

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6072810号
(P6072810)

(45) 発行日 平成29年2月1日(2017.2.1)

(24) 登録日 平成29年1月13日(2017.1.13)

(51) Int.Cl.

F 1

A61K 38/43 (2006.01)

A61K 37/465 Z N A

A61K 31/727 (2006.01)

A61K 31/727

A61P 7/04 (2006.01)

A61P 7/04

請求項の数 11 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2014-536225 (P2014-536225)
 (86) (22) 出願日 平成24年10月18日 (2012.10.18)
 (65) 公表番号 特表2014-530246 (P2014-530246A)
 (43) 公表日 平成26年11月17日 (2014.11.17)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2012/070615
 (87) 國際公開番号 WO2013/057167
 (87) 國際公開日 平成25年4月25日 (2013.4.25)
 審査請求日 平成27年10月5日 (2015.10.5)
 (31) 優先権主張番号 11185648.0
 (32) 優先日 平成23年10月18日 (2011.10.18)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/548,606
 (32) 優先日 平成23年10月18日 (2011.10.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 597070264
 ツェー・エス・エル・ベーリング・ゲー・
 エム・ベー・ハー
 ドイツ連邦共和国D-35041 マルブル
 ルク、エミル フォン ベーリング シュ
 トラーセ 76
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 フーベルト・メッツナー
 ドイツ連邦共和国35041マルブルク、
 イムボーデン6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】第VIII因子の生物学的利用能を改善するための硫酸化グリコサミノグリカンの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

未分画ヘパリンと組み合わせて使用するための、出血障害の処置または防止用の医薬製剤であって、

該医薬製剤は、第VIII因子を含み、

該処置または防止は、第VIII因子および未分画ヘパリンの非静脈内注射を含み、

ここで、第VIII因子は、約50IU/kg体重から約800IU/kg体重の用量で投与され、

ここで未分画ヘパリンは、適用製品1mLあたり約0.001~約100mgの用量で投与され、そして

ここで、第VIII因子および未分画ヘパリンの投与の用量は、処置対象における第VIII因子の血漿レベルを、投与後1時間から投与後48時間の期間にわたって、健常対象者における第VIII因子の正常血漿レベルの2%超に維持するため十分な用量である、

上記医薬製剤。

【請求項2】

第VIII因子および未分画ヘパリンは、同時に投与される、請求項1に記載の医薬製剤。

【請求項3】

第VIII因子および未分画ヘパリンは、個別に投与される、請求項1に記載の医薬製剤。

剤。

【請求項 4】

第VIII因子は、フォン・ウィルブランド因子と結合している、請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【請求項 5】

処置対象は、ヒト個体であり、1回の投与の用量が500IU/kg体重未満である、請求項1～4のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【請求項 6】

非静脈内注射は、皮下、経皮、または筋肉内注射である、請求項1～5のいずれか1項に記載の医薬製剤。

10

【請求項 7】

出血障害の処置または防止における第VIII因子の生物学的利用能を増加させるための方法において使用するための医薬製剤であって、

該医薬製剤は、未分画ヘパリンを含み、

該方法は、

第VIII因子を含む第1の医薬組成物を非静脈内経路で投与すること、ここで第VIII因子は、約50IU/kg体重から約800IU/kg体重の用量で投与される、および

未分画ヘパリンを含む第2の医薬組成物を非静脈内経路で投与すること、ここで未分画ヘパリンは、適用製品1mLあたり約0.001～約100mgの用量で投与される、を含み、

20

ここで、第1の医薬組成物および第2の医薬組成物は、第2の医薬組成物なしに第VIII因子を投与したときの生物学的利用能に対して、第VIII因子の生物学的利用能の少なくとも約20%の増加をもたらす用量で投与され、そして

ここで、該未分画ヘパリンおよび該第VIII因子は、皮下、経皮、または筋肉内注射により投与される、

上記医薬製剤。

【請求項 8】

出血障害は、血友病Aである、請求項7に記載の医薬製剤。

【請求項 9】

第VIII因子および未分画ヘパリンは、同時に投与される、請求項7または8に記載の医薬製剤。

30

【請求項 10】

第VIII因子および未分画ヘパリンは、個別に投与される、請求項7～9のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【請求項 11】

第VIII因子および未分画ヘパリンを含む、出血障害の治療または予防のための医薬キットであって、

ここで、第VIII因子および未分画ヘパリンは、非静脈内注射され、

ここで、第VIII因子は、約50IU/kg体重から約800IU/kg体重の用量で投与され、

40

ここで、未分画ヘパリンは、適用製品1mLあたり約0.001～約100mgの用量で投与され、

ここで、第VIII因子および未分画ヘパリンの投与の用量は、処置対象における第VIII因子の血漿レベルを、投与後1時間から投与後48時間の期間にわたって、健常対象者における第VIII因子の正常血漿レベルの2%超に維持するために十分な用量である、上記医薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、非静脈内投与における第VII因子の生物学的利用能を増加させるための、少なくとも1つの第VII因子および硫酸化グリコサミノグリカンを含む医薬製剤に関する。さらに、本発明は、出血障害の処置および防止(p re v e n t i o n)のための、第VII因子および硫酸化グリコサミノグリカンの組合せ使用であって、これにより第VII因子の生物学的利用能を向上させる使用に関する。また、本発明は、硫酸化グリコサミノグリカンを共投与することによる、非静脈内投与後の第VII因子の生物学的利用能を増加させる方法に関する。

【背景技術】

【0002】

第VII因子(F VII)

10

F VIIは、約280kDa分子質量の血漿糖タンパク質であり、哺乳動物の肝臓で産生される。F VIIは、血液凝固を導く凝固反応カスケードの重要な因子である。このカスケードにある一過程で、第IXa因子(F IXa)が、活性化第VII因子(F VIIa)と共に、第X因子(F X)を活性化形態(F Xa)に変換させる。F VIIaは、この過程で補因子として作用し、カルシウムイオンおよびリン脂質と共にあることを要件として、F IXaの活性を最大化させる。最も一般的な血友病性障害は、機能的F VIIの不足に起因するもので、血友病Aと呼ばれる。

【0003】

血友病Aの処置の重大な進展は、ヒトF VIIの2351個の全アミノ酸配列をコードするcDNAクローニングが単離されたこと(特許文献1)、ならびにヒトF VII遺伝子DNA配列およびその組換えによる製造方法が提供されたことである。

20

【0004】

クローニングされたcDNAから決定されるヒトF VIIの推定一次アミノ酸配列の解析により、ヒトF VIIが、より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が示される。このヘテロダイマーは、約80kDaのC-末端軽鎖が、金属イオン依存的に約200kDaのN-末端重鎖と結合して構成される(非特許文献1を参照)。このヘテロダイマーの生理学的活性化は、トロンビンによってタンパク質鎖がタンパク分解切断されることによって生じる。トロンビンは、重鎖を90kDaタンパク質へ、次いで54kDaおよび44kDa断片へと切断する。またトロンビンは、80kDaの軽鎖を72kDaのタンパク質へと切断する。後者のタンパク質と2つの重鎖断片(上記の54kDaおよび44kDa)がカルシウムイオンと一緒にになって、活性なF VIIを構成する。不活性化は、44kDaのA2重鎖断片が分子から解離するとき、または72kDaおよび54kDaのドメインがトロンビン、活性化タンパク質CもしくはFXaによってさらに切断されるときに生じる。血漿において、F VIIは、50倍モル過剰のフォン・ウィルブランド因子(「VWF」)タンパク質と結合することによって安定化されるが、これは上記のようなF VIIのタンパク分解的破壊が阻害されているようである。

30

【0005】

F VIIのアミノ酸配列は、330アミノ酸の三重化Aドメイン、980アミノ酸の単一Bドメイン、および150アミノ酸の二重化Cドメインの3つの構造ドメインで構成されている。Bドメインは、他のタンパク質とホモロジーを有しておらず、このタンパク質の25個の潜在的なアスパラギン(N)-結合糖鎖付加部位のうちの18個を提供する。Bドメインは、凝固の機能は有していないようであり、欠失していてもよく、B-ドメインが欠失しているF VII分子は、依然として凝固促進活性を有している。

40

【0006】

フォン・ウィルブランド因子(VWF)

VWFは、哺乳類の血漿中に存在する多量体接着糖タンパク質であり、複数の生理学的機能を有している。一次的な止血の期間において、VWFは、血小板表面の特定の受容体と、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの構成成分との間の媒介物質として作用する。さらに、VWFは、凝固促進因子F VIIに対するキャリアおよび安定化タンパク質と

50

して機能する。VWFは、内皮細胞と巨核細胞において、2813個のアミノ酸の前駆体分子として合成される。この前駆体ポリペプチドであるプレプロVWFは、22残基のシグナルペプチドと、741残基のプロペプチドと、成熟血漿VWFにおいて見出される2050残基のポリペプチドとからなる（非特許文献2）。血漿へ分泌されると、VWFは、種々の分子サイズの様々な種類の形態で循環する。これらのVWF分子は、2050アミノ酸残基の成熟サブユニットのオリゴマーおよびマルチマーからなる。VWFは通常、1つの二量体として、最大では50～100の二量体からなる多量体として、血漿中に見出され得る（非特許文献3）。ヒト循環血中のヒトVWFのインビポ半減期は、およそ12時間である。

【0007】

10

ヒトで最もよく見られる遺伝性出血障害は、フォン・ウィルブランド病（「VWD」）である。出血症状の重症度に応じて、VWDは、一般にヒト血漿由来のVWFを含有する濃縮物を用いる補充療法（replacement therapy）によって処置され得るが、組換えVWFも開発途上である。VWFは、例えば、特許文献2に記載されているように、ヒト血漿から調製することができる。特許文献3には、組換えVWFを単離するための方法が記載されている。

【0008】

VWFは、インビポでFVIIIを安定化し、これによりFVIIIの血漿レベルの制御に重要な役割を果たすことが知られており、結果的に、一次および二次止血を調節する中心的因子となっている。VWFを含有する医薬製剤をVWD患者に静脈内投与した後、24時間で、内因性FVIII:Cが、1mlあたり1から3単位へ増加することが認められ得ることも知られており、FVIIIに対するVWFのインビポでの安定化効果が示される。

20

【0009】

患者は、一般的に、有効成分の特定の作用様式から利益を得るが、現在、商業的に利用可能な第VIII因子調製物は全て静脈内投与によって投与され、この静脈内投与は、注射部位での感染リスクがあり、一般に、患者が、特に凝固系に欠陥のある小児の処置においては、回避したい手法である。

【0010】

30

今日まで、血友病AとVWDの標準的な処置には、FVIIIの調製物およびVWF濃縮物の頻繁な静脈内注入が含まれている。血友病Bの処置では、第IX因子を2週間に1度投与することを必要とし、FVIIaを用いるインヒビター保有患者の処置においては、出血を阻害するために、1週間あたり複数回のFVIIa投与が使用される。

【0011】

しかしながら、これらの補充療法は、一般に有効であるものの、例えば、予防的処置を受けている重症の血友病A患者においては、第VIII因子の半減期が約12時間と短いために、1週間に約3回、第VIII因子を静脈内投与（i.v.）しなければならない。これまでに、FVIIIレベルを0.01U/mlまで上昇させることに対応する正常ヒト血漿の1%を超えるFVIIIレベルを達成することにより、重度の血友病Aが中程度の血友病Aに転じている。予防療法においては、FVIII活性のトラフレベルが、非血友病におけるFVIII活性レベルの2～3%未満に低下しないように投与レジメンが設定されている。

40

【0012】

静脈内投与による第VIII因子の投与は重荷であり、痛みがあり、特にこの投与のほとんどが患者自身または血友病Aと診断された子供の親によって家庭で処置されていることから感染のリスクを伴う。さらに、頻繁な静脈内注射は、必然的に瘢痕形成をもたらし、将来的に輸注の妨げとなる。重度の血友病の予防的処置は、生涯のうちの早期に開始されることが多く、2歳未満の子供であることも少なくない。そのような小さい患者の静脈にFVIIIを週に3回注射することは、より一層困難である。限られた期間においては、ポートシステムの埋め込みが選択肢となり得る。しかしながら、この場合、感染が繰り

50

返して生じる可能性があり、ポートが身体活動に不具合を引き起こすこともある。

【0013】

したがって、第VIII因子の静脈内への輸注の必要性を回避することが、医学的に大きく要求されている。

【0014】

第VIII因子に対して、例えば、特許文献4および特許文献5に記載されるように、皮下投与が提唱されている。しかしながら、許容可能な生物学的利用能を達成するためには、非常に高用量の第VIII因子を投与しなければならない。

【0015】

非静脈内投与における生物学的利用能を改善するための別の手法としては、アルブミン融合第VIII因子も使用されている（特許文献6）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0016】

【特許文献1】米国特許第4,757,006号

【特許文献2】EP0503991

【特許文献3】EP0784632

【特許文献4】WO95/01804A1

【特許文献5】WO95/026750

【特許文献6】WO2011/020866A2

10

【非特許文献】

【0017】

【非特許文献1】Kaufman, Transfusion Med. Revs. 6:235 (1992)

【非特許文献2】Fischer et al., FEBS Lett. 351:345-348, 1994

【非特許文献3】Ruggeri et al. Thromb. Haemost. 82: 576-584, 1999

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0018】

第VIII因子の非静脈内投与における生物学的利用能の改善に対する強い要望がある。

【課題を解決するための手段】

【0019】

本出願の発明者は、驚くべきことに、第VIII因子の生物学的利用能が、硫酸化グリコサミノグリカンと共に投与する場合に、大幅に増加することを見出した。

【0020】

第1の態様において、本発明は、出血障害の処置または防止に使用するための第VIII因子であって、該処置または防止は、第VIII因子および硫酸化グリコサミノグリカンの非静脈内注射を含む、上記第VIII因子に関する。

40

【0021】

さらなる態様において、本発明は、出血障害の処置または防止に使用するための第VIII因子であって、該処置または防止は、第VIII因子および硫酸化グリコサミノグリカンの非静脈内注射を含み、該第VIII因子を50IU/kg体重～1000IU/kg体重の用量で皮下投与したとき、処置対象における第VIII因子の血漿レベルは、注射後2時間～注射後48時間の期間にわたって、持続的に、健常対象における第VIII因子の正常血漿レベルの2%超である、上記第VIII因子に関する。

【0022】

この態様の好ましい実施形態は、ヒト個体における血友病Aの処置または予防（p r o

50

phytalexins)に使用するための第VIII因子であって、該処置または予防は、第VIII因子および硫酸化グリコサミノグリカンの皮下、皮内、または筋肉内注射を含み、該第VIII因子を50IU/kg体重～1,000IU/kg体重の用量で皮下投与したとき、ヒト個体における第VIII因子の血漿レベルは、注射後2時間～注射後48時間の期間にわたって、持続的に、健常対象における第VIII因子の正常血漿レベルの2%超である、上記第VIII因子に関する。

【0023】

本発明の別の態様は、ヒト個体における出血障害の処置または予防に使用するための第VIII因子であって、該処置または予防は、第VIII因子および硫酸化グリコサミノグリカンの皮下、経皮、または筋肉内注射による投与を含み、ヒト個体における第VIII因子の生物学的利用能は、硫酸化グリコサミノグリカンを伴わないこと以外は同様の方法で投与された第VIII因子の生物学的利用能より、少なくとも20%超である、上記第VIII因子に関する。

【0024】

この態様の好ましい実施形態は、ヒト個体における血友病Aの処置または予防に使用するための第VIII因子であって、該処置または予防は、第VIII因子および硫酸化グリコサミノグリカンの皮下、皮内、または筋肉内注射による投与を含み、ヒト個体における第VIII因子の生物学的利用能は、硫酸化グリコサミノグリカンを伴わないこと以外は同様の方法で投与された第VIII因子の生物学的利用能より、少なくとも20%超である、上記第VIII因子に関する。

【0025】

第3の態様において、本発明は、第VIII因子の生物学的利用能を改善するための硫酸化グリコサミノグリカンに関する。

【0026】

さらなる態様において、本発明は、第VIII因子の生物学的利用能を改善するための硫酸化グリコサミノグリカンであって、該硫酸化グリコサミノグリカンおよび該第VIII因子は、皮下、経皮、または筋肉内注射により投与される、上記硫酸化グリコサミノグリカンに関する。

【0027】

本発明のさらなる態様は、第VIII因子および硫酸化グリコサミノグリカンを含む、出血障害の治療または予防のための医薬キットである。

【0028】

本発明のさらなる態様は、出血障害の処置または防止方法であって、必要とする対象に治療的有効量の第VIII因子および硫酸化グリコサミノグリカンを投与して、第VIII因子の生物学的利用能を増加させることを含み、該投与は、皮下、経皮、または筋肉内注射を含む、上記方法である。

【0029】

本発明のさらなる態様は、第VIII因子の生物学的利用能を増加させるための方法であって、皮下、皮内、または筋肉内注射により、硫酸化グリコサミノグリカンが該第VIII因子と共に投与される、上記方法である。

【0030】

本発明の全ての態様において、第VIII因子は、好ましくはヒト第VIII因子である。好ましい硫酸化グリコサミノグリカンは、ヘパリンであり、最も好ましくは、ヘパリンは、未分画ヘパリンである。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、実施例1の結果を示す。FVIIIの生物学的利用能は、硫酸化グリコサミノグリカンを共投与する場合に増加している。図からわかるように、デキストラノ硫酸は、プラスの効果を有しない。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【0032】

本発明は、出血障害の処置および予防に関する。

【0033】

本明細書で使用するとき、用語「出血障害」には、家族性および後天性血友病Aが含まれる。

【0034】

本発明の第1の態様によれば、硫酸化グリコサミノグリカンの共投与を含む、第VIII因子の治療的非静脈内使用が提供される。

【0035】

第VIII因子は、野生型第VIII因子ポリペプチドであってもよく、変異を有し得る第VIII因子ポリペプチドであってもよい。糖鎖付加または他の翻訳後修飾の程度および位置は、選択された宿主細胞および宿主細胞環境の性質に応じて変動し得る。特定のアミノ酸配列に言及するとき、そのような配列の翻訳後修飾は、この出願に包含される。

【0036】

用語「第VIII因子」および「FVIII」は、本明細書で交換可能に使用される。「第VIII因子」は、野生型第VIII因子ならびに野生型第VIII因子の凝固促進活性を有する野生型第VIII因子の誘導体を含む。誘導体は、野生型第VIII因子のアミノ酸配列と比較して、欠失、挿入および/または付加を有する。用語第VIII因子は、重鎖および軽鎖を含む第VIII因子のタンパク分解的にプロセシングされた形態、例えば、活性化前の形態を含む。

【0037】

用語「第VIII因子」には、野生型第VIII因子の少なくとも10%、好ましくは少なくとも25%、より好ましくは少なくとも50%、最も好ましくは少なくとも75%の生物学的活性を有する第VIII因子バリアントまたは変異体が含まれる。第VIII因子の生物学的活性を決定するための適切な試験は、一段階もしくは二段階凝固アッセイ(Rizza et al. 1982. Coagulation assay of FVIII:C and FIXa in Bloom ed. The Hemophilias. NY Churchill Livingston 1992)または発色基質FVIII活性アッセイ(S. Rosen, 1984. Scand J Haematol 33: 139-145, suppl.)である。これらの参照文献の内容は参照によって本明細書に組み入れる。

【0038】

非限定的な例として、第VIII因子分子としては、APC切断を阻止または低減する第VIII因子変異体(Amano 1998. Thromb. Haemost. 79: 557-563)、アルブミン融合FVIII分子(WO2011/020866A2)、FVIII-Fc融合分子(WO04/101740A)、A2ドメインをさらに安定化する第VIII因子変異体(WO97/40145)、発現増加をもたらすFVIII変異体(Swaroop et al. 1997. JBC 272: 24121-24124)、免疫原性が低下している第VIII因子変異体(Lollar 1999. Thromb. Haemost. 82: 505-508)、別々に発現した重鎖および軽鎖で再構成されたFVIII(Oh et al. 1999. Exp. Mol. Med. 31: 95-100)、FVIII様HSPG(ヘパランスルフェートプロテオグリカン)および/またはLRP(低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質)の異化に導く受容体に対する結合が低下しているFVIII変異体(Ananyeva et al. 2001. TCM, 11: 251-257)、ジスルフィド結合安定化FVIIIバリアント(Gale et al., 2006. J. Thromb. Hemost. 4: 1315-1322)、改善された分泌特性を有するFVIII変異体(Miao et al., 2004. Blood 103: 3412-3419)、増加した補因子比活性を有するFVIII変異体(Wakabayashi et al., 2005. Biochemistry 44: 10298-304)、改善された生合成、および分泌、低下したE

10

20

30

40

50

R シャペロン相互作用、改善された E R - ゴルジ輸送、増加した活性または不活性に対する耐性、および改善された半減期を有する F V I I I 变異体 (P i p e 2 0 0 4 . S e m . T h r o m b . H e m o s t . 3 0 : 2 2 7 - 2 3 7 において要約)、ならびに B - ドメインの全てまたは一部の欠失を有する F V I I I 变異体 (例えば、W O 2 0 0 4 / 0 6 7 5 6 6 A 1 、W O 0 2 / 1 0 2 8 5 0 A 2 、W O 0 0 / 2 4 7 5 9 A 1 および米国特許第 4 , 8 6 8 , 1 1 2 号参照) が挙げられる。特に好ましくは、F V I I I 分子は「単鎖」F V I I I 分子である。単鎖 F V I I I には、B - ドメインの全てまたは一部の欠失および酸性 a 3 領域の全てまたは一部の欠失があり、したがって、A r g 1 6 4 8 での切断部位 (通常、分泌の間に切断される) が欠失している。単鎖 F V I I I 分子は、例えば、W O 2 0 0 4 / 0 6 7 5 6 6 A 1 ; U S 2 0 0 2 / 1 3 2 3 0 6 A 1 ; K r i s h n a n et al . (1991) European Journal of Bioc hemistry vol . 1 9 5 , no . 3 , pages 6 3 7 - 6 4 4 ; H e r l i t s c h k a et al . (1998) Journal of Biotechn ology , vol . 6 1 , no . 3 , pages 1 6 5 - 1 7 3 ; D o n a t h et al . (1995) Biochem . J . , vol . 3 1 2 , pages 4 9 - 5 5 に開示されている。

【 0 0 3 9 】

これらの第 V I I I 因子变異体およびバリエントは、その全体を、参照によって本明細書に組み入れる。

【 0 0 4 0 】

成熟した野生型のヒト第 V I I I 因子のアミノ酸配列は、配列番号 2 に示される。特定の配列におけるアミノ酸位置への言及は、F V I I I 野生型タンパク質におけるアミノ酸の位置を意味し、言及する配列の他の位置に、変異 (例えば、欠失、挿入および / または置換) が存在することを除外するものではない。例えば、配列番号 2 に言及する「G 1 u 2 0 0 4 」における変異は、修飾された同族体において、配列番号 2 の 1 ~ 2 3 3 2 位における 1 つまたはそれ以上のアミノ酸が欠失していることを除外するものではない。配列番号 2 をコードする D N A 配列は、配列番号 1 で示される。

【 0 0 4 1 】

用語「グリコサミノグリカン」は、本明細書で使用するとき、特にアミノヘキソース単位を含むオリゴ糖または多糖を指す。硫酸化グリコサミノグリカンとしては、限定されないが、コンドロイチンスルフェート、デルマタンスルフェート、ケラタンスルフェート、ヘパリンおよびヘパランスルフェートが挙げられる。好ましくは、硫酸化グリコサミノグリカンは、ヘパリンであり、最も好ましくは、硫酸化グリコサミノグリカンは、未分画ヘパリンである。

【 0 0 4 2 】

用語「ヘパリン」には、未分画ヘパリンおよび低分子量のヘパリンが含まれる。一実施形態において、本発明に従って使用されるヘパリンは、約 8 k D a ~ 約 3 0 k D a の平均分子量、好ましくは約 1 0 k D a ~ 約 2 0 k D a 、最も好ましくは約 1 2 k D a ~ 約 1 6 k D a 、例えば、約 1 5 k D a の平均分子量を有し得る「未分画ヘパリン」である。別の実施形態において、本発明に従って使用されるヘパリンは、低分子量ヘパリン (L M W H) である。L M W H は、8 0 0 0 D a 未満の平均分子量を有するヘパリンまたはヘパリン塩であり、全ての鎖の少なくとも 6 0 % が、8 0 0 0 D a 未満の分子量を有している。好ましくは、本発明に従って使用された L M W H の分子量は、約 2 k D a ~ 約 8 k D a 、より好ましくは約 3 k D a ~ 約 6 k D a 、最も好ましくは約 4 k D a ~ 約 5 k D a 、例えば約 4 . 5 k D a である。L M W H は、重合性ヘパリンの分画または脱重合などの様々な方法で得ることができる。L M W H の例としては、アルデパリン (a r d e p a r i n) [ノルミフロ (N o r m i f l o)]、セルトパリン (c e r t o p a r i n) [サンドパリン (S a n d o p a r i n)]、エノキサパリン (e n o x a p a r i n) [ロベノックス (L o v e n o x) およびクレキサン (C l e x a n e)]、パルナパリン (p a r n a p a r i n) [フルクサム (F l u x u m)]、チンザパリン (t i n z a p a r i

10

20

30

40

50

n) [インノヘップ (Innohep) およびロギパリン (Logiparin)]、ダルテパリン (dalteparin) [フラグミン (Fragmin)]、レビパリン (reviparin) [クリバリン (Clivarlin)] およびナドロパリン (nadroparin) [フラキシパリン (Fraxiparin)] が挙げられるが、これに限定されない。

【0043】

用語「ヘパリン」には、天然に存在するヘパリンの切断または単離によるか、合成的手段によるヘパリン分子の低分子量断片も含まれる。例えば、合成的に製造された、ヘパリンに由来する構造を有する、商業的に入手可能な硫酸化五糖もある。これは、フォンダパリヌクスナトリウムとして入手可能である。

10

【0044】

コンドロイチンスルフェートとしては、例えば、コンドロイチンスルフェートA (コンドロイチン-4-スルフェート)、コンドロイチンスルフェートC (コンドロイチン-6-スルフェート)、コンドロイチンスルフェートD (コンドロイチン-2,6-スルフェート)、およびコンドロイチンスルフェートE (コンドロイチン-4,6-スルフェート) が挙げられる。

【0045】

デルマタンスルフェート (従前は、コンドロイチンスルフェートBとも称されていた) は、市販されている別の硫酸化グリコサミノグリカンである。

【0046】

ケラタンスルフェートは、別の硫酸化グリコサミノグリカンである。ケラタンスルフェートの構造は、例えば、Funderburgh (2000) Glycobiology vol. 10 no. 10 pp. 951-958 に記載されている。

20

【0047】

ヘパランスルフェートは、ヘパリンとは異なるN-硫酸化多糖である (例えば、Gallagher, J. T., Lyon, M. (2000). "Molecular structure of Heparan Sulfate and interactions with growth factors and morphogens". In Iozzo, M., V. Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions. Marcel Dekker Inc. New York, New York. pp. 27-59、および Gallagher, J. T. Walker, A. (1985). "Molecular distinctions between Heparan Sulphate and Heparin: Analysis of sulphation patterns indicates Heparan Sulphate and Heparin are separate families of N-sulphated polysaccharides". Biochem. J. 230 (3): 665-74 を参照)。

30

【0048】

本発明の一実施形態によれば、処置対象における第VII因子の血漿レベルは、注射後5時間から注射後8時間の期間にわたって、持続して、健常対象者における第VII因子の正常血漿レベルの2%超、好ましくは5%超、より好ましくは8%超、最も好ましくは10%超である。血漿レベルは、実施例1に示されるように、決定される。

40

【0049】

本発明の一実施形態によれば、処置対象における第VII因子の血漿レベルは、注射後4時間から注射後16時間の期間にわたって、持続して、健常対象者における第VII因子の正常血漿レベルの2%超、好ましくは5%超、より好ましくは8%超、最も好ましくは10%超である。

【0050】

本発明の別の実施形態によれば、処置対象における第VII因子の血漿レベルは、注

50

射後 3 時間から注射後 24 時間の期間にわたって、持続して、健常対象者における第 V I I 因子の正常血漿レベルの 2 % 超、好ましくは 4 % 超、より好ましくは 6 % 超、最も好ましくは 8 % 超である。

【 0051 】

本発明の別の実施形態によれば、処置対象における第 V I I I 因子の血漿レベルは、注射後 2 時間から注射後 32 時間の期間にわたって、持続して、健常対象者における第 V I I I 因子の正常血漿レベルの 2 % 超、好ましくは 3 % 超、より好ましくは 4 % 超、最も好ましくは 5 % 超である。

【 0052 】

さらに本発明の別の実施形態によれば、処置対象における第 V I I I I 因子の血漿レベルは、注射後 1 時間から注射後 48 時間の期間にわたって、持続して、健常対象者における第 V I I I I 因子の正常血漿レベルの 2 % 超、好ましくは 3 % 超、より好ましくは 4 % 超、最も好ましくは 5 % 超である。

【 0053 】

上記血漿レベルは、好ましくは第 V I I I I 因子（例えば F V I I I I ）を皮下注射で、1,000 IU / kg 体重未満、または 800 IU / kg 体重未満、または 600 IU / kg 体重未満、または 400 IU / kg 体重未満、例えば、約 10 IU / kg 体重から約 1,000 IU / kg 体重、または約 20 IU / kg 体重から約 800 IU / kg 体重、または約 30 IU / kg 体重から約 700 IU / kg 体重、または約 40 IU / kg 体重から約 600 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 500 IU / kg 体重、または約 75 IU / kg 体重から約 400 IU / kg 体重、または約 100 IU / kg 体重から約 300 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 1,000 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 500 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 800 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 600 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 500 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 400 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 300 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 200 IU / kg 体重の用量で投与するときに得られる。

【 0054 】

一実施形態において、第 V I I I I 因子および硫酸化グリコサミノグリカンは、同じ組成物中に含有される。2つの成分を含むこの組成物は、1つの注射または同様の方法により患者に投与され得る。

【 0055 】

別の実施形態において、第 V I I I I 因子および硫酸化グリコサミノグリカンは、同じ組成物中に存在しない。例えば、2つの成分はそれぞれ、医薬製剤において個別の投与形態で提供してもよい。

【 0056 】

2つの成分が同じ組成物に存在しない場合、個別の組成物は、個別に投与してもよく、第 V I I I I 因子と硫酸化グリコサミノグリカンとが同時に投与されるように投与の少し前に混合してもよい。個別に投与する場合、投与は、連続的、例えば、時間差方式 (t i m e - s t a g g e r e d m a n n e r) で行われてもよい。一般的には、2つの成分が、単回投与、例えば注射により、同時に投与されることが好ましい。様々な投与経路を下記で議論する。それらは、上記に必要な変更を加えて適用される。

【 0057 】

医薬製剤の成分は、従来の生理学的に適合する水性緩衝液に溶解させてもよく、場合により、医薬製剤を得るための医薬賦形剤を添加してもよい。医薬製剤の成分は、既に、医薬的、生理学的に適合する賦形剤を全て含有していてもよく、注射用水に溶解させて、医薬製剤を準備してもよい。

【 0058 】

そのような医薬担体および賦形剤ならびに適切な医薬製剤の調製は、当該分野で周知で

10

20

30

40

50

ある（例えば、“Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins”, Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000) or “Handbook of Pharmaceutical Excipients”, 3rd edition, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000) 参照）。一定の実施形態において、医薬組成物は、少なくとも1種の添加剤、例えば、充填剤 (filler)、增量剤 (bulking agent)、緩衝剤、安定剤または賦形剤を含むことができる。標準的な製剤化技術は、当業者によく知られている（例えば、2005 Physicians’ Desk Reference (登録商標), Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Gennaro et al., Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000 を参照）。適切な医薬添加剤としては、例えば、糖（マンニトール、ソルビトール、ラクトース、スクロース、トレハロースなど）、アミノ酸（ヒスチジン、アルギニン、リジン、グリシン、アラニン、ロイシン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン、アスパラギン、フェニルアラニンなど）、等張状態を達成するための添加剤（塩化ナトリウムまたは他の塩など）、安定剤（ポリソルベート80、ポリソルベート20、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、塩化カルシウムなど）、生理学的pH緩衝剤（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンなど）が挙げられる。一定の実施形態において、医薬組成物は、pH緩衝試薬、および湿潤剤または乳化剤を含有してもよい。さらなる実施形態において、組成物は、保存剤または安定剤を含有してもよい。特に、第VIII因子を含む医薬製剤は、凍結乾燥形態または安定な可溶化形態で製剤化し得る。第VIII因子は、当該分野で公知の様々な方法に従って凍結乾燥してもよい。また硫酸化グリコサミノグリカンおよび第VIII因子と同じ組成物に含有させる場合も、そのような製剤は、凍結乾燥形態または安定な可溶化形態で製剤化し得る。凍結乾燥製剤は、使用前に、1つまたはそれ以上の薬学的に許容可能な希釈剤 (diluent)、例えば、滅菌注射用水、滅菌生理食塩液、または適切な緩衝溶液を添加して再構成される。

【0059】

30

本発明の医薬製剤に含有される組成物（複数可）は、任意の医薬的に適切な方法で、個体に送達させることができる。様々な送達系が公知であり、任意の都合のよい経路により組成物を投与するために使用することができる。好ましくは、本発明の医薬製剤に含有される組成物（複数可）は、非静脈内注射により、個体に送達される。より好ましくは、本発明の組成物（複数可）は、従来の方法に従って、皮下、筋肉内、腹腔内、大脳内、肺内、鼻腔内、皮内または経皮投与、最も好ましくは、皮下、筋肉内または経皮投与用に製剤化される。製剤は、輸注により連続的に、またはボーラス注射により、投与し得る。一部の製剤は、徐放機構も包含し得る。

【0060】

40

本発明の医薬製剤の組成物（複数可）は、治療的有効量で患者に投与される。治療的有効量とは、忍容できない有害な副作用を生じさせる用量に達することなく、所望の効果を生じさせ、処置される病態または適応症を防止するか、処置される病態または適応症の重症度または拡大を低減するのに十分な用量を意味する。正確な用量は、例えば、適応症、処方、投与方式などの多くの因子に依存し、それぞれの適応症について前臨床および臨床試験で決定されなければならない。

【0061】

50

第VIII因子については、1回の投与の用量は、処置対象における第VIII因子の血漿レベルが、注射後2時間から注射後48時間の期間にわたって、持続して、健常対象者における第VIII因子の正常血漿レベルの2%超、好ましくは3%超、より好ましくは4%超、最も好ましくは5%超であるように選択してもよい。

【0062】

好ましくは、第VIII因子の1回の投与の用量は、1,000IU/kg体重未満、または800IU/kg体重未満、または600IU/kg体重未満、または400IU/kg体重未満、例えば、約10IU/kg体重から約1,000IU/kg体重、または約20IU/kg体重から約800IU/kg体重、または約30IU/kg体重から約700IU/kg体重、または約40IU/kg体重から約600IU/kg体重、または約50IU/kg体重から約500IU/kg体重、または約75IU/kg体重から約400IU/kg体重、または約100IU/kg体重から約300IU/kg体重、または約50IU/kg体重から約1,000IU/kg体重、または約50IU/kg体重から約500IU/kg体重、または約50IU/kg体重から約700IU/kg体重、または約50IU/kg体重から約500IU/kg体重、または約50IU/kg体重から約400IU/kg体重、または約50IU/kg体重から約300IU/kg体重、または約50IU/kg体重から約200IU/kg体重の用量である。10

【0063】

第VIII因子は、それ自体、硫酸化グリコサミノグリカンと共に投与することができる。あるいは、第VIII因子は、vWFと結合させて、すなわちFVIII/vWF複合体として、硫酸化グリコサミノグリカンと共に投与することができる。

【0064】

投与される硫酸化グリコサミノグリカンの量は、通常、適用製品1mLあたり約0.01～約100mg、適用製品1mLあたり約0.01～約10mg、および適用製品1mLあたり約0.05～約1mgである。20

【0065】

用語「生物学的利用能」は、本明細書で使用するとき、皮下、静脈内、または皮内投与後から最終時点までの所定の時間に、血漿中で検出できる第VIII因子（例えば、第VIII因子またはFVIII関連調製物）の、投与した用量に対する割合を意味する。典型的には、生物学的利用能は、実験動物において、調製物を10IU/kg～1000IU/kgの間の用量（例えば、400IU/kg体重）で投与し、投与後、所定の時点で血漿サンプルを取得し、該サンプルにおける第VIII因子（例えば、第VIII因子または第VIII因子関連ポリペプチド）の量を、発色アッセイまたは凝固アッセイ（もしくは任意のバイオアッセイ）、イムノアッセイまたはそれらと同等の方法を1つまたはそれ以上用いて決定することにより測定される。生物学的利用能は、投与後から予め設定された最終時点までの、血漿中の第VIII因子の濃度または活性をY軸、投与後の時間をX軸とする、曲線下面積（AUC）として表される。好ましくは、この予め設定された時点は、投与後48時間である。最も好ましくは、生物学的利用能は、下記実施例1に示されるように決定される。試験調製物の相対的生物学的利用能とは、試験調製物（例えば、第VIII因子+硫酸化グリコサミノグリカン）のAUCと、試験調製物と同じ用量および同じ方法（例えば、静脈内、皮下、または皮内）で投与したときの参照調製物（例えば、第VIII因子単独）のAUCとの間の比を意味する。30

【0066】

本発明によれば、第VIII因子（硫酸化グリコサミノグリカンと共に投与するとき）の生物学的利用能は、第VIII因子を単独で投与するときの生物学的利用能より高い。好ましくは、生物学的利用能は、少なくとも20%まで、より好ましくは少なくとも50%まで、より好ましくは少なくとも75%まで、最も好ましくは少なくとも100%まで増加する。生物学的利用能の増加は、好ましくは、第VIII因子（FVIII）を、1,000IU/kg体重未満、または800IU/kg体重未満、または600IU/kg体重未満、または400IU/kg体重未満、例えば、約10IU/kg体重から約1,000IU/kg体重、または約20IU/kg体重から約800IU/kg体重、または約30IU/kg体重から約700IU/kg体重、または約40IU/kg体重から約600IU/kg体重、または約50IU/kg体重から約500IU/kg体重、ま4050

たは約 75 IU / kg 体重から約 400 IU / kg 体重、または約 100 IU / kg 体重から約 300 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 1,000 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 800 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 700 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 600 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 400 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 300 IU / kg 体重、または約 50 IU / kg 体重から約 200 IU / kg 体重の用量で、皮下注射により投与するときに得られる。

【0067】

本発明の医薬組成物（複数可）は、単独でまたは他の治療薬剤と組み合わせて投与することができる。これらの薬剤は、同じ医薬の一部として組み込むことができる。 10

【実施例】

【0068】

【実施例1】

血友病 A モデルにおける s.c. 適用 FVIII および種々の添加剤の生物学的利用能の評価

材料および動物モデル

実験で使用した第VIII因子は、B-ドメイン短縮単鎖組換え第VIII因子（以下、“rFVIII”と称する）であった。第VIII因子は、Asn764をThr1653に直接融合して得た。第VIII因子を細胞培養細胞により発現させ、細胞培養培地から精製した。 20

【0069】

さらに使用した薬剤を表1にまとめる。

【0070】

【表1】

表1

化合物の分類	化合物および/または供給源の種類
未分画ヘパリン	ヘパリン-ナトリウム-25000-ラショファーム (ratiopharm)
低分子量ヘパリン	ダルテパリン(フラグミン(登録商標)Pfizer製)
デキストラノスルフェート	およそ500kDa
ペントサンスルフェート	フオンダパリヌクスナトリウム(アリクストラ(Arixtra)(登録商標)SKB製)
N-アセチル 脱-O-硫酸化 ヘパリン	N-アセチル-脱-O-硫酸化ヘパリンナトリウム 塩(Sigma-Aldrich製)(Sigma製品番号A6039) CAS番号133686-69-8
コンドロイチンスルフェート	ウシ気管由来のコンドロイチンスルフェート Aナトリウム塩(Sigma-Aldrich製) (Sigma製品番号C9819) CAS番号39455-18-0

30

40

【0071】

第VIII因子ノックアウトマウスを、血友病 A の動物モデルとして使用した。これらのマウスは、エキソン 16 および 17 が欠失していることから、FVIII を発現しない (Biel et al., Nature genetics, 1995, Vol 10 (1), 119-121; Biel et al., Blood, 1996, Vol 88 (50

9), 3446-3450)。これにより、k oマウスの血漿におけるFVIII活性の定量による処置後のFVIIIレベルの解析が可能になる。

【0072】

方法

血管外注射が、rFVIII (ヒト)を用いる治療法の改善のための選択肢になり得るかを評価するために、代表的な血管外治療法である皮下注射を選択した。実施した非臨床的薬物動態研究の設定は、以下の表2および表3に詳述している。第VIII因子活性の血漿レベルを、血友病Aモデルにおいて、様々な添加物と共にrFVIIIを静脈内または皮下に単回注射 (表2に処置群を詳述) した後に、測定した。

【0073】

10

対応する群を、様々な異なる添加剤の存在下、同じ用量のFVIIIで処置した (発色基質 (CS) 活性アッセイ)。単回適用については、各処置群について様々な異なる成分を、200 μLの体積 (全ての群で同じ体積) で混ぜ合わせた後、約25 g重量のFVIIIノックアウト (k o) マウスに皮下投与した。処置群を表2にまとめる。

【0074】

短期麻酔の後、血液サンプルを取り出し、クエン酸ナトリウムを使用して10%クエン酸血液に抗凝固処置し、血漿に処理して、-70°で保存して、FVIII活性を測定した。サンプル採取の時点は、表3に詳述する。血漿におけるFVIII活性の定量は、標準的なaPTTに基づく手法 (Behring Coagulation Timer) によって実施した。動物は、標準的な飼育条件で維持した。

20

【0075】

【表2】

表2：処置群

番号	処置	FVIII (CS活性アッセイ)/ 添加剤用量	体積 [mL/kg]	投与計画	経路	N
1	rFVIII	400 IU/kg	8	単回注射 (t=0)	s.c.	25
2	rFVIII / 未分画ヘパリン	400 IU/kg / 適用製品1mLあたり 5U	8	単回注射	s.c.	25
3	rFVIII / デキストラノスル フェート (およそ500kDa)	400 IU/kg / 適用製品1mLあたり 400μg	8	単回注射	s.c.	25
4	rFVIII / フラグミン	400 IU/kg / 適用製品1mLあたり 5U	8	単回注射	s.c.	20
5	rFVIII / フォンダパリヌクス	400 IU/kg / 適用製品1mLあたり 10μg	8	単回注射	s.c.	20
6	rFVIII / N-アセチル 脱-O-硫酸化 ヘパリン	400 IU/kg / 適用製品1mLあたり 10μg	8	単回注射	s.c.	20
7	rFVIII / コンドロイチン スルフェート	400 IU/kg / 適用製品1mLあたり 10μg	8	単回注射	s.c.	20

【0076】

結果

これらの結果を表3および図1にまとめる。400 IU/kgのrFVIIIを、様々な硫酸化グリコサミノグリカンの存在下で、FVIIIikoマウスに皮下注射すると、血漿レベルにおけるFVIII活性が、FVIII单独またはFVIII + デキストラノスルフェートを投与した場合と比較して、顕著に増加した。ヘパリンを共投与した場合の増加は、特に強力であった。

【0077】

10

20

30

40

【表3】

表3：正常ヒト血漿におけるFVIII活性に対するFVIII活性%

時点(時間)	rFVIII 400 IU/kg s.c.	rFVIII 400 IU/kg / 未分画 ヘパリン 5 U/mL (40 U/kg) s.c.	rFVIII 400 IU/kg / デキストラン スルフェート 400 µg/ml s.c.	rFVIII 400 IU/kg / フラグミン 5 U/mL (40 U/kg) s.c.
0.5	1.02 ± 0.85	2.90 ± 2.70	0 ± 0	3.41 ± 0.61
2	13.04 ± 3.90	15.16 ± 4.12	0.98 ± 1.49	10.65 ± 6.38
5	1.15 ± 1.28	26.66 ± 5.74	2.57 ± 2.67	15.19 ± 7.12
8	2.32 ± 2.27	15.56 ± 4.22	0.64 ± 0.64	21.13 ± 8.92
16	4.82 ± 2.35	12.08 ± 2.35	0.84 ± 1.26	13.19 ± 3.58
24	9.72 ± 8.09	14.10 ± 3.76	0.85 ± 0.89	10.21 ± 3.26
32	2.48 ± 2.20	10.84 ± 5.31	0.92 ± 1.30	5.23 ± 2.83
48	1.15 ± 1.72	7.02 ± 1.24	1.47 ± 1.14	4.71 ± 1.74
AUC 0~48時間 (時間×正常SHP に対する%)	202.0	598.4	50.0	475.9

ピーク値は、灰色で陰影を付けている。

【0078】

10

20

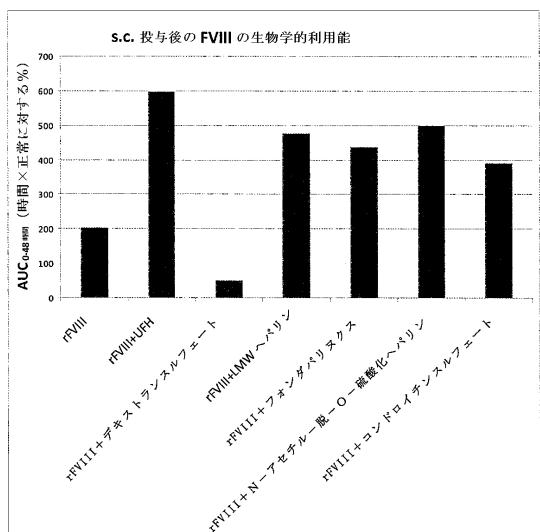
30

【表4】

時点(時間)	rFVIII 400 IU/kg/ フオンダ パリヌクス (10 µg/mL) s.c.	rFVIII 400 IU/kg/ N-アセチル 脱-O -硫酸化ヘパリン (10 µg/mL) s.c.	rFVIII 400 IU/kg/ コンドロイチン スルフェート (10 µg/mL) s.c.
0.5	7.21 ± 6.77	8.24 ± 11.87	1.98 ± 4.12
2	20.81 ± 11.42	23.37 ± 8.39	16.83 ± 7.22
5	13.01 ± 8.96	16.75 ± 5.08	11.59 ± 5.28
8	18.03 ± 4.70	28.73 ± 9.39	22.59 ± 7.10
16	8.79 ± 5.67	7.69 ± 5.31	3.86 ± 2.76
24	9.61 ± 5.66	10.49 ± 2.12	8.95 ± 2.25
32	3.81 ± 2.13	4.11 ± 1.99	2.83 ± 1.67
48	6.55 ± 2.93	4.73 ± 1.37	7.11 ± 2.86
AUC (時間×正常SHP に対する%)	435.7	499.6	391.7

ピーク値は、灰色で陰影を付けている。

【図1】



【配列表】

0006072810000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ザビーネ・ゾルナー
スイス国CH-3074ムーリ・トゥーンシュトラーセ70

審査官 安藤 公祐

(56)参考文献 特表平10-501522(JP, A)
国際公開第2011/095604(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 38 / 43
A 61 K 31 / 726
A 61 K 31 / 727
A 61 P 7 / 04
A 61 P 43 / 00
C 07 K 14 / 755
C 12 N 15 / 09
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)