6,531,298号、米国特許出願第PCT/US09/40691号および米国特許出願第PCT/US09/40813号に記載のFIXのムテインを包含する。

## 【0032】

ムテインの生産

ムテインは、タンパク質またはポリペプチドに対して研究室で誘導された変異の結果として生じる、遺伝子操作されたタンパク質である。

50

## 【0033】

アミノ酸配列改変は、種々の技術によって、例えば、対応する核酸配列を部位特異的変異誘発によって修飾することによって、達成されうる。部位特異的変異誘発技術は、当該分野で周知であり、例えば、Zollerら(DNA 3:479-488, 1984)またはHorttonら(Gene 77:61-68, 1989, pp. 61-68)に記載される。例えば、保存的置換は、当該分野において、1のアミノ酸の類似の特性を有する別のアミノ酸での置換として認識され、例えば、アラニンのセリンへの変化またはアルギニンのリジンへの変化を包含する。かくして、FVIIIf、FVIIまたはFIXのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を用いて、選択した改変を導入しうる。同様に、特異的プライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応を用いるDNA構築物の調製方法が当業者に周知である(例えば、PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, USA参照)。

10

## 【0034】

ムテインをコードする核酸構築物は、また、確立された標準的方法、例えば、Beaucageら(Gene Amplif. Anal. 3:1-26, 1983)によって記載されるホスホラミダイト(phosphoramidite)法によって合成的に調製してもよい。ホスホラミダイト法によると、オリゴヌクレオチドを例えば、自動DNA合成器において合成し、精製し、アニールし、ライゲートし、適当なベクター中でクローン化する。ムテインをコードするDNA配列は、また、例えば、米国特許第4,683,202号またはSaikiら(Science 239:487-491, 1988)に記載されるように、特定のプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応によって調製してもよい。さらに、該核酸構築物は、標準的技術にしたがって、核酸構築物全体の種々の部分に対応する合成、ゲノムまたはcDNA起源のフラグメントを(適宜)ライゲートすることによって調製される混合型合成およびゲノム、混合型合成およびcDNA、または混合型ゲノムおよびcDNA起源であってもよい。

20

## 【0035】

ムテインをコードするDNA配列は、組み換えDNA手法を用いて組み換えベクター中に挿入してもよい。ベクターの選択は、しばしば、ベクターを導入すべき宿主細胞に依存するであろう。該ベクターは、自己複製ベクターであってもよく、または組み込みベクターであってもよい。自己複製ベクターは、染色体外エンティティ(entity)として存在し、その複製は、染色体複製から独立している、例えば、プラスミドである。組み込みベクターは、宿主細胞ゲノム中に組み込まれ、それが組み込まれた染色体と共に複製するベクターである。

30

## 【0036】

ベクターは、ムテインをコードしているDNA配列が、DNAの転写、翻訳またはプロセッシングに必要な付加的なセグメント、例えば、プロモーター、ターミネーター、およびポリアデニル化部位に作動可能に連結された発現ベクターであってもよい。一般に、発現ベクターは、プラスミドまたはウイルス性DNAから由来していてもよく、または両方のエレメントを含有していてもよい。「作動可能に連結された」なる語は、セグメントがそれらの意図される目的のために一齊に機能するように、例えば、転写がプロモーターで開始し、ポリペプチドをコードしているDNA配列によって進行するように、整列されることを示す。

40

## 【0037】

ムテインの発現において有用な発現ベクターは、クローン化遺伝子またはcDNAの転写を指示することのできるプロモーターを含んでいてもよい。該プロモーターは、選択した宿主細胞において転写活性を示すいずれのDNA配列であってもよく、宿主細胞に対して同種または異種のいずれかのタンパク質をコードしている遺伝子由来であってもよい。哺乳動物細胞においてムテインをコードしているDNAの転写を指示するのに適当なプロモーターの例は、例えば、SV40プロモーター(Subramaniら、Mol. Cell Biol. 1:854-864, 1981)、MT-I(メタロチオネイン

50

遺伝子) プロモーター (Palmiterら、Science 222: 809 - 814, 1983)、CMVプロモーター (Boshartら、Cell 41: 521 - 530, 1985)、骨髄増殖性肉腫ウイルス (MPSV) LTRプロモーター (Linら、Gene. 147: 287 - 92, 1994)、またはアデノウイルス2主要後期プロモーター (Kaufmannら、Mol. Cell. Biol. 2: 1304 - 1319, 1982) である。

## 【0038】

ムテインをコードしているDNAは、また、必要により、適当なターミネーター、例えば、ヒト成長ホルモンターミネーター (Palmiterら、Science 222: 809 - 814, 1983) またはTP1 (Alberら、J. Mol. Appl. Gen. 1: 419 - 434, 1982)、またはADH3 (McKnightら、EMBO J. 4: 2093 - 2099, 1985) ターミネーターに作動可能に連結していてもよい。発現ベクターは、また、挿入部位の下流に位置するポリアデニル化シグナルを含有していてもよい。ポリアデニル化シグナルは、SV40由来の初期または後期ポリアデニル化シグナル、アデノウイルス5E1b領域由来のポリアデニル化シグナル、ヒト成長ホルモン遺伝子ターミネーター (DeNotoら、Nucl. Acids Res. 9: 3719 - 3730, 1981)、またはヒトTF遺伝子もしくはヒトトロンボモジュリン遺伝子由来のポリアデニル化シグナルを包含する。発現ベクターは、また、エンハンサー配列、例えば、SV40エンハンサーを包含しうる。

## 【0039】

ムテインをコードするDNA配列、プロモーター、および所望によりターミネーターをライゲートし、それらを複製に必要な情報を含有する適当なベクター中に挿入するのに使用される手法は、当業者によく知られている (例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989参照)。

## 【0040】

哺乳動物細胞をトランスフェクトし、該細胞中に導入されたDNA配列を発現させる方法は、例えば、Kaufmannら (J. Mol. Biol. 159: 601 - 621, 1982)、Southernら (J. Mol. Appl. Genet. 1: 327 - 341, 1982)、Loyterら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 422 - 426, 1982)、Wiglerら (Cell 11: 14: 725 - 731, 1978)、Corsaroら (Somatic Cell Genetics 7: 603 - 616, 1981)、Grahamら (Virology 52: 456 - 467, 1973)、およびNeumannら (EMBO J. 1: 841 - 845, 1982) に記載される。クローニングDNA配列は、例えば、リポフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、マイクロインジェクション、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈澱、レトロウイルスデリバリー、エレクトロポレーション、ソノポレーション、レーザー放射、マグネットフェクション、自然形質転換、およびバイオリストイック (biolistic) 形質転換によって、培養哺乳動物細胞中に導入してもよい (例えば、Mehier-Humbertら、Adv.

Drug Deliv. Rev. 57: 733 - 753, 2005参照)。外来性DNAを発現する細胞を同定および選択するために、選択可能な表現型を付与する遺伝子 (選択マーカー) が一般的に、目的の遺伝子またはcDNAと共に細胞中に導入される。選択マーカーは、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ヒグロマイシンおよびメトトレキサートなどの薬剤に対する耐性を付与する遺伝子を包含する。選択マーカーは、増幅可能な選択マーカーであってもよく、配列が連結した場合にマーカーおよび外来性DNAの増幅が可能となる。例示的な増幅可能選択マーカーは、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) およびアデノシンデアミナーゼを包含する。適当な選択マーカーを選択することは、当業者の範囲内である (例えば、米国特許第5,238,820号参照)。

## 【0041】

10

20

30

40

50

細胞をDNAでトランスフェクトした後、それらを適当な生育培地中で生育させて、目的の遺伝子を発現させる。本明細書中で使用される場合、「適当な生育培地」なる語は、細胞の生育およびムテインの発現に必要な養分および他の成分を含有する培地を意味する。

#### 【0042】

培地は、一般的に、例えば、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、必須糖類、ビタミン、塩、リン脂質、タンパク質を含み、成長因子を提供してもよい。次いで、薬剤選択を適用して、選択マーカーを安定に発現する細胞の生育を選択する。増幅可能選択マーカーでトランスフェクトした細胞の場合、薬物濃度を増加させて、コピー数が増加し、それにより発現レベルが増加したクローン化配列について選択してもよい。次いで、安定にトランスフェクトした細胞のクローンをムテインの発現についてスクリーンする。

10

#### 【0043】

本発明において使用するための哺乳動物細胞系統の例は、COS-1 (ATCC CRL 1650)、ベビーハムスター腎 (BHK)、HKB11 (Choら、J. Biomed. Sci., 9: 631 - 638, 2002)、およびHEK-293 (ATCC CRL 1573; Grahamら、J. Gen. Virol. 36: 59 - 72, 1977) 細胞系統である。さらに、多くの多くの細胞系統を本発明内で使用してもよく、ラットHep I (ラット肝癌; ATCC CRL 1600)、ラットHep II (ラット肝癌; ATCC CRL 1548)、TCMK-1 (ATCC CCL 139)、Hep-G2 (ATCC HB 8065)、NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1)、CHO-K1 (ATCC CCL 61)、およびCHO-DUKX細胞 (Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 - 4220, 1980) を包含する。

20

#### 【0044】

ムテインは、細胞培養培地から回収してもよく、次いで、限定するものではないが、クロマトグラフィー (例えば、イオン交換、アフィニティー、疎水性、クロマト分画、およびサイズ排除)、電気泳動法 (例えば、分取等電点電気泳動 (IEF)、溶解度差 (例えば、硫酸アンモニウム沈澱))、抽出 (例えば、Protein Purification, Janson およびLars Ryden編、VCH Publishers, New York, 1989 参照)、またはその種々の組み合わせを包含する当該分野で既知の種々の手法によって精製してもよい。付加的な精製は、従来の化学的精製手段、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって達成されうる。他の精製法は、当該分野で知られており、ムテインの精製に応用してもよい (例えば、Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982 参照)。

30

#### 【0045】

一般的に、「精製された」なる語は、分画に付して種々の他の成分を除去し、実質的にその発現された生物学的活性を保持するタンパク質、ポリペプチド、またはペプチド組成物をいう。「実質的に精製された」なる語を使用する場合、該語は、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドが組成物の主要成分を形成する、例えば、組成物中のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、またはそれ以上を構成する組成物をいう。

40

#### 【0046】

タンパク質の精製の程度を定量するための種々の方法が当業者に知られている。これらは、例えば、活性フラクションの比活性の測定、またはSDS/PAGE分析によるフラクション内のポリペプチドの量の評価を包含する。フラクションの純度を評価するための例示的方法は、フラクションの比活性を算出し、最初の抽出物の比活性と比較し、かくして純度を計算すること (ここに、「~倍精製」によって評価される) である。活性量を表すために使用される実際の単位は、もちろん、特定のアッセイ技術に依存するであろう。

50

#### 【0047】

「相同性」なる語は、2つのタンパク質またはポリヌクレオチド配列間の類似度をいう。2つの配列間の一致は、当該分野で既知の技術によって決定されうる。例えば、相同性は、ポリヌクレオチドまたはタンパク質配列の配列情報の直接的比較によって決定されうる。通常、2つの配列が少なくとも75%の配列同一性、80%の配列同一性、85%の配列同一性、90%の配列同一性、または95%の配列同一性を示す場合、該配列は、相同でありうる。

#### 【0048】

2つのタンパク質配列または2つのポリヌクレオチド配列のパーセント相同性を決定するために、最適な比較目的で該配列を整列させる。例えば、他のタンパク質またはポリヌクレオチドとの最適なアラインメントのために、1のタンパク質またはポリヌクレオチドの配列にギャップを導入してもよい。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置にてアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。1の配列中の位置が他の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められている場合、該分子はその位置で相同である。本明細書中で使用される場合、アミノ酸または核酸「相同性」は、アミノ酸または核酸「同一性」と等価である。2つの配列間のパーセント相同性は、該配列によって共有される同一位置の数の関数であり、すなわち、パーセント相同性は、(同一位置の数 / 位置の全数) の100倍に等しい。

10

#### 【0049】

本発明は、また、低度の同一性を有するが、本発明のムテインによって実施される1以上の同じ機能を実施するのに十分な類似性を有するムテインを包含する。類似性は、保存されたアミノ酸置換によって決定される。かかる置換は、タンパク質中の所定のアミノ酸を同様の特徴を有する別のアミノ酸で置換するものである。典型的には、保存的置換として、脂肪族アミノ酸Ala、Val、Leu、およびIle間の互いの置き換え、ヒドロキシル残基SerおよびThrの相互交換、酸性残基AspおよびGluの交換、アミド残基AsnおよびGln間の置換、塩基性残基LysおよびArgの交換、および芳香族残基Phe、TrpおよびTyr間の置き換えが見られる。

20

#### 【0050】

特定のアミノ酸の一文字略記、その対応するアミノ酸、および三文字略記は下記の通りである。A、アラニン(Ala)；C、システイン(Cys)；D、アスパラギン酸(Asp)；E、グルタミン酸(Glu)；F、フェニルアラニン(Phe)；G、グリシン(Gly)；H、ヒスチジン(His)；I、イソロイシン(Ile)；K、リジン(Lys)；L、ロイシン(Leu)；M、メチオニン(Met)；N、アスパラギン(Asn)；P、プロリン(Pro)；Q、グルタミン(Gln)；R、アルギニン(Arg)；S、セリン(Ser)；T、スレオニン(Thr)；V、バリン(Val)；W、トリプトファン(Trp)；Y、チロシン(Tyr)；およびノルロイシン(Nle)。

30

#### 【0051】

同一性および類似性はどちらも、容易に算出することができる(Computational Molecular Biology, Lesk, A. M. 編, Oxford University Press, New York, 1988；Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. 編, Academic Press, New York, 1993；Computer Analysis of sequence Data, Part 1, Griffin, A. M. およびGriffin, H. G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994；Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heijne, G., Academic Press, 1987；およびSequence Analysis Primer, Gribskov, M. およびDevereux, J. 編, M. Stockton Press, New York, 1991)。2つの配列間の同一性および類似性を決定するためのコンピュータープログラム法は、限定するものではないが、GCG プログラムパッケージ(De

40

50

verouxら、Nucleic Acids Res. 12:387, 1984)、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschulら、J. Molec. Biol. 215:403, 1990)を包含する。

#### 【0052】

ムテインは、1以上の置換、欠失、挿入、逆転、融合、および末端切断またはこれらのいずれかの組み合わせによって、アミノ酸配列において相違することができる。さらに、変異は、ムテインに組み込まれたペプチドタグまたはペプチド発現タグを提供しうる。ペプチドタグは、FLAGタグ、c-mycタグ、E-タグ、6xHisタグ、または類似のペプチドタグであることができる。ペプチドタグは、ムテインのN末端、C末端または他の場所に生じてもよい。ペプチドタグは、イン・ビボおよびイン・ビトロの両方で、ムテインの検出、精製、または同定に有用である。ペプチドタグ配列が通常、最終薬物物質の調製または発現において使用される配列から除去されるであろうことは、一般的に、当業者によって理解されるであろう。

10

#### 【0053】

##### 使用方法

本明細書中で使用される場合、種々の用語は下記に定義される。

#### 【0054】

「治療」なる語は、ヒトを包含する対象（または患者）に、対象の状態を直接または間接的に改善するか、または対象における病態または障害の進行を遅延させる目的で、医学的援助を提供するいずれかのプロセス、アクション、適用、療法などを包含する。

20

#### 【0055】

「治療上有効量」なる語は、疾患、病態、および／または障害の重篤度の改善という目標を達成する一方で、所定の治療処置に関連する副作用を回避するか、または最小限にする薬剤の投与量を意味する。

#### 【0056】

「医薬上許容される」なる語は、対象アイテムが医薬品における使用に適当であることを意味する。

#### 【0057】

したがって、本発明の具体例は、結合（conjugated）したFVIII、FVII、FIXまたはそのムテインの量を含有する組成物を患者に皮下投与することを含む、患者において血友病を治療する方法を包含する。

30

#### 【0058】

「組み合わせ療法」または「連携療法」なる語は、疾患、病態、および／または障害を治療するための2以上の治療剤の投与を意味する。かかる投与は、実質的に同時に2以上の治療剤を共に投与すること、または各治療剤を連続的に投与することを包含する。

#### 【0059】

組み合わせ療法は、結合したFVIII、FVII、FIXまたはそのムテインおよび1以上の付加的な治療剤を含有する単一の医薬投与処方の投与、ならびに結合したFVII、FVII、FIXまたはそのムテインおよび各々の付加的な治療剤の別々の医薬投与処方における投与を包含する。例えば、結合したFVIII、FVII、FIXまたはそのムテインおよび治療剤を单一投与組成物において一緒に患者に投与してもよく、または各剤を別々の投与処方で投与してもよい。

40

#### 【0060】

別々の投与処方を用いる場合、結合したFVIII、FVII、FIXまたはそのムテインおよび1以上の付加的な治療剤は、実質的に同時に（例えば、同時に）または時間差で別々に（例えば、連続的に）投与してもよい。

#### 【0061】

##### 医薬組成物

本明細書中に記載される結合したFVIII、FVII、FIXまたはそのムテインは、医薬上許容される担体を含む医薬組成物において提供されうる。医薬上許容される担体

50

は、非発熱性であってもよい。該組成物は、単独で投与されてもよく、または少なくとも1つの他の剤、例えば、安定化化合物と共に投与されてもよく、限定するものではないが、セーライン、緩衝化セーライン、デキストロースおよび水を包含するいずれかの滅菌の生体適合性医薬担体中において投与されうる。種々の水性担体を用いてもよく、限定するものではないが、セーライン、グリシンなどを包含する。これらの溶液は、滅菌性であり、一般的に、特定の物質を含有しない。これらの溶液は、通常のよく知られた滅菌技術（例えば、ろ過）によって滅菌されうる。該組成物は、生理学的条件に近付けるように医薬上許容される補助物質、例えば、pH調整剤および緩衝化剤などを含有していてもよい。かかる医薬処方中における結合したFVIIIf、FVII、FIXまたはそのムテインの濃度は、幅広く変更してもよく、特定の投与様式に応じて、主に液量、粘度などに基づいて選択されうる。

10

#### 【0062】

該組成物は、単独で患者に投与してもよく、または他の剤、薬物もしくはホルモンと組み合わせて投与してもよい。これらの医薬組成物は、活性成分のほかに、医薬上使用されうる調製物への活性化合物の加工を容易にする賦形剤および補助剤を含む適当な医薬上許容される担体を含有しうる。本発明の医薬組成物は、皮下手段によって投与してもよい。

#### 【0063】

皮下、静脈内、筋内などに適当な処方、適当な医薬担体、および製剤化および投与技術は、当該分野でよく知られた方法のいずれかによって調製されうる（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 20<sup>th</sup> edition, 2000参照）。

20

#### 【0064】

##### 治療上有効量の決定

治療上有効量の決定は、当業者の能力内で十分可能である。治療上有効量は、該治療上有効量の不在下で明らかな効力と比べて疾患（例えば、血友病）を有効に治療するために使用されうる剤の量をいう。

#### 【0065】

治療上有効量は、最初に動物モデル（例えば、ラット、マウス、ウサギ、イヌまたはブタ）において概算されうる。該動物モデルは、また、適当な濃度範囲および投与経路を決定するために使用されうる。次いで、かかる情報を用いて、ヒトにおける有用な量および投与経路を決定しうる。

30

#### 【0066】

正確な投与量は、治療を必要とする患者に関連する因子を考慮して、開業医によって決定されうる。投与量および投与は、剤の十分なレベルを提供するか、または所望の効果を維持するように調整されうる。考慮されうる因子は、病態の重篤度、対象の一般的健康状態、対象の年齢、体重および性別、食事、投与の時期および頻度、薬物の組み合わせ、反応感受性、および療法に対する耐性／応答を包含する。

#### 【0067】

本開示に引用される全ての特許および特許出願は、出典明示により明白に本明細書の一部とされる。上記開示は、概して本願発明を説明する。より完全な理解は、下記の特定の実施例を参照して得ることができるが、それらは、説明目的のためだけに提供されるのであって、本発明の範囲を限定することを意図しない。

40

#### 【実施例】

#### 【0068】

本発明がよりよく理解されるために、下記の実施例を示す。これらの実施例は、説明目的のためだけであって、如何なる方法においても、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書中に引用される全ての出版物は、出典明示により全体として本明細書の一部とされる。

#### 【0069】

50

### 実施例 1：皮内投与された F V I I I の活性の分析

未処理の血友病 A マウスに、13IU/マウスの r F V I I I 、14IU/マウスの P E G - リポソーム中に処方された r F V I I I ( F V I I I - L i p ) 、12IU/マウスの P E G 化 F V I I I ( P E G - F V I I I ) 、および 15IU/マウスの 1 : 2 モル比で v W F と予め混合した r F V I I I を皮内投与した。次いで、投与の 1 、 4 および 8 時間後に、動物を安楽死させ（1 時点につき 1 処理につき 3 匹のマウス）、血液試料を得た。次いで、血漿 F V I I I 活性をコアテスト (Coatest) アッセイによって測定した。結果を図 1 に示す。

#### 【 0 0 7 0 】

わずかに検出可能なレベルの血漿 F V I I I 活性を有し、かつ、調べられた 3 つの時点全てにおいて各投入投与量の約 0.1 - 0.4 % である r F V I I I 、 F V I I I - L i p 、および F V I I I / v W F 複合体と比較して、 P E G - F V I I I は、全ての時点で、投入投与量の 1 - 5 % 範囲の、平均で 10 倍高い回収率を達成した。 10

#### 【 図 1 】

1/1

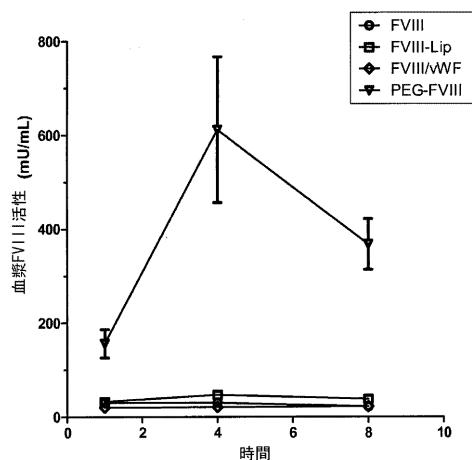


FIG. 1

## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |   | International application No.<br>PCT/US 09/63151 |
|--|---|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(8) - A61K 38/36; C07K 14/745 (2009.01)<br>USPC - 530/381, 530/383, 530/384, 514/12<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>USPC: 530/381, 530/383, 530/384, 514/12<br>IPC(8): A61K 38/36; C07K 14/745 (2009.01)   |   |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>USPC: 514/2, 435/69.1, 320.1, 325   |   |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>Electronic Databases Searched: PubWEST DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; PLUR=NO; OP=ADJ, Google Scholar, Google Patent<br>Search Terms Used: coagulation factor, polyalkylene, methoxypolyethylene, FVIII, b-domain  |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.                            |
| X  | US 20060115876 A1 (Pan et al.) 1 June 2006 (01.06.2006) entire document, esp: abstract, paras [0002], [0005], [0019], [0023], [0062], [0066], [0076], [0088], [0089], [0090], [0093], [0100]. | 1-14   |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>   |   |  |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed |   |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>09 Decemebr 2009 (09.12.2009)   | Date of mailing of the international search report<br><b>15 DEC 2009</b>  |  |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-3201  | Authorized officer:<br>Lee W. Young<br>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br>PCT OSP: 571-272-7774  |  |

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.  | F I       | テーマコード(参考)     |
|---------------|-----------|----------------|
| A 6 1 K 47/32 | (2006.01) | A 6 1 K 47/32  |
| A 6 1 K 47/38 | (2006.01) | A 6 1 K 47/38  |
| A 6 1 K 38/43 | (2006.01) | A 6 1 K 37/465 |

(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,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,S,K,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,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,I,S,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,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 ハイян・ジアン

アメリカ合衆国 0 2 4 7 8 マサチューセッツ州ベルモント、ベイベリー・レイン 3 番

(72) 発明者 トンヤオ・リュー

アメリカ合衆国 9 4 5 0 2 カリフォルニア州アラメダ、シー・ブリッジ・ウェイ 5 2 番

(72) 発明者 チャン・シン

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州サンディエゴ、カミニト・ラピス 4 7 3 9 番

F ターム(参考) 4C076 AA11 BB11 BB16 CC14 EE03 EE06 EE09 EE16 EE23 EE24

EE30 EE31 EE36 EE37 EE38 EE41 EE48 EE59 FF32 FF63

FF68

4C084 AA01 BA44 CA62 DC10 DC14 DC15 DC16 MA05 MA66 NA06

NA10 NA12 NA13 NA14 ZA531