

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-24684

(P2018-24684A)

(43) 公開日 平成30年2月15日(2018.2.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 47/56</b> (2017.01)	A 6 1 K 47/56	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 9/00</b> (2006.01)	A 6 1 K 9/00	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 47/10</b> (2006.01)	A 6 1 K 47/10	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 47/26</b> (2006.01)	A 6 1 K 47/26	
<b>A 6 1 K 47/32</b> (2006.01)	A 6 1 K 47/32	

審査請求 有 請求項の数 15 O L 外国語出願 (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-171545 (P2017-171545)	(71) 出願人	512279958
(22) 出願日	平成29年9月6日 (2017.9.6)		カンタブ バイオファーマシューティカルズ パテンツ リミテッド
(62) 分割の表示	特願2015-504987 (P2015-504987) の分割		マルタ, ヴィエルティエー1436 バレッタ, ストレイト ストリート 103, パラッツォ ピエトロ シツチェス
原出願日	平成25年4月16日 (2013.4.16)	(74) 代理人	110000671
(31) 優先権主張番号	1206628.8		八田国際特許業務法人
(32) 優先日	平成24年4月16日 (2012.4.16)	(72) 発明者	ヘンリー, ウィリアム
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		英国, ロンドン, ベッドフォード スクエア 13, レヴァトン ハウス, レヴァトン ライセンス ホールディングス リミテッド
(31) 優先権主張番号	1213712.1		
(32) 優先日	平成24年8月1日 (2012.8.1)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
(31) 優先権主張番号	1214985.2		
(32) 優先日	平成24年8月22日 (2012.8.22)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】最適化された皮下治療薬

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】治療薬の皮下送達、およびこのような薬剤を皮下送達に適した状態にするための修飾方法および投与製剤の提供。

【解決手段】皮下投与のための方法および投与製剤であって、治療薬が、治療薬の本来の状態に対して親水性および分子次元が増加させるために修飾され、 $C_{max} : C_{average}$ 比が、静脈内送達されたときの薬剤の $C_{max} : C_{average}$ 比よりも小さい、方法および投与製剤が提供される。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

患者に治療薬を投与方法であって、

$C_{max} : C_{average}$ 比が、静脈内送達されたときの薬剤の  $C_{max} : C_{average}$ 比よりも小さくなるように患者に前記治療薬を皮下投与することを含み、前記治療薬は、前記治療薬の本来の状態に対して親水性を増加させ、分子次元を調節するために修飾される、方法。

**【請求項 2】**

患者のリンパ系に治療薬を投与方法であって、

前記治療薬が注射部位で患者の循環系に直接入らないように前記治療薬を皮下投与する段階を含み、

前記治療薬は、前記治療薬の本来の状態に対して親水性を増加させ、分子次元を調節するために修飾される、方法。

**【請求項 3】**

患者に治療薬が皮下投与されたとき、前記治療薬が患者の局所循環系に直接入ることを防ぐ方法であって、

患者に修飾された薬剤を皮下投与する段階を含み、

前記治療薬は、修飾された治療薬が投与部位から局所血管系に直接入れないように、前記治療薬の本来の状態に対して親水性を増加させ、分子次元を調節するために修飾される、方法。

**【請求項 4】**

被験者の皮下デポ製剤から治療薬を送達するスピードを調節する方法であって、前記治療薬を修飾して前記治療薬の親水性を変化させることを含み、親水性のレベルがバイオアベイラビリティのレベルに比例する、方法。

**【請求項 5】**

前記修飾された治療薬の皮下投与は、1回の静脈内ボラス注射によって安全に送達されうる投与量よりも、高い投与量で患者に修飾された前記治療薬を投与することを可能にする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記修飾された治療薬の皮下投与は、修飾された前記治療薬が静脈内投与された場合よりも早く、患者に再投与することを可能にする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記修飾された治療薬の皮下投与は、その修飾された、または本来の形態での前記薬剤の静脈内投与よりも少ない、または同等の免疫原性応答を与える、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記治療薬の親水性が、前記治療薬の本来の状態に対して少なくとも 50% 増加する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記治療薬は、抗生物質、血液凝固因子、ホルモン、他の治療用ペプチドもしくはタンパク質、小分子またはモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記血液凝固因子は、第 V I I 因子、第 V I I a 因子、第 V I I I 因子、第 I X 因子、第 X 因子、第 X a 因子、第 X I 因子、第 X I I I 因子、第 V 因子、ヴォン・ヴィレブランド因子およびプロテイン C からなる群から選択される、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記修飾は、前記治療薬の生体適合性ポリマーへの共役である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 2】

前記生体適合性ポリマーは、ポリエチレングリコール ( P E G )、ポリ - ホスファチジルコリン ( P C )、ポリプロピレングリコール ( P P G )、エチレングリコールとプロピレングリコールとの共重合体、ポリエチレンオキシド ( P E O )、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリオレフィンアルコール ( polyolefinic alcohol )、ポリヒドロキシアルキルメタクリレート、多糖、ポリ ( - ヒドロキシ酸 )、ポリビニルアルコール、ポリホスホスファゼン ( polyphosphosphazene )、ポリ ( N - アクリロイルモルフォリン )、ポリアルキレンオキシドポリマー、ポリマレイン酸、ポリ ( D L - アラニン )、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、デンプンまたはデンプン誘導体、ヒアルロン酸、キチン、ポリメタクリレート、ポリシアル酸 ( P S A )、ポリヒドロキシアルカノエート ( polyhydroxy alkanoates )、ポリアミノ酸およびこれらの組み合わせである、請求項 1 1 に記載の方法。 10

## 【請求項 1 3】

前記生体適合性ポリマーは、 P E G である、請求項 1 1 または 1 2 に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

前記修飾は、ポリペプチドに融合して融合タンパク質を生成すること；リボソーム、トランスファーソーム ( transfersomes ) またはミセルなどの小胞送達ビヒクルへの組み込み；デンドリマーへの取り込みもしくは付着、または前記治療薬のオリゴマー複合体の形成である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

## 【請求項 1 5】

前記治療薬の皮下送達体積は 2 m l 以下である、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 6】

前記修飾された治療薬は、静脈内に安全に送達されうる修飾された前記治療薬の濃度よりも高い濃度で送達可能である、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 7】

前記修飾された治療薬の皮下投与は、静脈内投与されたときの修飾された前記治療薬の治療効果 ( therapeutic benefit ) よりも少なくとも 1 2 時間長い持続時間の治療効果を患者に与える、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

## 【請求項 1 8】

前記皮下送達が、皮下注射、局所塗布、経皮パッチ、マイクロダーマルアブレーション ( microdermal abrasion )、または高圧乾燥粉末送達による、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 9】

前記皮下送達が、少なくとも 1 日 1 回、少なくとも 1 日 2 回、少なくとも週 1 回、少なくとも週 2 回、少なくとも 2 週間に 1 回、または少なくとも月 1 回である、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 2 0】

治療薬および修飾を含み、前記修飾が、前記治療薬の本来の状態に対して薬剤の親水性を増加させ、分子次元を調節する、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法に使用するための、修飾された薬剤。 40

## 【請求項 2 1】

前記修飾が、前記薬剤の親水性を、前記治療薬の本来の状態に対して少なくとも 5 0 % 増加させる、請求項 1 9 に記載の使用のための修飾された薬剤。

## 【請求項 2 2】

前記修飾が、前記治療薬に融合した生体適合性ポリマーである、請求項 2 0 または 2 1 に記載の修飾された薬剤。

## 【請求項 2 3】

前記修飾された治療薬の皮下送達は、静脈内投与されたときの修飾された前記治療薬の 50

治療効果よりも少なくとも12時間長い持続時間の治療効果を患者に与える、請求項20～22のいずれか1項に記載の修飾された薬剤。

【請求項24】

修飾された治療薬の皮下送達は、静脈内投与されたときの修飾された前記治療薬の治療効果よりも少なくとも12時間長い持続時間の治療効果を患者に与える、修飾された前記治療薬の薬剤組成物の投与形態。

【請求項25】

皮下投与のための修飾された血液凝固因子の薬剤組成物の投与形態であって、患者への皮下投与のために製剤化されたとき、前記患者の全血凝固時間を20分以下に維持するのに十分な、1か月に1回以下の投与形態を提供する、投与形態。

10

【請求項26】

1か月に1回以下の皮下投与のための、PEG化血液凝固因子の液体の投与形態であって、

前記投与形態は、静脈内投与されたときの等価参照 (equivalent reference) 投与形態と比べて少なくとも10%であり、90%以下である  $C_{max}$  を有する、血液凝固障害の治療における使用のための、投与形態。

【請求項27】

2週間に1回以下、1週間に1回以下、1/2週間に1回以下、2日に1回以下、または1日1回以下の投与量を提供する、請求項24～26のいずれか1項に記載の投与形態。

20

【請求項28】

前記患者における全血凝固時間を15分未満に維持するのに十分である、請求項24～26のいずれか1項に記載の投与形態。

【請求項29】

前記患者における全血凝固時間を12分未満に維持するのに十分である、請求項24～26のいずれか1項に記載の投与形態。

【請求項30】

前記血液凝固因子は、第VIIa因子、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第XIII因子、第V因子、ヴォン・ヴィレブランド因子およびプロテインCからなる群から選択される、請求項24～29のいずれか1項に記載の投与形態。

30

【請求項31】

前記修飾はPEG化である、請求項24～30のいずれか1項に記載の投与形態。

【請求項32】

静脈内投与されたときの等価参照投与形態と比べて少なくとも10%であり、90%以下である  $C_{max}$  を有する、請求項24～31のいずれか1項に記載の投与形態。

【請求項33】

前記製剤は、静脈内投与されたときの等価参照投与形態と比べて10～20%の  $C_{max}$  を有する、請求項32に記載の投与形態。

【請求項34】

前記薬剤が第VIII因子である、請求項33に記載の投与形態。

40

【請求項35】

前記製剤は、静脈内投与されたときの等価参照投与形態と比べて40～60%の  $C_{max}$  を有する、請求項32に記載の投与形態。

【請求項36】

前記薬剤が第IX因子である、請求項35に記載の投与形態。

【請求項37】

前記製剤は、静脈内投与されたときの等価参照投与形態と比べて75～80%の  $C_{max}$  を有する、請求項32に記載の投与形態。

【請求項38】

50

前記製剤は、静脈内投与されたときの等価参照投与形態と比べて75%の $C_{max}$ を有する、請求項32に記載の投与形態。

【請求項39】

前記薬剤が第VII因子である、請求項37または38に記載の投与形態。

【請求項40】

投与量が1~1000IU/kgである、請求項24~39のいずれか1項に記載の投与製剤。

【請求項41】

投与量が5~500IU/kgである、請求項24~39のいずれか1項に記載の投与製剤。

【請求項42】

投与量が100~250IU/kgである、請求項24~39のいずれか1項に記載の投与製剤。

【請求項43】

投与量が50~200IU/kgである、請求項24~39のいずれか1項に記載の投与製剤。

【請求項44】

投与量が25~50IU/kgである、請求項24~39のいずれか1項に記載の投与製剤。

【請求項45】

前記投与形態が、少なくとも1日1回、少なくとも1日2回、およそ週1回、およそ週2回、およそ2週間に1回、またはおよそ月1回の投与のためのものである、請求項24~39のいずれか1項に記載の投与製剤。

【請求項46】

投与形態が皮下投与のためのものであり、治療薬の親水性を変化させるために前記治療薬が修飾され、親水性のレベルがバイオアベイラビリティのレベルに比例する、前記治療薬の投与製剤。

【請求項47】

請求項24に記載の修飾された治療薬の投与形態を皮下投与することを含む、患者の疾患の治療方法。

【請求項48】

請求項24~46のいずれか1項に記載の血液凝固因子の投与形態を、それを必要とする患者に皮下投与することを含む、患者の血液凝固疾患または外傷の治療方法。

【請求項49】

前記投与形態が、少なくとも1日1回、少なくとも1日2回、少なくともおよそ週2回、少なくともおよそ週1回、少なくとも2週間に1回、または少なくともおよそ月1回投与される、請求項47または48に記載の治療方法。

【請求項50】

前記投与形態が、少なくとも1日1回投与される、請求項47または48に記載の治療方法。

【請求項51】

前記投与形態が1日2回投与され、患者が第1投与で第1投与形態を、第2投与で第2投与形態を受ける、請求項50に記載の治療方法。

【請求項52】

前記第2投与形態が、前記第1投与形態と別々に、同時に、または連続して投与される、請求項51に記載の治療方法。

【請求項53】

請求項24~46のいずれか1項に記載の皮下投与形態および投与用ビヒクルを含む、部品のキット。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、治療薬の皮下送達、およびこのような薬剤を皮下送達に適した状態にするための修飾に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

多くの疎水性（親油性）分子が、感染症、疾患および障害の治療に用いられている。親油性分子は、感染症、疾患などの部位への迅速な送達を確実にするために、一般に患者の血流に直接投与される。しかしながら、このような分子の半減期および/またはバイオアベイラビリティはサブ最適化されている。静脈内投与の不利益としては、患者への比較的大量の薬剤の送達に対する局所的および全体的な反応、ならびに静脈内投与の不便がある。

10

## 【0003】

本発明者らは、驚くべきことに、治療薬を修飾し、これによって薬剤の親水性および分子次元を増加させると、このような薬剤が直接血管系に入れなくなるを見出した。しかしながら、修飾された薬剤は、その水性のリンパ系を通過して患者の循環系に入る能力のため、依然として生物学的に利用可能になる。前記修飾は、治療薬の結合組織への表面接着を低減し、組織液におけるその溶解度を増加させるように選択される。本発明の修飾された治療薬は、皮下腔から直接血管系に入るには大きすぎるため、したがって、リンパ系によって体内を輸送され、胸管（右リンパ本管および鎖骨下静脈）を通過して循環系に入るため、特に皮下腔に送達されるときに有用である。驚くべきことに、これは患者の循環系への薬剤の予測可能な定常的な注入をもたらす。したがって、本発明は、修飾された薬剤の効果をその寿命、注入速度および消失速度、したがって効果の持続時間においてより予測可能にするための、修飾された薬剤の皮下送達に関する。これは、患者に皮下送達されると、修飾された薬剤が血管壁を通過して血流に入ることができず、リンパ系に入るように間質液によって輸送されるように、薬剤をより親水性にし、その分子次元を調節することによって達成される。これは、リンパ系から血管系への制御された、予測可能な放出をもたらす。後述するように、これによって送達部位の周囲の血管新生のレベルを考慮する必要がなくなる。

20

## 【0004】

本発明は、すべての血液因子、ホルモン、抗生物質、モノクローナル担体およびいくつかの小分子を含む、ペプチド、生体分子に適用されうる。分子の治療効果を妨げない、かつ、親水性を増加させ、その分子次元（修飾された薬剤の分子量または物理的なサイズを含みうる）を調節し、分子がはじめに胸管でリンパ系を介して鎖骨下静脈に入らずに、直接血管系に入ることができないことを確保する、任意の適当な修飾が用いられうる。選択された修飾は、薬剤の注入速度と消失速度とが最適な治療効果のために「バランスがとれている」ように、薬剤の体内からの消失（排出、消化、免疫的攻撃または他の方法による）を調整する随伴効果を有しうる。

30

## 【0005】

適当な修飾（*modification*）の例としては、薬剤の、ポリマー、適当には、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリ-ホスファチジルコリン（PC）、ポリプロピレングリコール（PPG）、エチレングリコールとプロピレングリコールとの共重合体、ポリエチレンオキッド（PEO）、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリオレフィンアルコール（*polyolefinic alcohol*）、ポリヒドロキシアルキルメタクリレート、多糖、ポリ（*-*ヒドロキシ酸）、ポリビニルアルコール、ポリホスホスファゼン（*polyphosphosphazene*）、ポリ（N-アクリロイルモルフォリン）、ポリアルキレンオキッドポリマー（*polyalkylene oxide polymers*）、ポリマレイン酸、ポリ（DL-アラニン）、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、デンプンまたはデンプン誘導体、ヒアルロン酸、キチン、ポリメタクリレート、ポリシアル酸（PSA）、ポリヒドロキシアルカノエート（p

40

50

ol y h y d r o x y a l k a n o a t e s)、ポリアミノ酸およびこれらの組み合わせなどの生体適合性ポリマーとの共役 (c o n j u g a t i o n) がある。生体適合性ポリマーは、直鎖または分岐鎖の構造を有していてもよい。

【0006】

生体適合性ポリマーの他の例は、特に制限されないが、アルブミン、トランスフェリン、モノクローナル抗体、抗体断片、例えば、単ドメイン抗体、 $V_L$ 、 $V_H$ 、Fab、 $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab3$ 、 $scFv$ 、 $di-scFv$ 、 $sdAb$ 、 $Fc$ およびこれらの組み合わせなどの免疫グロブリンからなる群から選択されるタンパク質である。

【0007】

治療薬を修飾する他の方法は、融合タンパク質の使用；リボソーム、トランスファーソーム (t r a n s f e r s o m e s) またはミセルなどの小胞送達ビヒクルへの組み込み； dendri mer への取り込み / 付着；薬剤のオリゴマー複合体の形成によるものでありうる。選択された修飾は、薬剤の注入速度と消失速度とが最適な治療効果のために「バランスがとれている」ように、薬剤の体内からの消失（排出、消化、免疫的攻撃または他の方法による）を調整する随伴効果を有しうる。

【0008】

皮下腔に送達されると、このように位置した修飾された薬剤は、リンパ系を通して輸送され鎖骨下静脈を通して血管系に注入されうる。その後、このような修飾はまた、薬剤製品の体内からの消失速度に対する皮下腔から循環への注入速度の比が、修飾された薬剤の治療効率および有効性を最適化するようにバランスがとられ、制御されるように、薬剤の体内からの消失を制御する。

【0009】

このように皮下送達のために修飾されうる治療薬の例としては、血液凝固因子がある。血液凝固カスケードは、互いに活性化し、血液凝固の形成を促進し、健康な止血を維持するさまざまな働きをする、多くの異なるタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、本発明によって修飾される血液凝固因子は、第VII因子、第VIIa因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIIa因子、第V因子、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子およびプロテインCからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、血液凝固因子は、好ましくは、第VII因子、第VIII因子または第IX因子である。

【0010】

本発明の関する治療薬の例として、血液凝固第VII因子（本明細書中では、FVIIとも称する）があり、これは12個の天然のジスルフィド結合を有する、53,000ダルトン (Da) の、グリコシル化されたビタミンK依存性の、1本鎖チモーゲンである (O' Hara et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 84: 5158-5162 (1987))。このタンパク質は、主に肝臓で生産される。FVIIは、外因性の血液凝固カスケードに関与する (図1)。このタンパク質は、4つの別のドメインで構成されている：N-末端 - カルボキシグルタミン酸 (Gla) ドメイン、2つの上皮成長因子様 (EGF) ドメインおよびC-末端セリンプロテアーゼドメイン。循環しているチモーゲンは、血管内皮下層に見つかっているコファクター組織因子 (cofactor tissue factor) (TF) の非存在下では非常にプロテアーゼ活性が低い。血管損傷を受けた後、FVIIは高い親和性でTFに結合し、152番目のアルギニン及び153番目のイソロイシンの間のペプチド結合の特異的な切断によって活性のある、2本鎖の酵素FVIIaに変換される。FVIIa軽鎖は、N-末端Gla及びEGF様ドメインから構成され、重鎖は、セリンプロテアーゼドメインから構成される。重鎖及び軽鎖は、135番目のシステイン及び262番目のシステインの間の1つのジスルフィド結合によって一緒に維持される。活性化されると、FVIIaは、すばやく、FXからFXaへの及びFIXからFIXaへの変換を触媒する。次に、FXaがFVaと複合体を形成し、プロトロンビンを切断し、これにより、少量のトロンビンが生成する (Aitken, M. G. EMA, 16: 446-455 (2004))。このトロンビンの生成が血小板及び血小板表面のコファクターV、VIIII及びXIを活性化する。活性化によって、トロンビン

10

20

30

40

50

バースト(thrombin burst)が形成され、これによりフィブリンの重合及び止血血栓の形成が起こる。

#### 【0011】

ヒトの組換えFVIIaが開発され、Novo NordiskによってNovoSeven(登録商標)(eptacog alfa [activated], ATC code B02BD08)として市販されている。NovoSeven(登録商標)は、それぞれ、FVIIまたはIXに対する阻害抗体を発現した血友病AまたはB患者の出血症状の治療のために認可されている(Jurlander et al., Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 27: 373-383 (2001); Roberts et al., Blood, 15: 3858-3864 (2004))。この治療は、1996年に開始されてから安全で有効であることが分かっている。しかしながら、タンパク質のインビボでの半減期が比較的短い(2.3時間; Summary Basis for Approval NovoSeven(登録商標), FDA reference number 96-0597)ため、高投与量の製品(90 µg/kg)を複数回輸注(multiple infusions)することが、止血するためには1回の出血症状の間長持間かけて必要である。製品の短い半減期及び所望の治療効果を得るために必要とされる高投与量は、阻害剤で血友病患者を予防的に処置するためのNovoSeven(登録商標)の一般的な使用を妨げる。したがって、明らかに、半減期の長く、薬物動態(PK)及び薬効(PD)が向上した、FVIIa分子を開発する必要がある。

10

#### 【0012】

第VIII因子(FVIII)は、重要な血液凝固因子であり、抗血友病因子(AHF)としても知られている。ヒトでは、第VIII因子はF8遺伝子にコードされている。この遺伝子が欠損すると、約5000の男性のうち1人に発生する、劣性X染色体連鎖凝固障害としてよく知られる血友病Aになる。

20

#### 【0013】

前記X染色体に連鎖したF8遺伝子は、シグナルペプチドの開裂により2332アミノ酸の成熟FVIII分子を与えた後の26のエクソンから2351アミノ酸のポリペプチドをコードする(Wang et al. Int. J. Pharmaceutics, 259: 1-15 (2003))。FVIIIは、ヒトにおける放出の原発部位がどこであるか不明な部分があるが、血管、糸球体、および管状の内皮細胞、並びに肝類洞細胞により合成され、血流に放出されることを見出されている。前記FVIII分子は、6つのタンパク質ドメイン; NH<sub>2</sub>-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOHで構成されている。前記成熟分子は、N-結合およびO-結合のグリコシル化、スルホン化、およびジスルフィド結合形成を含む、多くの翻訳後修飾を含む。FVIIIは、タンパク質のAおよびCドメインにおいて、合計23のシステイン残基を含み、これらのうち16は8のジスルフィド結合を形成する(McMullen et al. Protein Science, 4:740-746(1995))。前記タンパク質の翻訳後修飾により、その循環分子量は、グリコシル化のレベルおよび型により、最高300kDaでありうる。前記循環種が重鎖(A1-A2-B)および軽鎖(A3-C1-C2)から構成されるヘテロダイマーとなるように、FVIIIはまた、タンパク質分解処理されている。FVIIIが循環内に分泌されると、FVIIIは非共有な形態でフォン・ヴィレブランド因子(vWF)と結合する。前記2つの分子の結合は、FVIIIの軽鎖のA3およびC2ドメインで生じる(Lacroix-Desmazes et al. Blood, 112:240-249(2008))。vWFへの結合は、FVIIIの安定性および循環半減期を増加させる。vWFへの結合は、FVIIIの循環半減期を増加させるが、FVIIIのもとの半減期は、15~19時間である。

30

40

#### 【0014】

第VIII因子は、内因系血液凝固経路に関わる重要な補因子である。その凝固カスケードにおける役割は、活性化した血小板表面の正確な空間的配位におけるFXase複合体の成分を構成するための「核形成鑄型」としての機能である(Shen et al. Blood, 111: 1240-1247(2008))。FVIIIは、はじめにトロンピン(第IIa因子)またはFXaにより活性化され、次いで、FVIIaの形態でvWFから解離する。FVIIaは次いで、活性化血小板と血管損傷した部位で結合し、A2およびA3を介した相互作用を通してFIXaと結合する。血小板表面のCa<sup>2+</sup>の存在下における前記FIXaのFVI

50

I Iへの結合により、約200000倍FIXaのタンパク質分解活性が向上する。この複合体は、次いで、FXをFXaに活性化する。次いで、第Xa因子は、補因子である第Va因子とともに、トロンピンをより活性化する。トロンピンは、次にフィブリノーゲンをフィブリンに分解し、これは、その後（第XIII因子を使用して）重合および架橋し、フィブリン血液凝固が生じる。

【0015】

もはやvWFによって保護されてない活性化FVIIは、前記工程においてタンパク質分解が不活性化され（主に活性化タンパク質Cおよび第IXa因子によって）、血流から速やかに除去される。

【0016】

第IX因子（クリスマス因子としても知られる）は、凝固系のセリンプロテアーゼであり、このタンパク質の欠乏は血友病Bの原因となる。第IX因子は、不活性なチモーゲン前駆体として生成され、これは続いてシグナルペプチドが除去処理され、その後、さらなるグリコシル化およびそれに続く第XIa因子または第VIIa因子による開裂が生じて、ジスルフィド架橋によって結合された2本鎖の形態を生成する（Scipio et al J Clin Invest. 1978; 61(6): 1528-1538）。第IXa因子として活性化されると、Ca<sup>2+</sup>、膜リン脂質、および第VII因子補因子の存在下で、第IX因子のアルギニン-イソロイシン結合を加水分解して第IXa因子を形成する。第IX因子は抗トロンピンによって阻害される。

【0017】

血友病Bは、第IX因子遺伝子における突然変異の過多によって引き起こされるX染色体連鎖出血性障害であり、有効な凝血促進剤（procoagulant）タンパク質の欠乏をもたらす。クリスマス病としても知られる血友病Bは、内因性のカスケードの正常な開始を妨げる、FIXが機能しない、または不足することによって引き起こされる。この状態とともに、深刻な、潜在的に生命に関わる出血性イベントが進行しうるが、この状態は適当な量のFIXの適時投与によって治すことができる。循環しているチモーゲンが治療域にあるかぎり、止血が維持されうる。

【0018】

歴史的に、血友病Bは、血漿FIXまたはプロトロンピン複合体濃縮物の静脈内送達によって、より最近では、高度に精製された血漿由来および組み換えFIXによって治療されてきた。チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）からの組み換えヒトFIXの出現は、クリスマス病の治療を、予防的治療が現在では特に小さい子供で可能であるという点で転換させた。しかしながら、この点での制限因子は、短い半減期および潜在的な「超効力」であり、これは予防的治療を約3日の間隔に制約していた。

【0019】

血液凝固（blood clotting）および他の障害を有する患者の治療を探索する医師が直面する問題のひとつは、このような患者に投与される血液凝固因子組成物などの治療薬の長期間持続する治療用投与量を達成する方法である。他の問題は、特にこのような薬剤の予防的使用において、体内における治療薬の注入、分布および消失の予測可能な、定常状態のレベルを維持し、したがって、薬剤およびその効果の両方のレベルにおいて、のこぎり歯の「バースト」または「ピーク」を避けることである。

【0020】

例えば、血液凝固の調節は、血液凝固の形成の失敗、および血栓症（thrombosis）、望ましくない血栓の形成、の両方を含む、多くの健康上の問題を引き起こす要素を含むプロセスである。望ましくない血栓（凝固）を防止する薬剤は多くの状況で用いられ、多様な薬剤が利用できる。残念ながら、ほとんどの現在の治療法は望ましくない副作用がある。経口投与されたワルファリンなどの抗凝血剤は、肝臓のビタミンKの作用を阻害することによって作用し、これによってビタミンK依存性タンパク質におけるグルタミン酸残基の完全なカルボキシル化を防ぎ、循環系における活性タンパク質の濃度が低くなり、凝固を形成する能力が低下する結果となる。ワルファリン療法は、薬剤のその標的と

10

20

30

40

50

の競合性によって複雑化される。食物中のビタミンKの変動は、ワルファリンの過剰投与または過少量投与という結果になりうる。凝固活性における変動は、この療法の望ましくない結果である。

【0021】

低分子ヘパリンを含むヘパリンなどの注入された物質もまた、一般に用いられている抗凝血剤である。再び、これらの化合物は過剰摂取しがちであり、注意深くモニターする必要がある。

【0022】

治療用ペプチドの有用性を制限する他の現象は、これらのペプチドのいくつかによって示される相対的に短いインピボの半減期である。全体に、インピボの半減期が短いという問題は、治療用糖ペプチドを高い頻度で、高い投与量で投与しなければならないということの意味し、これは最終的に、より高い局所副反応のリスク、および、糖タンパク質治療の治療上有効なレベルをより長く維持するためのより効率的な方法が利用できた場合に必要であろうコストよりも、高いヘルスケアコストに変換される。

10

【0023】

リンパ系を通じた治療薬の送達を確実にする能力は、薬剤の制御された注入を与える。親水性の増加はまた、酵素、免疫系などの分解による損傷からの分子の遮蔽を助ける。さらに、水中での移動度の増加は、治療薬をより生物学的に利用可能にし、必要とされる投与量をより少なくする。これは、結果的に、より少ない副作用、より効率的な治療、および医師の治療におけるより少ない費やす時間につながる。

20

【0024】

本発明者らは、驚くべきことに、本発明によって修飾され、皮下腔に送達されたとき、治療薬のより一貫した「定常状態」のレベルが全身的に達成されうることを示した。この「定常状態」の一貫性の増加は、代謝および/または免疫系低下 (immune system degradation) の速度とバランスを保った、リンパ系を介した血管系の中への導入 (すなわち注入) の速度、および腎臓またはGI管を介した消失速度の組み合わせによる。

【0025】

したがって、本発明による修飾された薬剤の皮下送達は、繰り返されるボラス注射 (bolus injection) 送達で一般にみられる「のこぎり歯」のピークおよび谷を軽減させることができる。しかしながら、 $C_{max}$  が静脈内注射によって達成されるものと同じになるように、より高い投与量が皮下送達によって投与されてもよく、この場合、リンパ系を通して血管系への注入のより遅い速度によって、修飾された薬剤の治療効果のより長い持続時間が達成されるであろう。したがって、本発明は、より頻度の低い投与をもたらしうる。または、静脈内送達のかわりに、本発明によって皮下送達を採用されると、より低い投与量で同じ投与頻度が想定されうる。

30

【0026】

つまり、一定の期間 (4日など) にわたって、修飾された薬剤の皮下投与された投与量の  $C_{max} : C_{average}$  の比は、同じ投与量が静脈内投与された場合よりも小さい。これは、血流中の修飾された薬剤のレベルがより一貫していることから、明らかに利点である。

40

【0027】

当業者が理解するように、より小さい  $C_{max}$  は、より小さい  $C_{max} : C_{average}$  比または  $C_{max} : C_{min}$  比 (すなわち、静脈内投与された薬剤の典型的な「のこぎり歯」プロファイルと比較して、ピークおよび谷が平坦化されたグラフ) と同様に、患者に有益でありうる。

【0028】

例えば、第VII因子は、この問題を明らかにし、修飾はその本発明の解決を示す。第VII因子および第VII因子は、ヒトで約2~4時間の循環半減期を有する。すなわち、2~4時間以内に、血清中のペプチド濃度は半分に減少する。第VII因子が凝

50

血促進剤として特定の形態の血友病の治療に用いられる場合、標準プロトコルは、V I I aを2時間ごとに、高い投与量(45~90 $\mu$ g/kg体重)で注射するものである。Hedner et al., Transfus. Med. Rev. 7: 78-83 (1993))を参照。したがって、これらのタンパク質の凝血促進剤または抗凝血剤(第V I I因子の場合)としての使用は、前記タンパク質が高頻度の間隔で、高い投与量で投与されることを必要とする。

【0029】

従来、バイオ医薬品の生体適合性ポリマーへの共役を用いて、このような治療用製品の物理化学的特性を改良するのに成功してきた。共役により改良されたタンパク質の特性としては、PK、PD及び免疫原性がある。化学的部分のタンパク質への結合は、その循環半減期を有意に増加できる(Jevsevar et al., Biotechnol. J., 5: 113-128 (2010))。糸球体濾過限界より下の分子量を有する分子種では、分子量の大きな部分の共役は、生成物の腎クリアランスを妨げる。また、化学的部分の薬剤製品への付加は、立体障害により分子のレセプターによる除去を妨げてしまう。

10

【0030】

治療薬をより親水性にする、生体適合性ポリマーなどの分子の修飾の使用はまた、導入された治療薬に対する免疫応答の低減または防止に役立つ。前記修飾は、薬剤の周囲に「水の遮蔽」を与え、これは免疫系が他に応答しうる任意のエピトープを「隠し」うる。修飾された治療薬の周囲の水分子の存在は、水溶液中でクラスレート構造を形成しうる。

20

【0031】

さらに、薬剤の皮下送達を可能にする修飾の使用によって、治療薬をリンパ系を通して体内に段階的に導入することが可能になり、大投与量のボラス注射または静脈内注入に伴う反応、特定の抗生物質の静脈内投与に伴う「レッドマン症候群」などを避けることができる。

【0032】

したがって、皮下送達のためにこのような治療薬を修飾することによって、その結果、それに続くリンパ系を通じた血管系への注入によって、多くの利点が予想されうる。

【0033】

したがって、本発明は、第1形態として、患者に治療薬を投与する方法であって、 $C_{max} : C_{average}$ 比が静脈内送達されたときの薬剤の $C_{max} : C_{average}$ 比よりも小さくなるように患者に前記治療薬を皮下投与することを含み、薬剤が、前記治療薬の本来の状態に対して親水性を増加させ、分子次元を調節するために修飾される、方法を提供する。皮下投与は、静脈内投与と比較して、治療期間の間、薬剤が患者の血流中により一定の濃度で存在するようにするものであり、 $C_{max} : C_{average}$ 比を低減することを可能にする。

30

【0034】

また、患者のリンパ系に治療薬を投与する方法であって、前記治療薬が注射部位で患者の循環系に直接入らないように前記治療薬を皮下投与する段階を含み、修飾された薬剤が投与部位から直接循環に入ることができないように、薬剤が、前記治療薬の本来の状態に対して親水性を増加させ、分子次元を調節するために修飾される、方法が提供される。

40

【0035】

さらに、患者に治療薬が皮下投与されたとき、前記治療薬が患者の局所循環系に直接入ることを防ぐ方法であって、患者に修飾された薬剤を皮下投与する段階を含み、薬剤が、前記治療薬の本来の状態に対して親水性を増加させ、分子次元を調節するために修飾される、方法が提供される。

【0036】

前記修飾された薬剤の皮下投与は、静脈内ボラス注射よりも、患者に投与する薬剤を高い投与量にすることを可能にする；修飾された薬剤が静脈内投与された場合よりも早く、患者に再投与することを可能にする；修飾された薬剤の静脈内投与よりも少ない、また

50

は同等の免疫原性応答が達成される；静脈内投与されたときの修飾された薬剤の治療効果よりも少なくとも12時間長い持続時間の治療効果を患者に与える；および、前記薬剤は、静脈内に安全に送達されうる修飾された薬剤の濃度よりも高い濃度で送達可能である。

【0037】

親水性は、少なくとも、未修飾の薬剤の分子次元に対する修飾された薬剤の分子次元の比によって増加する。親水性は、水に対する親和性として定義される親水性親油性バランス(HLB)を意味し、本明細書中では表面接着の能力がより低く、水中により高く分散することを示唆する。

【0038】

本発明の方法は、被験者の皮下デポ製剤から治療薬を送達するスピードを調節することを提供し、前記治療薬を修飾して前記治療薬の親水性を変化させることを含み、ここで、親水性のレベルがバイオアベイラビリティのレベルに比例する。

10

【0039】

驚くべきことに、皮下腔からのデポ放出の最長の持続時間を達成するためには、より少ない程度の修飾が必要とされることがわかった。理論によって拘束されることなく、これは、より少ない程度の修飾によって治療薬の一部が皮下組織にさらされ、これによってリンパを通じた拡散の速度が遅くなる、ということによって説明されうる。一方、より高い程度の修飾は、治療薬を完全に被覆し、生成物を自由に、血液循環に速やかに入れるようにする。

【0040】

また、バイオアベイラビリティは、モノ-修飾された種と比較して、より高次に修飾された、すなわち、ジ-またはトリ-修飾された種である、治療薬を支持することが示された。したがって、本発明者らは、修飾および水和レベルの程度が高いほど、高い程度の移動度、したがって、バイオアベイラビリティが促進されることを確認した。

20

【0041】

その結果、任意の治療薬に対して、皮下デポ製剤からの放出は、現在は、治療薬の修飾のレベルを増加させるまたは減少させることによって調整されうる。

【0042】

本発明によれば、皮下送達は、皮下注射、局所塗布、経皮パッチ、マイクロダーマルアプレーション、高圧乾燥粉末送達、または治療剤を皮下腔に導入するための任意の他の方法によるものであってもよい。

30

【0043】

本発明のさらなる形態は、第1のおよびさらなる形態に係る方法における使用のための、治療薬および修飾を含む修飾された薬剤を提供し、ここで、前記修飾は、前記治療薬の本来の状態に対して薬剤の親水性を増加させ、分子次元を調節する。薬剤の修飾は、治療薬の本来の状態に対して、薬剤の親水性を少なくとも50%、分子次元を少なくとも50%増加させうる。

【0044】

幾つかの市販されているバイオ医薬製品に使用されている生体適合性ポリマーの例としては、ポリエチレングリコール(本明細書中ではPEGと称する)がある。PEG分子を他の分子に共有結合させるプロセスは、PEG化(PEGylation)と称する。今日まで、9個のPEG化製品がFDAでマーケット認可があり、4つがブロックバスター薬剤(blockbuster drug)：PegIntron(登録商標)(Schering-Plough)、Pegasys(登録商標)(Hoffman-La Roche)、Neulasta(登録商標)(Amgen)及びMicera(登録商標)(Hoffman-La Roche)である。多くの異なる化学物質が、タンパク質治療剤を活性化PEG分子に共役するのに使用されてきた。ランダムPEG化を用いて、タンパク質のアミノ基を介してタンパク質にPEG部分を共有結合するのに成功した。結合部位は、もっとも頻繁に(ただし、これに限られない)、リジン残基の側鎖の $\epsilon$ -アミノ基であった。このようなランダムな反応により、PEG部分の結合数や結合部位が様々である共役体の非常に複雑な混合物が生産できる。ランダムな共役反応物の精製後であっても、位置異性体が存在してしまい、これに

40

50

より、非常に異なる物理化学的及び薬剤特性を示す。多くの部位特異的 P E G 化技術が開発され、現在、より良好に規定されたバイオ医薬品を生産するのに利用されている。部位特異的 P E G 化を行うのに使用されるアプローチとしては、N - 末端、システイン、グリカン、ジスルフィド及びポリヒスチジン標的 P E G 化(N-terminal, cysteine, glycan, disulphide and poly-histidine targeted PEGylation)がある。

【 0 0 4 5 】

ペプチド治療薬を誘導体化するための P E G の使用は、ペプチドの免疫原性を低下させることが示されている。例えば、U S 4 1 7 9 3 3 7 には、ポリエチレングリコール ( P E G ) またはポリプロピレングリコールに結合した、酵素およびペプチドホルモンなどの非免疫原性ポリペプチドが開示されている。免疫原性の低下に加えて、問題のポリペプチドの P E G - 共役体のサイズの増加のために、循環におけるクリアランス時間が長くなる。

10

【 0 0 4 6 】

P E G およびその誘導体のペプチドへの結合の主要な形態は、ペプチドアミノ酸残基を介した非特異的な結合である ( 米国特許第 4 0 8 8 5 3 8 号、米国特許第 4 4 9 6 6 8 9 号、米国特許第 4 4 1 4 1 4 7 号、米国特許第 4 0 5 5 6 3 5、および国際公開第 8 7 / 0 0 0 5 6 号を参照 ) 。 P E G をペプチドに結合させる他の形態は、糖ペプチド上のグリコシル残基の非特異的な酸化である ( 国際公開第 9 4 / 0 5 3 3 2 号を参照 ) 。

【 0 0 4 7 】

これらの非特異的な方法では、ポリエチレングリコールは、ポリペプチド骨格上の反応性残基に、ランダムに、非特異的に付加される。もちろん P E G 分子のランダム付加は、最終生成物の均一性の欠如およびペプチドの生物活性または酵素活性が低下する可能性を含む短所がある。したがって、治療用ペプチドの製造のために、特異的に標識された、容易に特徴づけられる、実質的に均質な生成物が得られる誘導体化戦略が優れている。

20

【 0 0 4 8 】

組み換え血液凝固因子 ( F V I I a、F V I I I および F I X など ) のような治療薬の P E G 化における状況は、以下のようにまとめることができる。W O 9 8 / 3 2 4 6 6 には、F V I I が P E G 化される可能性が示唆されているが、さらなる情報はない。U S 2 0 0 8 / 0 2 0 0 6 5 1 には、人工的に導入されたシステイン残基を介して共役した P E G 分子を有する野生型の、または活性の増加した F V I I ポリペプチドがインビボでの半減期が増加したことが示唆される。U S 2 0 0 8 / 0 2 2 1 0 3 2 には、インビボでの半減期が有意に増加した分子を生じる F V I I a - ポリシアル酸共役体の生産が記載される。U S 2 0 0 9 / 0 1 7 6 9 6 7 には、酵素が P E G 等の生体適合性ポリマーが結合する F V I I ポリペプチドの C 末端に特定の官能基を導入するのに使用できることが示唆される。U S 2 0 0 9 / 0 2 2 7 5 0 4 には、血清中の半減期が改善した 1 以上のアスパラギン - および / またはセリン - 連結オリゴ糖鎖が少なくとも 1 つの重合性基で共有結合により修飾される ( covalently modified ) F V I I a ( または F V I I a 様分子 ) の調製が記載される。U S 2 0 1 0 / 0 0 2 8 9 3 9 には、天然の糖タンパク質を、酵素であるガラクトースオキシダーゼを用いて修飾して、グリカンの末端に反応性アルデヒド機能性を生成させる方法が記載される。この反応性アルデヒドを、さらに用いて、重合性部分をタンパク質に共役させて、薬理学的特性が向上した製品を製造できる。U S 2 0 1 0 / 0 0 5 6 4 2 8 には、グリコシル基での P E G 等の重合性部分のオキシムによる糖タンパク質の誘導化によって、F V I I a で薬物動態特性の向上が達成できることが示唆される。F V I I I および F I X に関して対応する報告が出版されている。それぞれ、U S 2 0 0 8 / 0 2 5 5 0 2 6 および U S 7 6 8 3 1 5 8 を参照のこと。

30

40

【 0 0 4 9 】

タンパク質の P E G 化の他のアプローチは、Polythericsによって開発され、P E G ポリマーをタンパク質の 1 対のシステイン残基の還元ジスルフィド結合を介して有用なタンパク質に結合したTheraPEG ( 商標 ) として知られている ( W O 2 0 0 5 / 0 0 7 1 9 7 ) 。この技術を用いることにより、第 F I X a 因子の混入のない第 I X 因子の P E G 化形

50

態 ( W O 2009 / 130602 )、PEG化第VII因子 ( W O 2011 / 135308 ) およびPEG化第VII因子 ( W O 2011 / 135307 ) を調製した。

【0050】

現在では、本発明者らによって、血液凝固因子のPEG化形態のような修飾された治療薬の皮下投与は、特に「投与量調節された」とき、静脈内投与によって送達された等価形態と比較して、半減期が改善され、血漿中で活性が持続する結果をもたらすことが見出された。皮下注射が与えられる特定の位置は、修飾された薬剤が血液系に現れる開始時間を増加または減少させうる。いずれにしても、より低い  $C_{max} : C_{average}$  比が達成される；通常は持続放出製剤などに伴って、同様の薬物動態プロファイルがみられる。未修飾の治療薬を皮下投与することの不利益は、心臓血管系に直接入れることであり、したがって得られた  $C_{max}$  および持続時間は皮下注射の部位の血管の状態に大きく依存する。高度に血管新生された領域は、薬剤が皮下注射によってその領域に投与されたとき、より血管新生されていない領域への注射と比較して、明らかにある量の薬剤をより速く取り込むであろう。このような矛盾は、本発明の修飾された薬剤の皮下投与のための使用によって解決されうる。

10

【0051】

本発明による修飾された治療薬の提供は、リンパ系を通過して心臓血管系に送達される分子を与え、したがって注射部位の血管系に関係なく、リンパ系を通過して循環へのより予測可能な、一定の送達速度につながる。

【0052】

血液凝固因子を含む治療薬の薬剤についての当該分野での従来からの推論は、皮下投与のためにこのような因子を製剤することから導かれうる利点を認識していない。特に、このような製剤は皮下投与されると、長期間の正常止血をもたらす、維持しうること、または、定常的な注入効果が達成されることにより、薬剤のバイオアベイラビリティ (より低い  $C_{max} : C_{average}$  比) のより安定なレベルをもたらすこと、について、暗示も示唆もない。リンパ系は血管壁がコラーゲンを含む水性流体を提供する。血管壁を通過するには大きすぎる任意の分子は、血流に到達するためにリンパ液を頼る必要がある。しかしながら、分子にある程度の疎水性が存在すると、リンパ系に入る前およびリンパ管壁への両方で組織に付着しやすく、したがって体液中で固定されるであろう。一方、親水性部分が与えられると、修飾された薬剤は、リンパの水相により速やかに分散され、系に容易に流出し、胸管で血流に入るであろう。

20

30

【0053】

任意の形態の治療薬は、小分子、高分子、ポリマーおよびポリペプチドであってよく、ここで小分子は、催眠薬および鎮静剤、不整脈治療剤、酸化防止剤、抗喘息薬、避妊薬を含むホルモン剤、交感神経様作用薬、利尿薬、脂質調節剤、抗アンドロゲン剤、駆虫剤、抗凝血剤、腫瘍薬、抗腫瘍薬、血糖降下薬、精神賦活薬、精神安定剤、呼吸薬、抗痙攣薬、筋弛緩剤、抗パーキンソン薬 (ドーパミン拮抗薬)、サイトカイン、成長因子、抗癌剤、抗血栓剤、抗高血圧剤、心血管治療薬、鎮痛剤、抗炎症剤、抗不安薬 (不安緩解剤)、食欲抑制薬、抗片頭痛薬、筋収縮剤、抗感染薬 (抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、ワクチン)、抗関節炎薬、抗マラリア剤、制吐剤、抗てんかん薬、気管支拡張剤、栄養剤および栄養補助剤、成長補助剤、抗腸炎剤、ワクチン、抗体、診断用薬および造影剤を含む。

40

【0054】

本発明での使用に適した薬剤の例としては、特に制限されないが、カルシトニン、エリトロポイエチン (EPO)、セレデース (ceredase)、セレザイム (cerezyme)、シクロスポリン、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、トロンボポイエチン (TPO)、アルファ-1プロテインゼ阻害剤、エルカトニン (elcatonin)、顆粒細胞マクロファージ・コロニー刺激因子 (GM-CSF)、成長ホルモン、ヒト成長ホルモン (HGH)、成長ホルモン放出ホルモン (GHRH)、ヘパリン、低分子ヘパリン (LMWH)、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、イン

50

ターロイキン - 1 受容体、インターロイキン - 2、インターロイキン - 1 受容体拮抗薬、  
 インターロイキン - 3、インターロイキン - 4、インターロイキン - 6、黄体形成ホル  
 モン放出ホルモン (LHRH)、第IX因子インスリン、プロインスリン、インスリン類似  
 体 (例えば米国特許第5,922,675号に記載されるモノアシル化インスリン)、ア  
 ミリン、C-ペプチド、ソマトスタチン、オクトレオチドを含むソマトスタチン類似体、  
 バソプレッシン、卵胞刺激ホルモン (FSH)、インスリン様成長因子 (IGF)、イン  
 スリントロピン (insulintropin)、マクロファージ・コロニー刺激因子 (M-CSF)、  
 神経成長因子 (NGF)、組織成長因子、ケラチノサイト成長因子 (KGF)、  
 グリア成長因子 (GGF)、腫瘍壊死因子 (TNF)、内皮成長因子、副甲状腺ホル  
 モン (PTH)、グルカゴン様ペプチドチモシン 1、IIB/IIIA阻害剤、  
 1アンチトリプシン、ホスホジエステラーゼ (PDE) 化合物、VLA-4 阻害剤、ピス  
 ホスホネート、呼吸器合胞体ウイルス抗体、嚢胞性線維症膜貫通制御因子 (CFTR) 遺  
 伝子、デオキシリボヌクレアーゼ (Dnase)、カルベニシリン、チカルシリン、アズ  
 ロシリン、メズロシリンおよびピペラシリンのような抗緑膿菌性ペニシリン；セフボドキ  
 シム、セフプロジル (cefprozil)、セフチブテン (ceftibuten)、セ  
 フチゾキシム、セフトリアキソン (ceftriaxone)、セファロチン、セファピ  
 リン、セファレキシン、セフラドリン (cephradrine)、セフォキシチン、セ  
 ファマンドール、セファゾリン、セファロリジン、セファクロール、セファドロキシム、  
 セファログリシン、セフロキシム、セフォラニド (ceforanide)、セフォタキ  
 シム、セファトリジン、セファセトリル (cephacetriple)、セフェピム、  
 セフィキシム、セフォニシド、セフォペラゾン、セフォテタン、セフメタゾール、セフタジ  
 ジムなどのセファロスポリン、ロラカーベフ (loracarbef) およびモキサラク  
 タム、アズトレオナムなどのモノバクタム；殺菌性/透過性増加タンパク質 (BPI)、  
 抗-CMV抗体、13-シス・レチノイン酸、マクロライド、例えば、エリスロマイシン  
 、オレアンドマイシン、トロレアンドマイシン、ロキシスロマイシン、クラリスロマイシ  
 ン、ダベルシン (davericin)、アジスロマイシン、フルリスロマイシン (flu  
 rithromycin)、ジリスロマイシン、ジョサマイシン、スピラマイシン (sp  
 iramycin)、ミデカマイシン、ロイコマイシン、ミオカマイシン、ロキタマイシ  
 ン、及びアジスロマイシン、及びスウィノライドA (swinolide A)；フルオ  
 ロキノロン、例えば、シプロフロキサシン、オフロキサシン、レボフロキサシン、トロバ  
 フロキサシン、アラトロフロキサシン (alatrofloxacin)、モキシフロキ  
 シン、ノルフロキサシン、エノキサシン、グレパフロキサシン、ガチフロキサシン、ロメ  
 フロキサシン、スパルフロキサシン、テマフロキサシン (temafloxacin)、  
 ペフロキサシン (pefloxacin)、アミフロキサシン (amifloxacin)  
 )、フレロキサシン、トスフロキサシン、プルリフロキサシン、イロキサシン (irlo  
 xacin)、パズフロキサシン、クリナフロキサシン (clinafloxacin)  
 )、およびシタフロキサシン、アミノグリコシド、例えば、ゲンタマイシン、ネチルマイシ  
 ン、パラメシン、トブラマイシン、アミカシン、カナマイシン、ネオマイシン、及びスト  
 レプトマイシン、バンコマイシン、テイコブラニン、ランボラニン (rampolanin)  
 )、ミデプラニン (midепlanin)、コリスチン、ダプトマイシン、グラミシ  
 ジン、コリスチメテート (colistimethate)、ポリミキシン類、例えば、  
 ポリミキシンB、カプレオマイシン、パシトラシン、ペネム系抗生物質；ペニシリン系抗  
 生物質、例えば、ペネシリナーゼ感受性薬剤、例えばペニシリンG、ペニシリンV、ペニ  
 シリナーゼ-抵抗性薬剤、例えばメチシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキ  
 サシリン、フロキサシリン (floxacillin)、ナフシリン；アンピシリン、ア  
 モキシシリン、及びヘタシリン、シリン、及びガルアンピシリン (galampicillin)  
 ) などのグラム陰性微生物活性薬剤；並びにカルバペネム、例えばイミペネム、メ  
 ロペネム、ペンタミジン・イソチオウエート (isethiouate)、アルブテロー  
 ル硫酸塩、リドカイン、硫酸メタプロテレノール、ベクロメタゾン・ジブレピオネート (d  
 iprepionate)、トリアムシノロンアセトアミド、ブデソニド・アセトニド

10

20

30

40

50

、フルチカゾン、イプラトロピウムブロミド、フルニソリド、クロモリンナトリウム、エルゴタミン酒石酸塩、および適用可能であれば、上記の抗生物質、血液因子、ホルモン、成長因子、他の治療用ペプチドもしくはタンパク質、またはモノクローナル抗体もしくは小分子の、類似体、アゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤、及び製薬上許容される塩の形態が挙げられる。好ましくは、修飾される薬剤は、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子およびプロテインCからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、血液凝固因子は、好ましくは第VII因子、第VII因子または第IX因子である。

【0055】

本発明による薬剤は、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリ-ホスファチジルコリン(PC)、ポリプロピレングリコール(PPG)、エチレングリコールとプロピレングリコールとの共重合体、ポリエチレンオキッド(PEO)、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリオレフィンアルコール、ポリヒドロキシアルキルメタクリレート、多糖、ポリ(-ヒドロキシ酸)、ポリビニルアルコール、ポリホスホスファゼン(polyphosphazene)、ポリ(N-アクリロイルモルホリン)、ポリアルキレンオキッドポリマー、ポリマレイン酸、ポリ(DL-アラニン)、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、デンプンまたはデンプン誘導体、ヒアルロン酸、キチン、ポリメタクリレート、ポリシアル酸(PSA)、ポリヒドロキシアルカノエート、ポリアミノ酸およびこれらの組み合わせなどの任意の生体適合性ポリマーによって修飾される。生体適合性ポリマーは直鎖または分岐鎖の構造を有する。

【0056】

さらなる実施形態において、生体適合性ポリマーは、特に制限されないが、アルブミン、トランスフェリン、モノクローナル抗体、抗体断片、例えば、単ドメイン抗体、V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab3、scFv、di-scFv、sdAb、Fc及びこれらの組み合わせ等の免疫グロブリンからなる群から選択されるタンパク質である。

【0057】

いくつかの実施形態において、皮下送達された修飾された治療薬の増加した親水性/溶解性は、薬剤が静脈内送達された場合よりも送達媒体中に高い濃度で含まれることを可能にする。このことによって、薬剤製品が注射によって投与された場合、使用される注射体積をより小さくすることができ、皮下投与により適する。加えて、未修飾の薬剤が自己触媒しうると予想されるより高い濃度で、前記修飾は薬剤の自己消化(未修飾の形態では望ましくない、危険な副生成物をもたらす)を防ぐ。例えば、未修飾の血液因子IXは、高濃度で自己触媒して第IXa因子を生成するが、これは血栓形成の危険がある。

【0058】

したがって、本発明の他の形態において、修飾された治療薬の皮下送達体積は、2ml以下である。好ましくは、送達体積は、5μl、10μl、25μl、50μl、100μl、250μl、500μl、750μl、または1mlでありうる。他の実施形態において、薬剤の送達体積は、1.5ml、2ml、2.5ml、3.0mlまたは3.5ml以下でありうる。本発明は、患者の血流に直接送達されないため、静脈内注射よりも、1回の皮下注射で送達される活性薬剤をより高い濃度に、より安全にできることに注意することは重要である。高い濃度で静脈内投与される血液凝固因子は、患者に望ましくない、危険な血栓をもたらすため、このことは血液凝固因子を扱うときに特に重要である。皮下送達によって、活性薬剤のリンパ系を通じた血流への定常的な注入が可能になり、そのため危険なレベルの活性薬剤が血液系に直接送達される影響を避けることができる。したがって、血流への薬剤の送達濃度が患者のリンパ系によって調節されているため、皮下投与の投与量において、より高い濃度で送達することができ、これによって静脈内送達に従来用いられていたよりも使用される体積を少なくできる。

【0059】

10

20

30

40

50

血管壁を通過して血管系に直接入ることを防ぐために、親水性修飾によって修飾し、親水性を増加させ分子次元を調節することができ、リンパ系を通過して循環系に到達するために、皮下投与によって患者に投与可能な薬剤が、本発明の範囲に含まれる。このような薬剤を修飾する方法もまた本発明に含まれる。

【0060】

本発明の投与形態は、少なくとも1日1回、少なくとも1日2回、およそ週1回、およそ週2回、およそ2週間に1回、またはおよそ月1回の投与のためのものでありうる。皮下デポ製剤からの修飾された治療薬の放出速度を調節(modulate)できるということは、投与がより便利に制御されうることを意味する。

【0061】

特定の治療用物質において、1日1回の投与量レジメは十分でありうるが、他のものでは、より頻度の高い投与量レジメがより適当であるか、望ましい場合があり、このとき、各投与量の皮下投与で送達される量は、標準的な静脈内投与量に対して低減されうる。そのため、例えば、本発明の投与形態は、1日1回、1日2回(必要に応じてそれよりも多く)、投与されうる。

【0062】

本発明によれば、血中の薬剤濃度の急激な上昇およびそれに続く下降(すなわち「のこぎり歯」)を防ぐことができる。本発明は、患者の血液中にてより一定な、予測可能な薬剤濃度を、未修飾の薬剤または同じ修飾された生成物が繰り返し静脈内に送達されたときに従来みられたものよりも、長期間にわたって提供する。

【0063】

本発明のさらなる利点は、安全に静脈内投与される投与量よりも、皮下投与される薬剤の投与量を高くすることができることである。これは、静脈内送達によるより高い投与量での投与またはより高頻度での投与によって、通常、安全に達成されうるものよりも、より長い持続時間の治療効果の提供をもたらす。例えば、血液因子の場合、生成物は胸管を通過して鎖骨下静脈に送達されるため、この方法は、一回限りで静脈に静脈内投与されうるよりも、1回の投与量で、一回限りでより大量の生成物を皮下投与することを可能にする。高投与量ポータスの静脈への送達は、望ましくない血栓事象の原因となりうる。

【0064】

本発明のさらなる利点は、薬剤の血中濃度が一定のレベルに維持される間隔で前記薬剤の再投与を可能にし、これは持続性の、一定であり予測可能な治療効果が提供され、血中における薬剤の濃度が治療上適切でないレベルに落ちるまで再投与を待つ必要がない。従来の方法では、静脈内の再投与は、その即時の $C_{max}$ および作用の開始とともに、治療薬のレベルが、新たな注射からの $C_{max}$ の追加が潜在的に血栓形成(thrombogenic)レベルに到達しないレベルまで落ちたとみなされるまで遅らされる(すなわち有害事象のリスクを減少させる)が、しかしながら、これは、患者が彼または彼女の血流における薬剤のレベルの「不健康な」領域に達することを意味する。つまり、「健康なレベル」または、治療上有効なレベルの薬剤が依然として血流中に存在する間は、薬剤の後続の投与量は通常は患者に与えられない。しかしながら、本発明は、薬剤の血中濃度は依然として治療上有効な領域にありながら、薬剤の再投与を行うことを可能にし、したがって本発明は、血流中のタンパク質のより一定な治療上のレベルを提供し、すなわち、より理想的に予防に適する。胸管を通した血流への薬剤の一定の送達によって、薬剤が血流中で望ましくない高いレベルまで増加するという問題が回避される。

【0065】

本発明の一形態によれば、皮下投与のための修飾された血液凝固因子の薬剤組成物の投与形態であって、患者への皮下投与のために製剤されたとき、前記患者の全血凝固時間を20分以下に維持するのに十分な、1か月に1回以下の投与形態を提供する、投与形態が提供される。また、1か月に1回以下の皮下投与のための、PEG化された血液凝固因子の液体の投与形態であって、前記投与形態は、静脈内投与されるときに等価参照投与形態と比べて少なくとも10%であり、90%以下である $C_{max}$ を有する、血液凝固障害

10

20

30

40

50

の治療における使用のための、投与形態が提供される。好ましくは、 $C_{max}$  は、20～80%、または30～70%、または40～60%である。好ましくは、血液凝固因子はFVII、FVIIIまたはFIXでありうる。

【0066】

「以下」は、投与形態が、所定の期間よりも高い頻度で投与されうることを意味するが、そうしなくてもよい：このような投与形態の皮下投与の効果は、前記効果は前記期間の持続時間でみられることを意味する。しかしながら、より低く、一定な $C_{max}$ により、患者への副作用がなく、より高い頻度の投与が生じうる。

【0067】

好ましくは、血液凝固因子の投与形態は、前記患者における全血凝固時間を15分未満、または好ましくは12分未満に維持するのに十分でありうる。一実施形態において、血液凝固因子の投与形態は、少なくとも週1回の投与形態、または少なくとも月1回、少なくとも2週間に1回、少なくとも1/2週間に1回の投与形態である。

10

【0068】

本発明に係る投与形態は、第VIIa因子、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第XIII因子、第V因子、ヴォン・ヴィレブランド因子およびプロテインCからなる群から選択される血液凝固因子を含みうる。好ましくは、血液凝固因子はFVII、FVIIIまたはFIXでありうる。

【0069】

本発明の投与形態は、本明細書中に定義されるように、任意の生体適合性ポリマーによって修飾されうる。好ましくは、修飾はPEG化である。

20

【0070】

前記投与形態は、静脈内投与される等価参照 (equivalent reference) 投与形態と比べて少なくとも10%であり、90%以下の $C_{max}$ を有しうる。特定の実施形態において、前記投与形態は、静脈内投与されるときの等価参照投与形態と比べて10～25%の $C_{max}$ を有しうる。特定の実施形態において、前記投与形態は、静脈内投与されるときの等価参照投与形態と比べて40～60%の $C_{max}$ を有しうる。特定の実施形態において、前記投与形態は、静脈内投与されるときの等価参照投与形態と比べて75～80%の $C_{max}$ を有しうる。特定の実施形態において、前記投与形態は、静脈内投与されるときの等価参照投与形態と比べて75～78.8%の $C_{max}$ を有しうる。一実施形態において、 $C_{max}$ は75～80%であり、血液因子はFVIIでありうる。他の実施形態において、 $C_{max}$ は10～25%であり血液因子はFVIIIでありうる。さらに他の実施形態において $C_{max}$ は40～60%であり血液因子はFIXでありうる。

30

【0071】

また、投与量が1～1000 IU/kg、または5～500 IU/kg、または100～250 IU/kg、または25～50 IU/kgである、本発明に係る投与製剤が提供される。

【0072】

本発明の投与形態は、投与形態の投与頻度を少なくすることができ、それでも患者の全血凝固時間を20分以下、または15分以下、または10分以下に維持するのに十分である。一実施形態において、投与形態は全血凝固時間を12分未満に維持するのに十分である。投与形態は、2週間に1回以下、1週間に1回以下、1週間に2回以下、3日ごとに1回以下、2日ごとに1回以下、1日1回以下、またはそれ以上もしくは以下の頻度の投与形態を提供しうる。

40

【0073】

本発明のひとつの利点は、薬剤が血液凝固因子である場合の製剤は、全血凝固時間を健康な範囲に維持し続けるための間隔よりも高い頻度で患者に投与する必要はないが、制御放出製剤のものと同様の「定常状態」の提供を助けるために、より高い頻度で投与されてもよいことである、ということに注意することは重要である。「正常な」全血凝固時間は

50

、通常、当業者には10～12分と考えられ、血友病ではないヒトでは15分を下回れば健康であると考えられる。全血凝固時間が20分を超えると、健康ではない領域にあると考えられる。15～20分は、出血は制御されているが正常ではないことを意味すると考えられる。

【0074】

他の実施形態において、前記投与形態は、ポラス静脈内注射の血漿半減期から予測されるよりも少ない頻度で投与される。例えば、修飾された第IX因子のポラス注射は週1回必要でありうるが、本発明によって皮下送達される同じ薬剤は、10日に1回以下しか必要とされない。

【0075】

本発明のさらなる形態によれば、静脈内投与される血液凝固因子と同じか、より少ない頻度での皮下投与のための、25～50IU/kgの修飾された血液凝固因子の薬剤組成物の投与形態が提供される。

【0076】

したがって、本発明の薬剤は、止血の正常値を7日まで維持することができる。ここで正常値は、15分未満、好ましくは約12分以下の全血凝固時間(WBC T)として定義される。

【0077】

本発明の薬剤は、静脈内投与されるときに等価参照(equivalent reference)投与形態と比べて少なくとも10%であり、90%以下である $C_{max}$ を有する。本発明のいくつかの実施形態において、前記値は少なくとも75%、78%または80%であってよく、血液因子はFVIIでありうる。本発明のいくつかの実施形態において、前記値は少なくとも15%、18%または20%であってよく、血液因子はFVIIでありうる。本発明のいくつかの実施形態において、前記値は40%、45%または50%であってよく、血液因子はFIXでありうる。

【0078】

修飾された薬剤がPEG化血液因子である本発明の特定の実施形態の薬剤は、1か月に1回以下の皮下投与のために製剤される場合、25～50IU/kgの投与量を含む。いくつかの実施形態において、投与量は、25、30、35、40、45または50IU/kgでありうる。投与量は、25～30IU/kg、35～40IU/kgまたは40～

【0079】

一実施形態において、150IU/kgの投与量で投与形態が調製されたとき、前記薬剤は、必要とする患者に2週間ごとに1回投与するのに適する。好ましくは、前記薬剤は、2週間ごとに1回以下の投与のためのものでありうる。

【0080】

本発明の一実施形態によれば、修飾された血液凝固因子の投与形態は、皮下投与のために製剤されると、少なくとも1/2週間は維持される正常止血を与えうる。

【0081】

本発明による投与形態は、皮下投与されると、同じ治療上のエンドポイントを達成するために必要な修飾された血液凝固因子の量が少なくなり、したがって治療を必要とする患者のためのより安全な製品を提供される。一実施形態において、静脈内投与される修飾された血液凝固因子の調節された投与量の半分で、特に、血液凝固因子が第VIIa因子または第VII因子であるとき、患者において少なくとも1週間、正常止血を達成するのに十分である。正常止血の適した値は、上述のように、全血凝固時間(WBC T)が約12分である。

【0082】

本発明の薬剤は、好ましくは、同じ治療効果を達成するために、同様に修飾された血液凝固因子を含む静脈内投与のために製剤された参照薬剤の、投与量調節された治療上有効な量の半分未満を含みうる。例えば、血液凝固因子が第IX因子である実施形態において

10

20

30

40

50

。

【0083】

したがって、本発明はまた、修飾された血液凝固因子の皮下投与のための投与形態を提供し、ここで、前記投与形態は、有効な作用の同じ持続時間を達成するために静脈内投与で必要とされる投与量調節された量の50%を含む。

【0084】

皮下投与に適した製剤は、好ましくは水性または実質的に水性の製剤として調製される。前記製剤は、必要に応じて、このようなさらなる塩、保存料、および安定剤および/または賦形剤またはアジュバントを含みうる。本発明の投与形態は、適当な水性媒体にすぐに製剤できる状態の無水の粉末として提供されてもよい。

10

【0085】

このような投与形態を緩衝水性製剤 (buffered aqueous formulation) として製剤することが一般的に好ましい。適した緩衝溶液としては、特に制限されないが、アミノ酸 (例えばヒスチジン)、無機酸とアルカリ金属またはアルカリ土類金属との塩 (例えばナトリウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、リチウム塩、またはカルシウム塩、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウムなど) が挙げられる。浄化剤または乳化剤 (例えば Tween 80 (登録商標) または Tween (登録商標) の任意の他の形態) などの他の成分が存在してもよく、安定剤 (例えばベンズアミジンまたはベンズアミジン誘導体)、糖 (例えばスクロース) などの賦形剤もまた存在しうる。pHの適した値は生理的pH、例えばpH6.8~7.4である。液体の投与形態は、このような投与用ビヒクルにおいて使える状態に調製されうる。

20

【0086】

「修飾された血液凝固因子」は、上記の1以上の修飾剤に結合した血液凝固因子である。いくつかの実施形態において、修飾はPEGである。PEG分子は、直接的または間接的に血液凝固因子に結合しうる。PEG化血液凝固因子はまた、「PEG分子に共役した血液凝固因子」または「血液凝固因子-PEG共役体」として定義されうる。

【0087】

修飾された血液凝固因子は、好ましくは、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子およびプロテインCの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態において、血液凝固因子は、好ましくは第VII因子、第VII因子または第IX因子である。

30

【0088】

本明細書中で用いられる場合、「血液因子共役体」の用語は、PEG部分、上記で定義された他の共役部分などの修飾を含むように修飾された、血液凝固因子タンパク質を意味する。

【0089】

第VIIa因子 (FVIIa) および第VII因子 (FVII) の用語はまた、特にことわりがない限り、区別しないで用いられる。FVIIは第VII因子の省略形として用いられ、FIXは第IX因子の省略形として用いられ、本明細書中に記載される血液因子も同様である。

40

【0090】

血液凝固因子は、任意の適当な源からであってよく、分子生物学的手法を用いた組み換えDNA技術によって製造された組み換えタンパク質であってよく、化学的に合成されてもよく、または哺乳類の乳において遺伝子組み換えで製造されてもよく、または、前記因子は天然の源から単離されてもよい (例えば血漿から精製される)。好ましくは、前記因子は哺乳類の血液凝固因子、例えばヒト血液凝固因子である。血液凝固因子 (blood clotting factor) への言及は、血液凝固因子 (blood coagulation factor) を含む。

【0091】

50

本明細書中に示されるように、本発明は、ポリエチレングリコールポリマー（「PEG化」）などの1以上の修飾剤との共役によって修飾された血液凝固因子の製剤に関する。血液凝固因子の修飾は任意の便利な手段によるものであってよい。

【0092】

Tween（登録商標）は、現在、血液製品の製剤に広範に用いられている。Tween（登録商標）80は、Tween（登録商標）分子あたり約0.8キログルトンのPEG当量の分子量を有するPEG化脂肪酸である。

【0093】

上述のように、血液因子はすべて、とりわけ表面接着の特性により特徴づけられる。これは、凝固カスケードの必要な特性であり、酵素および補因子が損傷部位においてカスケードの他の関与物質に、血小板表面に、および組織に接着することを必要とする。実際に、血液凝固（血栓）が損傷部位に残り、移動して危険な血栓症を引き起こさないことは特に重要である。VIIa、VIIIおよびIXなどの血液因子は任意のガラスおよびプラスチック表面に過剰に接着するため、この性質は薬剤製品の製剤において課題を与える。実際的な観点では、これはポリソルベート（例えばTween（登録商標）80）の広範な使用によって軽減される。

10

【0094】

本発明の一実施形態において、FVIIはこれに共役する20kDaの直鎖ポリエチレングリコール部分を有する。PEGの共役は、Tween（登録商標）のさらなる使用が必要ない範囲まで、この因子の表面接着特性を軽減する。

20

【0095】

凝固（coagulation）のプロセス中に活性化されると、PEG-FVIIは、依然として血小板の表面に接着し、全体の凝固プロセスにおいて小さな成分である。この際、血液凝固（血栓）は、損傷部位で血小板上に正常に形成されるであろう。

【0096】

モノ-PEG化因子を有することによって、そして製剤においてさらなるTween（登録商標）の必要性をなくすことによって、ポリエチレングリコールの量の減少が達成されうる。Kogenate（登録商標）FS（Bayer FVII）を用いた計算は、製剤に使用されるFVIIの1モルあたりのPEGの総量を同定し、製剤にさらなるTween（登録商標）を必要としない、単一の共役された20kDaの部分と比較するために行われた。したがって、dose-for-dose基準では、本発明の一実施形態はポリエチレングリコールの25.8倍の減少を与え、これは、投与頻度の減少をも考慮すると、PEGの投与において約80倍の全体的な減少をもたらさう。

30

【0097】

本発明者らは、標的治療薬の水保持能力（water-carrying capability）を増加させる（例えば生成物をモノ-PEG化することに対して、ジ-PEG化することによって）ことによって、皮下投与後の生成物の血流への通過が加速されることを見出した。逆に、水保持能力を減少させることによって（例えば生成物をジ-PEG化することに対して、モノ-PEG化することによって）、皮下投与後の生成物の血流への通過が遅くなり、貯蔵効果を与えうる。理論に拘束されることなく、より小さい水保持能を有する（例えばモノ-PEG化によって、またはより小さいPEG分子を用いて）同じ生成物は、より大きい水保持能力を有するように修飾された（例えば、多-PEG化によって、またはより大きいPEG分子の結合によって）同じ生成物よりも、皮下腔を通過してより長く分散されることに抵抗し、したがって高い貯蔵効果を与えるものと考えられる。

40

【0098】

理論に拘束されることなく、生成物がより大きい水保持能力を有するように設計することによって（例えばジ-または多-PEG化によって、PEGのサイズを増加させることによって、または直鎖PEG分子に対して分岐したものをを用いることによって、PEG被覆を増加させることによって）、皮下腔内でより水分散性が高くなり、リンパ管を通過

50

血漿へ入る速度が速くなるものと考えられる；より小さい水保持特性を有するように設計された生成物（例えばモノ-PEG化によって、またはより小さいPEG分子の使用によって）の低減された親水性は、疎水性の治療薬のより多くを露出させたままにして、その分散性を低下させ、水性リンパ系を通じたその血漿への導入を遅くするものと考えられる。

#### 【0099】

皮下投与のために、親水性と疎水性との間のバランスを選択的に調節することで分子の分散特性を調節するこの能力は、皮下腔からリンパを通して血漿への生成物の制御放出にわたって見事な制御の度合を与え、これは治療薬の特徴、患者の必要性および生理、これらの組み合わせ、または他の影響を与える因子にしたがって調節されうる。

10

#### 【0100】

いくつかの実施形態において、修飾がPEGである場合、ポリエチレングリコール（PEG）は直鎖または分岐した構造を有してもよく、任意の便利な経路を介して治療薬に結合しうる。治療薬がタンパク質、例えば、本明細書中に記載されるような血液凝固因子または治療用タンパク質である場合、PEGの共役は、天然タンパク質のセリンまたはトレオニン残基を介した、天然タンパク質に結合した糖残基上のヒドロキシル残基を介した、または1以上のシステイン残基を介したものでありうる。PEG部分は、天然または組み換え型のタンパク質において生じるこのような残基を介して結合されてもよい。組み換え発現によって作製されたタンパク質は、所望のアミノ酸残基をタンパク質配列に挿入するための、および/または特異的な（*specific*）グリコシラーゼ酵素を用いてグリコシル化のパターンを制御するための、部位特異的なエンジニアリングを可能にする。PEG化の他の経路としては、アミドまたはN-末端アミノ基PEG化、カルボキシル基PEG化がある。

20

#### 【0101】

PEG部分はまた、1以上の還元されたシステインジスルフィド結合を介して血液凝固因子、すなわち、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCに共役しうる。遊離システイン残基は、タンパク質のシステインジスルフィド結合の還元によって生じる。例えば、前記共役は、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCにおいてジスルフィド結合を形成する2つのシステイン残基の硫黄残基に架橋するリンカー基によるものでありうる。したがって、ジスルフィド結合は、天然のジスルフィド結合または組み換え技術によって導入されたジスルフィド結合でありうる。

30

#### 【0102】

本発明の一実施形態において、ポリエチレングリコール鎖などの親水性部分は、通常は血液凝固因子の本来の形態（*native form*）におけるジスルフィド架橋を形成する2つのシステイン残基の間の二価のリンカー部分を介して結合される。

#### 【0103】

PEG分子は、任意の適当な分子量、例えば1kDa~100kDa、10~500kDa、適当には5~30kDaまたは20~30kDaのものでありうる。いくつかの適当な分子量としては、5、10、20または30kDaが挙げられる。適当には、PEG分子は5kDa~40kDaでありうる。

40

#### 【0104】

第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCとの共役体を形成するであろうポリエチレングリコールポリマーはいくつかの異なるタイプがある。単一ポリエチレングリコール鎖を有する直鎖のPEGポリマーがあり、分岐鎖のまたは分岐した（*multi-arm*）PEGポリマーがある。分岐鎖のポリエチレングリコールは、統一基（*unifying group*）を介して一緒に結合する2

50

以上の別の直鎖のPEG鎖を含む。例えば、2個のPEGポリマーがリジン残基によって一緒に結合してもよい。一方の直鎖のPEG鎖が - アミノ基に結合し、他方のPEG鎖が - アミノ基に結合する。リジンコアの残りのカルボキシル基は、タンパク質に共有結合するために利用可能な状態で残っている。双方の直鎖及び分岐鎖のポリエチレングリコールポリマーはある範囲の分子量で市販されている。

#### 【0105】

本発明の一実施形態において、第V I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X因子、第X a因子、第X I因子、第V I I a因子、第V因子、第X I I I因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインC - 共役体は、第V I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X因子、第X a因子、第X I因子、第V I I a因子、第V因子、第X I I I因子、ヴォン・ヴィレブランド因子およびプロテインCに結合する1以上の直鎖ポリエチレングリコールポリマーを含む。いくつかの実施形態において、血液凝固因子は、第I I I因子、第V I I I因子または第I X因子であり、ここで各PEGは約2 k D a ~ 約1 0 0 k D aの分子量を有する。本発明の他の形態において、第V I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X因子、第X a因子、第X I因子、第V I I a因子、第V因子、第X I I I因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインC - 共役体は、第V I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X因子、第X a因子、第X I因子、第V I I a因子、第V因子、第X I I I因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCに結合する1以上の直鎖ポリエチレングリコールポリマーを含み、ここで各直鎖PEGは約1 k D a ~ 約4 0 k D aの分子量を有する。特定の実施形態において、各直鎖PEGは、約1 0 k D a ~ 約3 0 k D aの分子量を有する。特定の実施形態において、各直鎖PEGは約2 0 k D aの分子量を有する。特定の実施形態において、各直鎖PEGは約1 0 k D aの分子量を有する。特定の実施形態においては、各直鎖PEGは1 0 k D a未満の分子量を有する。特定の実施形態において、血液因子共役体は、血液凝固因子に結合した2以上の直鎖PEGポリマー、例えば、第V I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X因子、第X a因子、第X I因子、第V I I a因子、第V因子、第X I I I因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCに結合した、2、3、または8までの直鎖PEGポリマーを含む。いくつかの実施形態において、血液因子共役体は、複数の直鎖PEGポリマーを含み、各直鎖PEGは約5 ~ 3 0 k D aの分子量を有する。

10

20

30

#### 【0106】

本発明の血液因子共役体は、第V I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X因子、第X a因子、第X I因子、第V I I a因子、第V因子、第X I I I因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCに結合する1以上の分岐PEGポリマーを含んでもよく、ここで各分岐PEGは約2 k D a ~ 約1 0 0 k D aの分子量を有する。本発明の他の形態において、血液因子共役体は、第V I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X因子、第X a因子、第X I因子、第V I I a因子、第V因子、第X I I I因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCに結合する1以上の分岐ポリエチレングリコールポリマーを含み、ここで各分岐PEGは約1 k D a ~ 約1 0 0 k D aの分子量を有する。特定の実施形態において、各分岐PEGは、約5 k D a ~ 約4 0 k D aの分子量を有する。特定の実施形態において、各分岐PEGは約1 0 k D a、2 0 k D a、または約3 0 k D aの分子量を有する。特定の実施形態において、各分岐PEGは約1 0 k D a未満の分子量を有する。特定の実施形態において、血液因子共役体は、第V I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X因子、第X a因子、第X I因子、第V I I a因子、第V因子、第X I I I因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCに結合した2以上の分岐PEGポリマー、例えば、第V I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X因子、第X a因子、第X I因子、第V I I a因子、第V因子、第X I I I因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCに結合した、2、3、または8までの分岐PEGポリマーを含む。いくつかの実施形態において、第V I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X因子、第X a因子、第X I因子、第V I I a因子、第V因子、第X I I I因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインC - PEG共役体は、8までの分岐PEGポリマーを含

40

50

み、各分岐 PEG は約 5 ~ 40 kDa、好ましくは 10 ~ 30 kDa の分子量を有する。

【0107】

血液因子 - PEG 共役体は、以下に制限されないが、イオン交換クロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィー等の当該分野において既知のクロマトグラフィー方法、アフィニティクロマトグラフィー、沈殿および膜を用いた分離 (membrane-based separation) によって精製されてもよい。

【0108】

好ましくは、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインC - 共役体のPEG部分は、2個のシステイン残基に結合してもよく、これにより血液凝固因子にジスルフィド結合を形成する。ゆえに、リンカーを含むPEGはジスルフィド結合を架橋する。このような共役方法の例は、WO2005/007197、WO2009/047500及びWO2010/010324に記載される。

【0109】

上述のように、PEG化の他の経路としては、Stennicke et al (Thromb. Haemost. 2008, 100(5), 920-8)に記載される標準的なglycoPEG化の手順、またはUS5644029に記載されるN-末端アミドPEG化がある。

【0110】

本発明の一実施形態において、PEG部分は、図2に示すスキームに従って第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCに共役しうる。図2中、基R1はPEG部分および血液因子分子上のジスルフィド結合の硫黄原子を結ぶリンカー基の間に示される。

【0111】

R1は、直接結合、アルキレン基 (好ましくはC<sub>1-10</sub>アルキレン基)、または置換されてもよいアリール基もしくはヘテロアリール基でありうる置換基であり; この際、アリール基としては、フェニル基、ベンゾイル基およびナフチル基があり; 適当なヘテロアリール基としては、ピリジン、ピロール、フラン、ピラン、イミダゾール、ピラゾール、オキサゾール、ピリダジン、ピリミジンおよびプリンがあり; ポリマーへの連結は、加水分解により不安定になる結合 (hydrolytically labile bond) による、または安定な結合 (nonlabile bond) によるものでありうる。

【0112】

置換されてもよいアリール基またはヘテロアリール基に存在しうる特定の置換基としては、例えば、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>R、-COH、-CH<sub>2</sub>OH、-COR、-OR、-OCOR、-OCO<sub>2</sub>R、-SR、-SOR、-SO<sub>2</sub>R、-NHCOR、-NRCOR、-NHCO<sub>2</sub>R、-NR'CO<sub>2</sub>R、-NO、-NHOH、-NR'OH、-C=N-NHCOR、-C=N-NR'COR、-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>、-N<sup>+</sup>H<sub>3</sub>、-N<sup>+</sup>HR<sub>2</sub>、-N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>R、ハロゲン、例えば、フッ素または塩素、-CCR、-C=CR<sub>2</sub>及び<sup>1</sup><sub>3</sub>C=CHR (この際、RまたはR'はそれぞれ独立して、水素原子またはアルキル基 (好ましくはC<sub>1-6</sub>) またはアリール (好ましくはフェニル) 基を表す) から選択される1以上の同一または異なる置換基が挙げられる。電子求引性置換基の存在が特に好ましい。一実施形態においては、R1の置換されてもよいアリール基またはヘテロアリール基としては、R1ユニットをPEG部分に連結するアミド (NHCO) 基で置換されたアリール基またはヘテロアリール基がある。

【0113】

ゆえに、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCのシステイン残基間のもとのジスルフィド結合の2個の硫黄原子間のリンカー基は、3-炭素架橋を有していてもよい。一実施形態において、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子

10

20

30

40

50

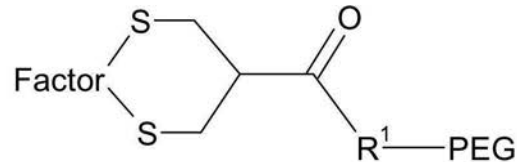
、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCのシステイン残基間のもとのジスルフィド結合の2個の硫黄原子間のリンカー基は、 $(CH_2)_2CHC(O)$ -である。

【0114】

本発明の一実施形態において、PEG部分は上記したようにして共役してもよく、この際、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCがPEG部分に共役してなる組成物は下記構造を有する：

【0115】

【化1】



10

【0116】

式中、R1は、上記で定義した通りであり、「Factor」は血液凝固因子を表す。

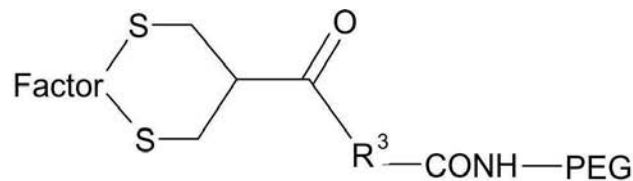
【0117】

上記と同様の定義のR1における置換されてもよいアリール基またはヘテロアリール基がアミド(NHCO)基によって置換されたアリール基またはヘテロアリール基を含む実施形態においては、R3が下記のように定義される共役タンパク質の構造は、下記の通りでありうる：

20

【0118】

【化2】



30

【0119】

R3は、直接結合、アルキレン基（好ましくはC1-10アルキレン基）、または置換されてもよいアリール基もしくはヘテロアリール基であってもよい置換基を表し；この際、アリール基としては、フェニル基、ベンゾイル基及びナフチル基があり；適当なヘテロアリール基としては、ピリジン、ピロール、フラン、ピラン、イミダゾール、ピラゾール、オキサゾール、ピリダジン、ピリミジン及びプリンがあり；ポリマーへの連結は、加水分解により不安定になる結合(hydrolytically labile bond)による、または安定な結合(non-labile bond)によるものであり、「Factor」は、血液凝固因子を表す。

【0120】

置換されてもよいアリール基またはヘテロアリール基に存在しうる特定の置換基としては、例えば、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>R、-COH、-CH<sub>2</sub>OH、-COR、-OR、-OCOR、-OCO<sub>2</sub>R、-SR、-SOR、-SO<sub>2</sub>R、-NHCOR、-NRCOR、-NHCO<sub>2</sub>R、-NR'CO<sub>2</sub>R、-NO、-NHOH、-NR'OH、-C=N-NHCOR、-C=N-NR'COR、-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>、-N<sup>+</sup>H<sub>3</sub>、-N<sup>+</sup>HR<sub>2</sub>、-N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>R、ハロゲン、例えば、フッ素または塩素、-CCR、-C=CR<sub>2</sub>及び<sup>1</sup><sub>3</sub>C=CHR（この際、RまたはR'はそれぞれ独立して、水素原子またはアルキル（好ましくはC<sub>1-6</sub>）基またはアリール（好ましくはフェニル）基を表す）から選択される1以上の同一または異なる置換基が挙げられる。電子求引性置換基の存在が特に好ましい。

40

【0121】

50

いくつかの実施形態において、本発明の投与形態は、ポリエチレングリコール分子が直鎖（好ましくは単分散）形態である、本明細書中で定義される血液凝固因子のPEG化形態から構成されうる。PEGは、3つの炭素架橋部分を介して血液凝固因子に共役されてもよい。例えば、PEGは1～100kDaであり；いくつかの実施形態において、5～30kDaであり；いくつかの実施形態において、10kDaであり、他の実施形態において20kDaでありうる。

#### 【0122】

前記投与形態は、皮下投与のために、適当な水性ビヒクル中での製剤によって調製される。ほとんどの実施形態において、適当な水溶液は、生理的pH（例えばpH6.8）に、1以上のアミノ酸および/または塩（例えばヒスチジンおよびNaCl）を含む組成物を用いて、ノニオン系界面活性剤（例えばTween（登録商標）80）および任意で安定剤（例えばベンズアミジンまたはベンズアミジン誘導体、例えばUS7612066を参照）の存在下で緩衝される。

10

#### 【0123】

本発明によって用いられうるノニオン系界面活性剤/乳化剤としては、ポリオキシエチレンソルビタンオレイン酸モノエステル（ポリソルベート80、Tween（登録商標）80）、ポリソルベート65、ポリソルベート65、ポリソルベート61、ポリソルベート60、ポリソルベート40、ポリソルベート21、ポリソルベート20、ポリソルベート81、ポリソルベート85およびポリソルベート120などのポリソルベート、ならびにステアリン酸ポリオキシル8（PEG400モノステアレート）、ステアリン酸ポリオキシル2、ステアリン酸ポリオキシル4、ステアリン酸ポリオキシル6、ステアリン酸ポリオキシル12、ステアリン酸ポリオキシル20、ステアリン酸ポリオキシル30、ステアリン酸ポリオキシル40、ステアリン酸ポリオキシル50、ステアリン酸ポリオキシル100、ステアリン酸ポリオキシル150、およびジステアリン酸ポリオキシル4、ジステアリン酸ポリオキシル8、ジステアリン酸ポリオキシル12、ジステアリン酸ポリオキシル32、ジステアリン酸ポリオキシル150などのステアリン酸ポリオキシエチレンがある。

20

#### 【0124】

組成物中の成分の適した濃度範囲は、例えば、5mM～25mMのヒスチジン（好ましくは10mM～15mMのヒスチジン）、10mM～50mMのNaCl（好ましくは30mM～40mMのNaCl）および0.001～0.01%のTween（登録商標）80（好ましくは0.005%～0.008%のTween（登録商標）80）および任意で0.5mM～5mMのベンズアミジン（好ましくは1mM～2mMのベンズアミジン）でありうる。

30

#### 【0125】

本明細書中で使用される、「突然変異タンパク質(mutein)」ということばは、もとの血液因子と比較して得られた産物の活性を顕著に変化させることなく、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCの天然成分の1以上のアミノ酸残基が異なるアミノ酸残基に置換される、または欠失する、あるいは1以上のアミノ酸残基が血液因子のもとの配列に付加する、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCの類似体を意味する。これらの突然変異タンパク質は、既知の合成法によっておよび/または部位特異的突然変異誘発技術によって、または上記に適切な他の既知の技術によって調製される。

40

#### 【0126】

本発明に係る突然変異タンパク質は、ストリンジェントな条件下で、本発明に係る、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCをコード化する、DNAまたはRNAにハイブリダイズする、DNAまたはRNA等の、

50

核酸によってコード化されるタンパク質を包含する。「ストリンジェントな条件」という用語は、ハイブリッド形成及び次の洗浄条件を意味し、当業者はこれを従来「ストリンジェント」と称する (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Interscience, N.Y., sections 6.3 and 6.4 (1987, 1992); Sambrook et al. (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))。

【0127】

特に制限されるものではないが、ストリンジェントな条件の例としては、研究対象のハイブリッドの計算上の $T_m$ より12~20低い洗浄条件、例えば、5分間、2×SSC及び0.5% SDS、15分間、2×SSC及び0.1% SDS；37で30~60分間、0.1倍SSC及び0.5% SDSおよびその後68で30~60分間、0.1×SSC及び0.5% SDS中での洗浄条件がある。当業者は、ストリンジェントな条件は、DNA配列、オリゴヌクレオチドプローブ(10~40塩基等)またはオリゴヌクレオチドプローブ混合物の長さによっても異なることは理解している。プローブ混合物を使用する場合には、SSCの代わりにテトラメチルアンモニウムクロリド(TMAC)を使用することが好ましい。

【0128】

任意のこのような突然変異タンパク質は、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCと実質的に同様の活性、またはより高い活性を有するように、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCの配列と十分重複したアミノ酸配列を有することが好ましい。

【0129】

第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCの特徴的な活性の一つとしては、血液凝固カスケードへの参加能があり、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCを検出するためのアッセイは本明細書に記載される。突然変異タンパク質がかなりの血液因子活性を有する限り、これは血液因子と実質的に同様の活性を有すると考えられうる。ゆえに、このような突然変異タンパク質を本明細書に記載されるアッセイにかけることを有する定常的な実験によって、所定の突然変異タンパク質が少なくとも実質的に第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCと同じ活性を有するかどうかを決定できる。

【0130】

好ましい実施形態においては、任意のこのような突然変異タンパク質は、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCのアミノ酸配列と少なくとも40%の同一性(identity)または相同性(homology)を有する。より好ましくは、これと少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または最も好ましくは少なくとも90%、95%、98%若しくは99%の同一性または相同性を有する。

【0131】

同一性は、配列を比較することによって決定される、2以上のポリペプチド配列または2以上のポリヌクレオチド配列間の関係を反映する。通常、同一性は、比較する配列の長

10

20

30

40

50

さにわたって、それぞれ、2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド配列の正確なヌクレオチド - ヌクレオチドまたはアミノ酸 - アミノ酸の対応 (exact nucleotide to nucleotide or amino acid to amino acid correspondence) を意味する。

【0132】

正確な対応が存在しない配列では、「同一性 (%)」が測定される。通常、比較される2つの配列を、配列間に最大の相関性があるように並べる。これは、アライメントの度合いを上げるために、1つまたは2つの配列中に「ギャップ」を挿入することを含んでもよい。同一性 (%) は、比較されるそれぞれの配列の全長にわたって測定されてもよく (いわゆる、グローバルアライメント)、これは同じまたは非常に同様の長さの配列に特に適切である、またはより短い所定の長さにわたって測定されてもよく (いわゆる、ローカルアライメント)、これは長さが異なる配列により適切である。

10

【0133】

2以上の配列の同一性または相同性を比較する方法は当該分野において既知である。ゆえに、例えば、Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 (Devereux, et al., Nucleic acids Research, 12: 387 (1984)) で利用できるプログラム、例えば、プログラム BESTFIT 及び GAP を用いて、2つのポリヌクレオチド間の同一性 (%) ならびに2つのポリペプチド配列間の同一性 (%) および相同性 (%) を決定してもよい。BESTFIT は、Smith and Waterman (Advances in Applied Mathematics, 2: 482-489 (1981)) の「ローカルホモロジー (local homology)」アルゴリズムを使用し、2つの配列間で類似する最も良好な単一の領域を見出す。配列間の同一性および/または類似性 (similarity) を決定する他のプログラムもまた当該分野において既知であり、例えば、BLASTファミリーのプログラム (Atschul et al., J. Molec. Biol., 215: 403 (1990), www.ncbi.nlm.nih.govのNCBIのホームページでアクセス可能) および FASTA (Pearson WR, Methods in Enzymology, 183: 63-98 (1990)) がある。

20

【0134】

本発明に従って使用できる第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCの突然変異タンパク質としては、本明細書に提示される示唆や助言に基づいて、過度の実験を必要とすることなく、当業者によって定常的に得られる置換ペプチドとして実質的に相当する配列の有限なセットがある。

30

【0135】

本発明に係る突然変異タンパク質の好ましい変更は、「同類」置換 ("conservative" substitution) として知られているものである。第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCの同類アミノ酸置換は、グループのメンバー間の置換が分子の生物学的機能を保存するような十分に同様の物理化学的特性を有するグループ内の同義的アミノ酸を含む。アミノ酸の挿入及び欠失はまた、特に挿入または欠失が数個のアミノ酸だけ、例えば、30個以下、好ましくは10個以下を含み、機能的な立体配置 (functional conformation) に重要なアミノ酸、例えば、システイン残基を除去または置換 (displace) しない場合には、その機能を変えることなく上記配列中でなされてもよいことは明らかである。このような欠失および/または挿入によって生産されたタンパク質及び突然変異タンパク質は本発明の範囲に含まれる。

40

【0136】

ゆえに、アミノ酸であるグリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンは、しばしば他のアミノ酸 (脂肪族側鎖を有するアミノ酸) に置換されてもよい。これらの可能性のある置換のうち、(比較的短い側鎖を有するので) グリシン及びアラニンを相互に置換しあって使用すること、および (疎水性のより大きな脂肪族側鎖を有するため) バリン、ロイシン及びイソロイシンを相互に置換しあって使用することが好ましい。しばしば

50

相互に置換しあうことができる他のアミノ酸としては、フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン（芳香族側鎖を有するアミノ酸）；リジン、アルギニン及びヒスチジン（塩基性側鎖を有するアミノ酸）；アスパラギン酸塩及びグルタミン酸塩（酸性側鎖を有するアミノ酸）；アスパラギン及びグルタミン（アミド側鎖を有するアミノ酸）ならびにシステイン及びメチオニン（硫黄含有側鎖を有するアミノ酸）がある。このような置換は、しばしば、「同類」または「半同類」アミノ酸置換と称する。本発明の融合タンパク質の配列に対するアミノ酸変更は、適当な技術を用いることによって、例えば、部位特異的突然変異誘発を用いることによって、なされうる。

#### 【0137】

本発明の範囲に含まれるアミノ酸置換または挿入が天然のまたは非天然のアミノ酸を用いてできることは理解されるべきである。天然のまたは合成アミノ酸を使用するか否かにかかわらず、L-アミノ酸のみが存在することが好ましい。

10

#### 【0138】

加えて、他のペプチドまたはタンパク質断片と融合した、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCを有する融合タンパク質はまた、融合タンパク質が第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCの活性を保持する場合には使用されてもよい。本明細書における「融合タンパク質」ということばは、一般的な意味では、水素結合または塩架橋（salt bridge）等の化学的手段によって、またはタンパク質合成を介したペプチド結合によってまたは双方によって、1以上のタンパク質と一緒に結合していることを意味する。

20

#### 【0139】

本明細書中で使用される「機能的誘導体（functional derivative）」ということばは、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCの誘導体、及びこれらの突然変異タンパク質を包含し、これらは、当該分野において既知の手段によって、残基の側鎖として生じるまたはN-若しくはC-末端基への付加である官能基から調製されてもよく、製薬上許容できる限り、即ち、血液因子の活性と実質的に同等であるタンパク質の活性を破壊せず、それを含む組成物に毒性を付与しない限り、本発明に包含される。

30

#### 【0140】

これらの誘導体としては、例えば、カルボキシル基の脂肪族エステル、アンモニアとのまたは第1級若しくは第2級アミンとの反応によるカルボキシル基のアミド、アシル部分（例えば、アルカノイル基またはカルボキシルアロイル（carboxylic aryl）基）を用いて形成されるアミノ酸残基の遊離アミノ基のN-アシル誘導体または例えば、使用できるヒドロキシル残基のグリコシル化等の、アシル部分を用いて形成される遊離ヒドロキシル基のO-アシル誘導体（例えば、セリルまたはトレオニル残基の誘導体）がある。

40

#### 【0141】

本発明に係る「血液因子の活性断片」は、本明細書に定義されるような第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCの断片または突然変異タンパク質であってもよい。断片ということばは、分子のサブセット、即ち、所望の生物学的活性を保持するより短いペプチドを意味する。断片は、血液因子分子のいずれかの末端からアミノ酸を除去し、得られた断片について本明細書に記載される性質を試験することによって容易に調製されうる。ポリペプチドのN-末端またはC-末端のいずれかから一度に1個のアミノ酸を除去するためのプロテアーゼは知られており、所望の生物学的活性を保持する、断片を決定することは、定常的な実験のみを含む。

50

## 【0142】

第V I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X因子、第X a因子、第X I因子、第V I I a因子、第V因子、第X I I I因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCの活性画分、その突然変異タンパク質及び活性断片として、本発明は当該画分が第V I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X因子、第X a因子、第X I因子、第V I I a因子、第V因子、第X I I I因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCと実質的に同等の活性を有する場合には、タンパク質分子のポリペプチド鎖の断片若しくは前駆体単独、または前記タンパク質分子のポリペプチド鎖の断片若しくは前駆体がこれに連結した分子若しくは残基、例えば、糖またはホスフェート残基と会合したものの、またはタンパク質分子の凝集体若しくは糖残基それ自体をさらに包含する。

10

## 【0143】

本明細書における「塩」ということばは、第V I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X因子、第X a因子、第X I因子、第V I I a因子、第V因子、第X I I I因子、ヴォン・ヴィレブランド因子またはプロテインC分子またはその類似体のカルボキシル基の塩およびアミノ基の酸付加塩の双方を意味する。カルボキシル基の塩は、当該分野において既知の手段によって形成され、無機塩、例えば、ナトリウム、カルシウム、アンモニウム、鉄または亜鉛塩など、および例えば、トリエタノールアミン等のアミン、アルギニンまたはリジン、ペペリジン、プロカイン等により形成される塩等の有機塩基との塩が挙げられる。酸付加塩としては、例えば、鉱酸、例えば、塩酸または硫酸との塩、および有機酸、例えば、酢酸またはシュウ酸との塩が挙げられる。いうまでもなく、このような塩は、本明細書に記載される血液因子の生物学的活性を保持している必要がある。

20

## 【0144】

患者に治療薬を投与する際の本明細書で使用される「濃度曲線下面積 (area under the curve)」または「AUC」は、0から無限大の時間の関数としての患者の体循環での薬剤の濃度を記載する濃度曲線下の全面積として定義される。本明細書中で使用される、「クリアランス」または「腎クリアランス」ということばは、1分あたりに排出される一定量の薬剤を含む血漿の容積として定義される。

## 【0145】

患者にペプチド薬剤を投与する際の、本明細書中で使用される、「半減期」または「 $t_{1/2}$ 」ということばは、患者の薬剤の血漿濃度が半分に減少するのに必要な時間として定義される。複数のクリアランスメカニズム、再分配、及び当該分野において既知の他のメカニズムによってペプチド薬剤と関連する2以上の半減期を有する場合がある。一般的に、アルファ相半減期 (alpha half-life) 及びベータ相半減期 (beta half-life) は、アルファ相が再分配に関連し、ベータ相がクリアランスに関連するように規定される。しかしながら、ほとんどで、血流に限定されるタンパク質薬剤では、少なくとも2種のクリアランス半減期が存在しうる。アルファ相半減期及びベータ相半減期へのPEG化の正確な影響は、当該分野において既知であるように、大きさ及び他のパラメーターによって変化するであろう。「半減期」のさらなる説明は、Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin and RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Amsterdam, pp 101-120)に見出される。

30

40

## 【0146】

患者にペプチド薬剤を投与する際の、本明細書中で使用される、「滞留時間 (residence time)」ということばは、薬剤が投薬後に患者の体内にとどまる平均時間として定義される。

## 【0147】

患者にペプチド薬剤を投与する際の、本明細書中で使用される、「免疫原性」ということばは、投薬後、または繰り返し投薬後の、そのペプチド薬剤の患者の免疫応答の誘発しやすさとして定義される。

## 【0148】

本明細書中、「分子次元 (molecular dimensions)」の用語は、

50

薬剤の重量、サイズおよび/または形状を意味する。したがって、「修飾によって分子次元を増加させる」は、薬剤の物理的なサイズが血管壁を通過して血流に入るには大きすぎる程度に、分子次元が大きくなることを意味する。しかしながら、分子次元は、例えば薬剤が修飾の前に切断された場合、必ずしも分子量の増加を意味しない。分子次元は、修飾された薬剤が活性を保ち、リンパ系によって送達されることなく直接血管に入らなければ、分子/重量、サイズおよび/またはコンフォメーションを含みうる。

【0149】

本明細書中、「皮下送達」または「皮下投与」の用語は、治療薬が皮膚を通過して皮下腔に直接送達されるような任意の適当な手段による送達を意味する。

【0150】

本明細書中、「投与量調節された」は、修飾された薬剤の皮下投与量の関連では、静脈内  $C_{max}$  / 皮下  $C_{max}$  の割合を乗じた、修飾された薬剤の静脈内投与量を意味する。本明細書中で説明されるように、本発明の方法は、静脈内投与された未修飾または修飾された薬剤と比較して、頻度の低い投与および/または高い投与量を患者に与えることを可能にする。「投与量調節されていない」は、皮下投与量の関連では、修飾された薬剤の静脈内の同じ投与量が、静脈内に送達される場合のように送達されることを意味する。

【0151】

本明細書中で使用される「皮下腔」の用語は、皮膚の下の結合組織を意味する。これは血管、血流および内臓を除く。

【0152】

「本来の状態 (native state)」は、修飾の前に薬剤が存在する状態を意味し、この状態において、製薬上許容される形態で患者に通常静脈内投与される。

【0153】

本発明の皮下投与形態は、製薬上許容される希釈剤、アジュバントまたは担体をさらにも含む。皮下投与に適した皮下投与形態としては、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤及び前記製剤を対象となるレシピエントの血液と実質的に等張にする溶質を含んでもよい水性および/または非水性滅菌注射溶液；ならびに懸濁化剤及び増粘剤を含んでもよい水性および非水性滅菌懸濁液が挙げられる。注射可能溶液に使用されうる賦形剤としては、例えば、水、アルコール、ポリオール、グリセリン及び植物油が挙げられる。本組成物は、1回投与用 (unit-dose) または複数回投与用 (multi-dose) 容器、例えば、密閉アンプル及びバイアル瓶に入れられてもよく、また、使用する直前に、滅菌液、例えば、注射用水を添加するだけでよいフリーズドライ (凍結乾燥) 状態で貯蔵されてもよい。即席の注射溶液及び懸濁液を滅菌粉末、顆粒及び錠剤から調製してもよい。

【0154】

一般に、皮下投与形態は、保存剤、可溶化剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、着色剤、塩 (本発明の活性物質はそれ自体が製薬上許容される塩の形態で提供されてもよい)、緩衝液、または抗酸化剤を含みうる。本皮下投与形態はまた、本発明の物質に加えて治療上活性のある薬剤を含んでもよい。本発明の皮下投与形態は、製薬上許容される希釈剤、アジュバントまたは担体と組み合わせて用いられうる。このような賦形剤としては、特に制限されないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水 (リン酸緩衝生理食塩水など)、デキストロース、リポソーム、水、グリセロール、エタノール、およびこれらの組み合わせが挙げられる。

【0155】

本明細書中に記載される皮下投与形態の皮下投与は、患者の疾患の治療に有効な、任意の有効な、便利な方法で行われうる。投与形態は液体の形態であっても固体の形態であってもよい。液体の形態は、使える状態であってもよく、または、濃縮物として調製され、その後、皮下投与の前に希釈されてもよい。固体の形態は、適切に、皮下投与のための適当な投与用ビヒクルに再構成されてもよい。治療でまたは予防として、活性薬剤を、注射可能な組成物として、例えば、滅菌水性分散液、好ましくは等張液として患者に投与してもよい。

10

20

30

40

50

## 【0156】

本発明のさらなる形態によれば、1か月に1回1以下の皮下投与のための、修飾された血液凝固因子の液体の投与形態であって、前記投与形態は、 $C_{max}$ が、修飾された血液因子の静脈内投与によって達成される $C_{max}$ の少なくとも10%であり、90%以下である、血液凝固障害の治療における使用のための、投与形態が提供される。

## 【0157】

本発明のこの形態はまた、本明細書中で定義される修飾された血液凝固因子の投与形態を血液凝固疾患 (blood clotting disease) または外傷 (trauma) を治療する必要のある患者に皮下投与することを有する、患者の血液凝固疾患または外傷の治療方法を含む。

10

## 【0158】

したがって、本発明はまた、修飾された血液凝固因子の、患者における血液凝固障害の治療のための、本明細書中に定義される投与形態を含む薬剤の作製における使用であって、前記薬剤が皮下投与のためのものであり、 $C_{max}$ が、修飾された血液因子の静脈内投与によって達成される $C_{max}$ の少なくとも10%であり、90%以下である、使用を提供する。好ましくは、 $C_{max}$ は20~80%、または30~70%、または40~60%である。一実施形態において、 $C_{max}$ は75~80%であり血液因子はFVIIでありうる。他の実施形態において、 $C_{max}$ は10~25%であり血液因子はFVIIでありうる。さらに他の実施形態において、 $C_{max}$ は40~60%であり血液因子はFIXでありうる。

20

## 【0159】

血液凝固疾患または血液凝固障害は、血液凝固因子の機能の損失 (loss) または自己抗体の生成によって特徴づけられうる。血液凝固疾患の例としては、血友病Aおよび血友病Bがある。

## 【0160】

第VIIa因子は、血友病AまたはBにおける出血症状 (bleeding episode) の治療、または、FVIIもしくはIXのそれぞれに対する抑制抗体を発症した患者の治療において用いられうる。第VII因子は血友病Aの患者の出血症状の治療に用いられ、第IX因子は血友病Bの患者の治療に用いられうる。

## 【0161】

本明細書中で使用される、「治療 (treatment)」ということばは、ヒトまたは非ヒト哺乳類に有益でありうるいずれのレジメをも包含する。「非ヒト哺乳類」の治療は、ウマ及びコンパニオンアニマル (例えば、ネコやイヌ) ならびにヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ及びウマ科の動物等の農場/農業動物 (agricultural animal) などの、家畜哺乳類の治療にまで拡張される。治療は、現存の症状または疾患について行われても、または予防 (予防的治療) を目的としてもよい。治療は、遺伝病または後天的な疾患に対してであってよい。治療は、急性または慢性の症状に対してであってよい。

30

## 【0162】

本発明の皮下投与形態は、単独で、または、治療用化合物もしくは分子などの他の化合物 (例えば、抗炎症剤、鎮痛剤または抗生物質、または第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子もしくはプロテインCの活性を促進しうる、または高めうる他の製薬上活性な薬剤、例えば別の血液凝固因子) と併用して用いられうる。このような他の化合物との投与は、同時であっても、別々であっても、連続であってもよい。これらの成分は、必要に応じて指示書を含むキットの形態で調製されてもよい。

40

## 【0163】

血液凝固カスケードにおける活性のレベルは、任意の適当なアッセイ、例えば全血凝固時間 (WBC T) 試験または活性化部分トロンボプラスチン時間 (Activated Partial Thromboplastin Time) (APTT) によって測定されうる。

50

## 【0164】

全血凝固時間（WBC T）試験は、外部環境、通常はガラス管またはディッシュで、全血が凝固を形成するのにかかる時間を測定する。

## 【0165】

活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）試験は、血液凝固（blood clotting）経路の一部のパラメータを測定する。これは血友病で、および静脈内ヘパリン療法によって、異常に上昇する。APTTは、静脈から数mlの血液を必要とする。APTT時間は、「内因性経路」として知られる凝固系の一部の指標である。APTT値は、実験室での試験において、特定の凝固プロセスが生じる時間（秒）である。この結果は、常に、正常な血液の「対照」試料と比較される。試験試料が対照試料よりも長く時間がかった場合、内因性経路の凝固機能の低下を意味する。一般的な薬物療法では、通常、45～70秒のオーダーのAPTTの範囲を目標にするが、この値は正常に対する試験の比（例えば正常の1.5倍）としても表されうる。ヘパリン治療をせずにAPTTが高い場合は血友病による可能性があり、さらに試験する必要がある。

10

## 【0166】

本発明はまた、本発明の皮下投与形態、および皮下投与用注射可能溶液を含む投与用ビクルを含む部品のキットを提供し、前記キットは、好ましくはこれを使用するための指示書を含む。

## 【0167】

本発明の一実施形態において、修飾された血液凝固因子（好ましくは、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子またはプロテインC）の薬剤組成物の皮下投与のための投与形態であって、患者への皮下投与のために製剤されたとき、前記患者の全血凝固時間を15分未満に維持するのに十分な、1か月に1回以下の投与形態を与える、投与形態が提供される。前記投与形態は、好ましくは、静脈内投与されるときに等価参照（equivalent reference）投与形態と比べて少なくとも10%であり、90%以下である $C_{max}$ を有しうる。

20

## 【0168】

したがって、本発明は、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第VIIa因子、第V因子、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子またはプロテインCから選択される修飾された血液凝固因子を含む、皮下投与のための薬剤組成物の投与形態であって、患者への皮下投与のために製剤されたとき、前記患者の全血凝固時間を12分未満に維持するのに十分な、1か月に1回以下の投与形態を与える、投与形態を提供する。

30

## 【0169】

したがって、本発明の一実施形態において、1週間に1回以下の、皮下投与のための、第VIIa因子、第VII因子および第IX因子からなる群から選択されるPEG化血液凝固因子25～50IU/kgの薬剤組成物の投与形態が提供される。

## 【0170】

本発明の液体の投与形態は、1か月に1回以下の皮下投与のための、本明細書中に定義される修飾された血液凝固因子を含み、血液凝固障害の治療における使用のための前記投与形態は、少なくとも10%であり、90%以下である $C_{max}$ を有する。

40

## 【0171】

このような組成物は、本発明に係る血液凝固因子の投与形態を血液凝固疾患（blood clotting disease）または外傷（trauma）を治療する必要のある患者に皮下投与することを有する、患者の血液凝固疾患または外傷の治療方法において特に有用でありうる。

## 【0172】

本発明の投与形態は、皮下投与されると、循環滴定濃度および凝固活性の両方において、静脈内投与されたとときの、それぞれの修飾された類似体の血液凝固因子のレベルと同等

50

のバイオアベイラビリティおよび有効性を有する。

【0173】

本発明の他の実施形態において、本明細書中で定義された、直鎖単分散ポリエチレングリコール分子が3つの炭素架橋を介してタンパク質の単一のジスルフィド結合に修飾された、血液凝固因子を含む、皮下投与のための投与形態が提供される。

【0174】

本発明の液体の投与形態は、生理的に緩衝化された水溶液中で、ノニオン系界面活性剤および任意で安定剤の存在下でPEG-共役血液凝固因子を製剤することによって調製されうる。

【0175】

本発明の第2のまたはそれに続く形態の好ましい特徴は、適宜変更して、本発明の第1の形態と同様である。

【0176】

本発明に係る修飾された薬剤の製品インパクトは、静脈内に送達された同様に修飾された薬剤よりも優れていることがわかった。製品インパクトは、例えば、WBC Tにおける改善として定義されうる。これは、特定の時点でのWBC Tで割った初期のWBC Tとして定義される。この方法を用いると、皮下送達された修飾された血液凝固薬は、一貫して、同じ時点で静脈内に送達された同じ製品よりも高い製品インパクトを示す。

【0177】

本発明によれば、例えば生体適合性ポリマーの付加によって修飾された治療薬の皮下投与から生じる免疫応答は低い。この効果は、薬剤製剤投与の分野の当業者によって本発明以前に予測されたものと正反対である。例えば、血液因子製剤の分野では、未修飾の血液因子の皮下投与は、免疫原性応答(FVII阻害剤の生成)を刺激する、または存在するFVII阻害剤の集団によって免疫応答を引き起こすと予測されるということが一般に受け入れられていた。

【0178】

血液凝固因子に対する相対的な免疫応答は、ベセスダ単位で測定されうる。ベセスダ単位(BU)は、血液凝固阻害剤の活性の指標である。Practical Haemostasisによれば、1ベセスダ単位(BU)は、37で2時間培養した後、正常な血漿中の第VII:C因子の1ユニットの50%を中和する、血漿試料中の阻害剤の量として定義される(Schumacher, Harold Robert (2000). Handbook of Hematologic Pathology. Informa Health Care, p. 583)。

【0179】

本発明において、非常に驚くべき結果が見出された。免疫(阻害剤)応答の発生を低下させるために、免疫応答のレベルが全身曝露のレベルに直接関連する皮下投与を採用することが提案された。皮下送達を提供することによって、C<sub>max</sub>が大幅に低下し、そうすることで免疫応答が低下した。

【0180】

一例として、本発明は、PEGなどのポリマーに共役したとき、血液因子にみられる驚くべき貯蔵効果について述べる。さらに、この結果は、PEGのサイズ(または量)からタンパク質上に与えられる水和のレベルを操作することによって、皮下腔から血液因子が利用できるようになる速度を設計することが可能であることを示す。

【0181】

本願に示された結果から、1つのポリマー鎖によって修飾された治療薬では、このような薬剤は、2つのポリマー鎖が付加した対応するジ-共役した形態よりも、血漿中に入る速度が遅いことがわかる。

【0182】

つまり、モノ-共役生成物は、ジ-共役生成物と比較して、タンパク質のより多くが露出しているように思われる。この状況は、より高次の共役形態は、より水分散性が高くな

10

20

30

40

50

り、したがって、リンパ管を通して血漿へ入る速度が速くなることを意味する。

【0183】

したがって、驚くべきことに、デポ-放出の最長の持続時間を達成するためには、より少ない程度の修飾が必要とされることがわかった。理論によって拘束されることなく、これは、より少ない程度の修飾によって治療薬の一部が皮下組織にさらされ、これによってリンパを通じた拡散の速度が遅くなる、ということで説明されうる。一方、より高い程度の修飾は、治療薬を完全に被覆し、生成物を遊離させ、血液循環に速やかに入れるようにする。

【0184】

全体に、修飾とその後の皮下送達の組み合わせによって、皮下(SQ)投与後のみかけの半減期において35倍の増加が観察されるという、非常に驚くべき全体としての効果がある。

【0185】

最後に、全体に、バイオアベイラビリティは、より高い次元の共役形態を支持し、修飾レベルおよび水和レベルが高いほどより高い移動度のレベル、したがって、バイオアベイラビリティが促進されることが確認されることがわかる。

【0186】

各形態のすべての特徴は、適宜変更して、本発明のすべての他の形態に適用される。

【図面の簡単な説明】

【0187】

本明細書において、下記図面を参照する。この際、

【図1】図1は、血液凝固カスケードを示す。略称：HMWK - 高分子量キニノゲン(High Molecular Weight Kininogen)；PK - プレカリクレイン；PL - リン脂質。

【図2】図2は、共役試薬の一例としてPEG化試薬を使用するジスルフィドに特異的なバイオポリマー共役化学(disulphide-specific biopolymer conjugation chemistry)に含まれる工程を示す(Shau nak et al. in Nat Chem Biol. 2006; 2(6): 312 - 313から)。

【図3】図3は、PEGhrFIXを被験体イヌ1に、hrFIXを被験体イヌ2に皮下(SQ)投与した後の全血凝固時間(WBC T)を示す。

【図4】図4は、SQ投与後の時間に対するAPTT(活性化部分トロンボプラスチン時間)値を示す。

【図5】図5は、SQ投与後の保持された血漿(Retained Plasma)のAPTTを示す。

【図6】図6は、SQ投与後の、ベースラインに対するAPTT相対値を示す。

【図7】図7は、25IU/kgのSQ投与後の被験体イヌ9のWBC Tを示す。

【図8】図8は、200µg/kgのrFVIIaの後のFVIIaのPKプロファイルおよびパラメータを示す。

【図9】図9は、800µg/kgのTheraPEG-rFVIIaの後のFVIIaのPKプロファイルおよびパラメータを示す。

【図10】図10は、1600µg/kgのTheraPEG-rFVIIaの後のFVIIaのPKプロファイルおよびパラメータを示す。

【図11】図11は、血漿中のFVII濃度を示す(すべてのイヌ)。

【図12】図12は、血漿中のFVII濃度を示す(SQ投与したイヌのみ)。

【図13a】図13aは、皮下(SQ)投与されたPEGFVIIの、静脈内(IV)投与と比較した免疫データ(ベセスダ値)を示し、被験体の数は「n」で与えられる。

【図13b】図13bは、皮下(SQ)投与されたPEGFVIIの、静脈内(IV)投与と比較した免疫データ(ベセスダ値)を示し、被験体の数は「n」で与えられる。

【図13c】図13cは、皮下(SQ)投与されたPEGFVIIの、静脈内(IV)

10

20

30

40

50

投与と比較した免疫データ（ベセスダ値）を示し、被験体の数は「n」で与えられる。

【図13d】図13dは、皮下（SQ）投与されたPEGFVIIの、静脈内（IV）投与と比較した免疫データ（ベセスダ値）を示し、被験体の数は「n」で与えられる。

【実施例】

【0188】

ここで、本発明を下記実施例を参照しながらさらに説明するが、下記実施例は詳細に説明するためのみに記載され、限定して解釈されてはならない。本発明の投与製剤の皮下投与はSQ（s.c.）として表され、静脈内投与はIV（i.v.）として表される。

【0189】

#### 実施例1：投与形態の調製および皮下投与

この研究は、皮下投与後のhrFIXのバイオアベイラビリティおよび有効性の評価を含む。循環滴定濃度および凝固活性の両方について、裸の（PEG化されていない）hrFIXをそのPEG化類似体と比較した。

【0190】

10kDaのPEG化hrFIXを、10kDaの直鎖の単分散のポリエチレングリコールを単一のジスルフィド結合に3つの炭素の架橋を介して共役させる、標準的な技術に従って調製した。

【0191】

投与のための試験物質は、10mMのヒスチジン、40mMのNaClおよび0.005%のTween（登録商標）80を用いてpH6.8に緩衝化した適当な水溶液を調製することによって調製した。1mMのベンズアミジンを安定剤として添加した。

【0192】

hrFIXの希釈の研究が、25%の希釈でPEGhrFIXで同等の凝固時間を示したことに基づくと、この研究の割り付けられた効力（allocated potency）は、4Xタンパク質当量（protein equivalent）であった。対照物質（control article）は、凍結乾燥された粉末として供給され、再構成のための同封の指示書に従って投与のために調製した。送達ビヒクルはPEGについて上述されたものと同様である。

【0193】

この研究に付属するものとして、これはrFIXの皮下（SQ）投与の可能性を探ることに決定した。SQ投与に適したrFIXのPEG化形態の見通しは、PEGがタンパク質の遮蔽効果を与えたという上記の観察から浮上した。歴史的に、SQ経路は、これが抗体産生の発生率を悪化させ、血液中で意味のある量に変換しないであろうという懸念があったため、FIXには利用不可能であると考えられていた。

【0194】

研究のこの部分では、PEGhrFIX 50IU/kgをさらなる試験動物（イヌ1）に皮下投与し、裸のhrFIXの2頭の他の試験の被験体（すなわち、それぞれ、イヌ6およびイヌ2）への2つのSQ投与と比較した。

【0195】

この特定の表現（representation）では、動物はそれぞれわずかに異なるベースラインを有しており、そこで比較しやすくするために、投与前のAPTTレベルを1に規格化した。イヌ1およびイヌ2は、2010年1月の前回のPEGhrFIX試験で試験の被験体であり、ここで静脈内投与後に記録された血漿滴定濃度（plasma titres）が比較に利用可能であった。

【0196】

血液試料を正規の（一定間隔の）時間経過にわたって採取し、滴定濃度の崩壊（decay of titre）および血液凝固における効果を観察した。表1は、22時間で、静脈内投与後の循環しているFIXとして測定された滴定濃度（titres）のまとめである。

【0197】

10

20

30

40

50

【表 1】

表1

被験体	物質	投与量 (IU/kg)	滴定濃度
イヌ1	PEGhrFIX	50	9.9
イヌ2	Benefix(登録商標)	50	5.6
イヌ3	hrFIX	50	5.1
イヌ4	PEGhrFIX	50	9.7
イヌ5	PEGhrFIX	100	11.1
イヌ6	PEGhrFIX	100	10.2
イヌ7	PEGhrFIX	150	17.6
イヌ8	PEGhrFIX	150	75.5

10

【0198】

表2は、皮下(SQ)投与後22時間で測定された循環FIX滴定濃度の比較を示す。

【0199】

【表2】

20

表2

被験体	物質	投与量 (IU/kg)	滴定濃度
イヌ1	PEGhrFIX	50	7.8
イヌ6	hrFIX	50	1.7
イヌ2	Benefix(登録商標)	25	ND

【0200】

SQ経路による25IU/kgのBenefix(登録商標)は、循環において検出不可能であり、50IU/kgのPEGhrFIXは血漿中にかろうじて検出可能であったことがわかる。全く対照的に、PEGhrFIXのSQ投与は、IV投与製品(9.9)に近いレベル(7.8)であった。

30

【0201】

凝固時間の補正におけるこれらの滴定濃度の影響を調べた。はじめに、全血凝固時間を記録した。皮下投与後のWBCTを表3および図3に示す。加えて、Hemochron(登録商標)JuniorにおけるAPTTも記録し、皮下投与後の値を下記表4(全血クエン酸化)および図4に示した。また、皮下投与後の保持された血漿試料のAPTT値を表5および図5に示す。

【0202】

40

【表 3】  
表3

皮下投与後の全血凝固時間(分)**		
時間	イヌ1(PEGhrFIX)	イヌ2(hrFIX)
6	4	45*
22	3.5	45
48	8	45
72	9.5	45
120	4	45
144	4	45
168	45	45
192	45	45
216	45	45

\*注 45分は、標準的な手順に従って、凝固が形成されなかったためにモニタリングを終了した時間である。

\*\* 双方のイヌは投薬を受けていないイヌであり、以前にFIXにさらされていないことを意味する。

【 0 2 0 3 】  
【表 4】

表4

皮下投与後のクエン酸化APTT		
	イヌ1(PEGhrFIX)	イヌ2(hrFIX)
Pre	279.7	225.1
6	99.4	375.5
22	75.6	328.7
48	88.6	
72	90.1	261.7
120	124.4	274.5
144	138.9	301
168	300	372.5
192	254.2	
216	300	298.3

【 0 2 0 4 】

## 【表5】

表5

皮下投与後のAPTT		
	イヌ1(PEGhrFIX)	イヌ2(hrFIX)
Pre	67.2	66.3
6	44.6	71.9
22	40.2	61.1
48	45.3	64.7
72	43.9	60.7
120	49.6	59.6
144	-	58.5
168	55.4	64.9

10

## 【0205】

図6 - データのこの収集は、裸のrFIXが皮下注射から（実際に）生物学的に利用可能ではないことを明白に示す。これは、公表された文献および当該分野の一般的な知識から完全に予測される。PEGhrFIXの皮下注射の後、rFIXのこのような高い循環滴定濃度が検出されたら、なおさら驚くべきである。実際に、表10から、皮下注射されたPEGrFIXの約80%が止血の制御への関与に利用可能であることがわかる。

20

## 【0206】

この対照は、測定された凝固時間、rFIXについてのWBC TおよびAPTTの両方は、かるうじて治ったが、一方、皮下注射からのPEGhrFIXは凝固時間をすぐに治した点で、最も明確である。これらの測定による止血の持続時間は、1回の50IU/kgの皮下注射から約1週間まで長くなった。

## 【0207】

## 実施例2：イヌ9におけるhrFIXの皮下投与（SQ）

上記のSQ研究の成功を前提として、PEGhrFIXのさらなる1回のSQ投与を行い、同様に長期間にわたる止血制御を観察することに決定した。選択した試験の被験体は、SQ投与経路における抗体の中和の影響を調べるために、投薬を受けていない被験体イヌ9であった。

30

## 【0208】

イヌにおけるヒト血液因子の研究は、ヒトタンパク質に対するイヌの免疫系の応答によって混同されている。ヒトrFIXは異種タンパク質であり、したがって、イヌの研究において、抗体の中和は試験物質の投与後同じ点で求められる必要がある。実際、試験の被験体がヒト血液因子に再導入されると、抗体の産生がより顕著であり、より速い。被験体のイヌ1およびイヌ7は、皮下投与の後、結果として止血期間が短くなった。

40

## 【0209】

試験被験体のイヌ9は、投薬を受けていない動物であり、少量の皮下投与量を与えられた。したがって、本発明のPEG化血液因子が提供する真の持続保護が明らかになった。イヌ9は、これまでにヒト血液因子にさらされていないため、真の内在する（そして非常に驚くべき）結果が観察された。

## 【0210】

図7は、PEG化されたIB1001をイヌ9に1ml（体積1ml）の投与量で、25IU/kgで皮下（SQ）投与した後のWBC Tの結果を示す。以下の表6にも示す。

## 【0211】

## 【表6】

表6

時間 (時間)	WBCT (分)	FIX滴定濃度 (%正常)	APTT (秒)
Pre	45		67.2
6	1.75	0.68	53.8
24	6	2.46	50.9
48	9.5	2.42	49.8
72	3	1.69	55.6
94	9	1.24	57.7
118	5.5	1.13	53.2
142	8	0.66	56.3
168	9	0.28	61.4
189	18	ND	64.3
216	22.5	ND	47.7
240	25	ND	59.7
336			61.4

10

20

## 【0212】

## 実施例3：比較例

FIXおよびPEG-FIXの静脈内投与と皮下投与との比較

## 【0213】

## 【表7】

## 表7\*

動物	投与量 IU/kg	型	IV C <sub>max</sub> ng/ml	SQ C <sub>max</sub> ng/ml	SQ/IV %C <sub>max</sub>
ビーグル犬	200	BFIX	4517.5	550.7	12%
血友病B(HB)犬	200	BFIX	7916	658.3	8.2%

30

\* McCarthy et al Thromb. Haemost. 87(5) 824-830, (2002). より。

## 【0214】

【表 8】

表8

動物	投与量 IU/kg	型	IV %正常	SQ %正常	SQ/IV %Cmax
イヌ1	50	PEGFIX	9.9	7.8	78.8%
イヌ7	50	PEGFIX		7.8	
イヌ6	50	hrFIX		1.7	
イヌ2	25	BFIX		ND	

BFIX = Benefix(登録商標)

PEGFIX = PEG-hrFIX

## 【0215】

結果から、皮下投与量の  $C_{max}$  が静脈内投与量の 78.8% であることがわかる。IV および SQ の百分率の値は、正常と比較すると低くみえるが、実際には実験的なアーティファクトである。それぞれの場合の FIX は、試料が調製されると下降すると考えられる。静脈内投与量の 9.9% の値は、実際には良好な結果を示していると考えられる。したがって、皮下投与量の 7.8% との比較は、与えられた計算の  $C_{max}$  値によって示されるように、有益である。

## 【0216】

結論：

25 および 50 IU/kg の両方の皮下注射による hrFIX の投与は、かろうじて検出可能な循環滴定濃度となり、イヌの被験体における血友病を治さなかった。

## 【0217】

上記と全く対照的に、50 IU/kg の PEGhrFIX の皮下投与量では、バイオアベイラビリティが約 80% に上昇し、凝固時間が 1 週間の間、正常な範囲内になった。

## 【0218】

実施例 4：20 kDa の PEG を有する第 VII a 因子

この実施例は、皮下注射からの血液因子の PEGFVIIa のバイオアベイラビリティに関する研究を報告する。2 頭の血友病のイヌ (HB) を、時刻 0 で、PEGFVIIa の等価効力を有する量で、1 頭は静脈内 (IV) で、1 頭は皮下 (SQ) で、治療した。血液試料を採取し、FVIIa タンパク質を測定する血漿を回収した。結果の表は、89.5% の皮下投与からのバイオアベイラビリティを示す。

## 【0219】

10

20

30

【表 9】

表9

時間(時間)	PEG化血液因子 VIIa 血漿滴定濃度		
	IV	SQ	
0	9.5	9.5	
4	167.5	73.9	(max)
12	122.2	62.4	
24	45.7	57.5	
48	23.1	39.6	
72	9.3	22.5	
平均	62.88	44.23	
最大/平均	2.66	1.67	

10

## 【0220】

PEGの存在は、リンパ管における移動度を促進する水溶解度を与える。このデータは、IV注射に伴うポーラスのピークおよび谷ではなく、FVIIaの定常的に制御された注入を示す。

20

## 【0221】

曲線下面積から、PEG化FVIIaについて89.5%のバイオアベイラビリティ、および、皮下送達されたときFVIIaのレベルがより定常的な状態であることが示された。

## 【0222】

実施例5：PEGFVII薬剤製品

比較のために、Kogenate（登録商標）FS（市販の組み換えFVII）について述べる。PEG化賦形剤であるTween（登録商標）80が大量に用いられている。

30

## 【0223】

ポリソルベートであるTween（登録商標）80は1310g/molの分子量を有し、そのうち880gがPEG化から誘導される（全モノマーユニットが20であり、それぞれが44g/molの(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)を有する）。

## 【0224】

したがって、計算は：

モルPEG相当長さ (Molar PEG Length Equivalent) :

参照：250IU バイアルのProduct Monograph Example

FVII分子量  $3.00 \times 10^5$  g/mol

IU/g  $4.00 + 0.6$  IU/g

40

IU/バイアル  $2.50 \times 10^2$  IU/バイアル

バイアル体積 2.50ml/バイアル

ポリソルベート濃度  $6.40 \times 10^{-5}$  g/ml

ポリソルベート分子量  $1.31 \times 10^3$  g/mol

ポリソルベート1モルあたりのPEGの分子量 880g/mol

## 【0225】

【表 10】  
表10

FVIII Kogenate (登録商標)		ポリソルベート	
4.00E+06	IU/g		1.31E+03 g/mol
3.00E+05	g/mol		6.40E-05 g/ml
1.2E+12	IU/Mol		2.50E+00 ml/バイアル
			1.60E-04 g/バイアル
2.50E+0.2	IU/バイアル		
2.08E-10	Mol/バイアル		1.22E-07 mol/バイアル

10

## 【0226】

Tween (登録商標) / FVIII の比  $5.86 \times 10^2$

PEG 等価分子量 (PEG equivalent Mol Wt.)  $5.16 \times 10^5$

したがって、Kogenate (登録商標) FSにおいて、各FVIII分子は会合した516kDaのPEGの等価物を有する。比較すると、本発明によって調製されたPEG FVIII投与製剤は、単一の20kDaのPEGを有する。

20

## 【0227】

結論：dose-for-dose基準では、ポリエチレングリコールの25.8倍の減少があった；Kogenate (登録商標) の1週間に3回の基準の予防的使用に対して、本発明のPEG-FVIII投与製剤は、1週間に1回投与されうることとを考慮すると、PEGの投与において約80倍の全体的な減少の可能性がある；そして、投与期間にわたって本発明のFVIII投与製剤によって投与されるPEGの量は、Kogenate (登録商標) によって投与されるものの1.25%である。

## 【0228】

## 実施例6：FVIIaの皮下投与

この研究の目的は、TheraPEG化および非TheraPEG化組み換えヒトFVIIa (それぞれTheraPEG rFVIIaおよびFVIIa) の、血友病Bのイヌに静脈内投与および皮下投与した後の、薬物動態を調べることである。

30

## 【0229】

トランスジェニックFVIIa (rFVIIa) のTheraPEG化は、WO 2011/135308に従って行った。TheraPEG rFVIIaは、複数のバッチに凍結乾燥物としてテストサイトに供給し、これを高純度水で再構成し、1mg/mlのTheraPEG rFVIIaをFVIIaの活性を維持する生理的に許容される緩衝液中に得た。

## 【0230】

実験動物は、早期の停止コドンおよび不安定なFIX転写産物をもたらす、F9遺伝子における5-bp欠失およびC-Tトランジションによって引き起こされる先天性の重い血友病Bを有するLhasa Apso-Basenji交配犬であった。投与前に、すべてのイヌを、全血化学、フィブリノゲンの血清化学プロファイル、フィブリノゲン由来ペプチド(FDPs)、トロンビン時間および尿分析を含む通常の状態を調べるために試験した。静脈内(IV)に与える薬剤は、橈側皮静脈へのボラス注射として与えた。皮下(SQ)投与量は、1回の投与量として肩甲骨の間に与えた。

40

## 【0231】

TheraPEG rFVIIaのそれぞれのバッチを再構成し、次いで、表11に記載されるように、動物に投与するのに用いられる1回の投与溶液を製造するために合わせた。

50

【 0 2 3 2 】

【 表 1 1 】

表11

イヌ被験体および符号 (性別)	イヌの体重 (kg)	薬剤	投与経路	投与レベル ( $\mu$ g/kg)	投与量 (mg)
イヌ9 HB1 (雄)	5.4	TheraPEG-rFVIIa	SQ	800	4.32
イヌ3 HB2 (雄)	11.4	rFVIIa	SQ	200	2.28
イヌ5 HB3 (雌)	5.6	TheraPEG-rFVIIa	IV	800	4.48
イヌ7 HB4 (雌)	10.0	rFVIIa	IV	200	2.0
イヌ10 HB5 (雌)	5.5	TheraPEG-rFVIIa	IV	1600	8.8
イヌ11 HB6 (雄)	4.8	TheraPEG-rFVIIa	SQ	1600	7.68

10

20

30

40

【 0 2 3 3 】

5 mlの血液試料を、以下の時点で、それぞれのイヌから採取する手順とした：

薬剤投与前 (Pre - drug administration) および投与後 10、30分、1、2、4、8、12、18、24、36、48、72、96、120、144、168、192、216および240時間。

【 0 2 3 4 】

4 mlの血液試料を氷上で0.109 Mのトリ - クエン酸ナトリウム抗凝血剤 (9 : 1 v / v) を含むチューブに移した。血漿を残ったクエン酸血の遠心分離によって調製し、得られた血漿試料を - 80 で一定量保存した。一定量の血漿について、ELISAによ

50

ってFVIIa濃度を分析した。

【0235】

Stago Asserachrom VII:Ag ELISAアッセイは、血漿試料中の第VII/VIIa因子濃度の定量的な決定のための酵素結合免疫測定法の手順である。このアッセイは、ウサギ抗ヒトFVII抗体であらかじめコートしたマイクロタイターウェルから構成されるサンドイッチELISAである。抗体がFVIIaに対してPEG-FVIIaとは異なる親和性を有するため、標準曲線は、試験血漿中に存在するFVIIaに適切なタンパク質の希釈により準備した、すなわち、rFVIIaを投与したイヌの血漿のアッセイにはrFVIIa(0.78~50ng/ml)、または、PEG-rFVIIaを投与したイヌの血漿のアッセイにはPEG-rFVIIa(0.78~

10

【0236】

血漿試料を適当な濃度に希釈し、標準曲線に入るようにした。希釈した血漿試料および標準を投入し、洗浄およびその後のウサギ抗ヒトFVII HRP共役体およびOPD(比色分析HRP基質)での展開(development)の前に室温で培養した。プレートを492nmで読み、試験試料の濃度(ng/ml)を標準曲線から読みとった。

【0237】

【表 1 2】

表12

投与経路	Tmax (h)	Cmax (ng/mL)	AUC(0-t) (ng.h/mL)	AUC(0-∞) (ng.h/mL)	速度 (/h)	半減期 (h)	Bio. (%)
IV	0.16	1643	2467	2534	0.2994	2.3	100
SQ	7.5	31.3	276	-	-	-	11

10

20

30

【 0 2 3 8】

【表 1 3】

表13

投与経路	Tmax (h)	Cmax (ng/mL)	AUC(0-t) (ng.h/mL)	AUC(0-∞) (ng.h/mL)	速度 (/h)	半減期 (h)	Bio. (%)
IV	0.5	19372	128305	129646	0.0256	27.0	100
SQ	12.0	1378	84960	87139	0.0262	26.5	67

10

20

30

【 0 2 3 9】

【表 1 4】

投与経路	Tmax (h)	Cmax (ng/mL)	AUC(0-t) (ng.h/mL)	AUC(0-∞) (ng.h/mL)	速度 (/h)	半減期 (h)	Bio. (%)
IV	0.5	26609	236116	240449	0.050	13.8	100
SQ	24	2030	107728	108454	0.038	18.3	45.6

表14

10

20

30

## 【0240】

## 薬物動態

200 μg/kg の FV I I a、800 μg/kg の T h e r a P E G - r F V I I a および 1600 μg/kg の T h e r a P E G - r F V I I a の I V および S Q プロファイルならびに PK パラメータを、図 8、9 および 10 (表 12、表 13 および表 14) に示す。T h e r a P E G - r F V I I a の半減期は、14 ~ 27 時間であり、これは非 P E G 化 r F V I I a の 2 . 3 時間の半減期よりも明らかに長くなっていた。T h e r a P E G - r F V I I a の 1600 μg/kg の I V 投与量の A U C は、800 μg/kg の I V 投与量のものよりも 1 . 8 倍高かった。しかしながら、1600 μg/kg の S Q 投与量では、800 μg/kg の投与量のものよりも 1 . 2 倍しか高くなかった。これは、800 μg/kg および 1600 μg/kg の投与量で、それぞれ、67% および 45% のバイオアベイラビリティの計算に反映されており、非 P E G 化 r F V I I a で観察された 11% の S Q のバイオアベイラビリティと比べて有意な上昇を示した。

40

50

## 【0241】

Ther a P E G - r F V I I a の 8 0 0  $\mu$  g / k g の I V 投与量の A U C は、非 P E G 化 r F V I I a の 2 0 0  $\mu$  g / k g の I V の後の A U C の 8 4 倍であり、Ther a P E G - r F V I I a の 8 0 0  $\mu$  g / k g の S Q 投与量の A U C は、非 P E G 化 r F V I I a の 2 0 0  $\mu$  g / k g の S Q の 3 0 0 倍である。

## 【0242】

実施例 7 : F V I I I の皮下投与

この研究の目的は、Ther a P E G 化血漿由来 F V I I I (Ther a P E G - p d F V I I I) が血友病 A のイヌに静脈内投与および皮下投与されたときの、薬物動態および薬効を調べることである。Ther a P E G - p d F V I I I は、2 0 k D a の直鎖 P E G を用いて W O 2 0 1 1 / 1 3 5 3 0 7 に記載の方法で調製し、さらに精製して精製 Ther a P E G - p d F V I I I を得た。

10

## 【0243】

実験動物は、先天性の重い血友病 A を有し、以前に突発性出血の治療のためにイヌの血漿を投与されているが、ヒト F V I I I での治療を受けていない、グレイハウンド交配犬であった。投与前に、すべてのイヌを、全血化学、フィブリノゲンの血清化学プロファイル、フィブリノゲン由来ペプチド ( F D P s )、トロンビン時間および尿分析を含む通常の状態を調べるために試験した。

## 【0244】

表 1 5 に、それぞれのイヌの体重、および投与された F V I I I 投与量を示す。それぞれのイヌに、高い ( 約 0 . 1 4 m g / k g ) または低い ( 0 . 0 7 m g / k g ) 投与量で Ther a P E G - p d F V I I I を、または 0 . 0 3 m g / k g で非 P E G 化 p d F V I I I を、1 回の投与量で与えた。静脈内 ( I V ) 投与は、橈側皮静脈へのボラス注射として与えた。皮下 ( S Q ) 投与は、1 回の投与量として肩甲骨の間に与えた。

20

## 【0245】

【表 15】

表15

試験物質	投与経路	イヌ被験体(性別) および符号	体重 (kg)	FVIII濃度 (mg/ml)	投与体積 (ml)	総投与量 FVIII (mg)	投与量 (mg FVIII/kg)
TheraPEG-pdFVIII	SQ	イヌ12 (F) HA1	21.8	0.211	14	2.954	0.135
TheraPEG-pdFVIII	SQ	イヌ13 (M) HA2	26.6	0.235	16	3.76	0.141
TheraPEG-pdFVIII	IV	イヌ14 (F) HA3	20.6	0.211	14	2.954	0.143
TheraPEG-pdFVIII	IV	イヌ15 (M) HA4	31	0.235	17.1	4.019	0.130
TheraPEG-pdFVIII (低投与量)	SQ	イヌ16 (M) HA6	28	0.273	7.0	1.911	0.068
非PEG化pdFVIII	SQ	イヌ17 (F) HA5	27.4	0.090*	9.0	0.810	0.030

【0246】

血液試料は、以下の時点で、それぞれのイヌから採取する手順とした。薬剤投与前およ

10

20

30

40

50

び投与後10、30分、1、2、4、8、12、18、24、36、48、72、96、120、144、168、192、216および240時間。全血（非クエン酸化）を全血凝固アッセイおよび活性凝固時間アッセイに用いた。残った血液試料を氷上で0.109Mのトリ-クエン酸ナトリウム抗凝血剤（9：1 v/v）を含むチューブに移した。活性化部分トロンボプラスチン時間アッセイをクエン酸血で行った。血漿をクエン酸血の遠心分離によって調製し、得られた血漿試料をFVIIII抗原ELISAのために、-80で一定量保存した。

#### 【0247】

全血凝固時間アッセイ（WBCT）

血液試料を2つのパキュチューブに分け（2×0.5ml）、完全に水平な位置で流れの遮断によって凝固が決定されるまで、チューブの周期的なおよび妥当な水平化を注意深く観察した。次いで、凝固の質を、チューブを完全に逆の位置に保持することによって観察した。WBCTは、両方の試料で試料抽出から血液凝固が目視で観察されるまでの総時間の平均として記録し、逆の位置における凝固の質も記録した。

#### 【0248】

活性凝固時間（ACT）および活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）

ACTおよびAPTT試験は、Haemachron Jr 凝固分析器（International Technidyne Corps.）を用いて、製造元の指示書に従って行った。

#### 【0249】

血漿試料中のFVIIII抗原濃度は、Affinity Biologicals（Ancaster, Ontario, Canada）製のVisulize FVIIII antigen kitを用いて、製造元の指示書に従ってELISAによって決定した。

#### 【0250】

##### 結果

全血凝固時間（WBCT）

止血（WBCT < 12分）は、高投与量のTheraPEG-pdFVIIII（HA1-4）を受けたすべてのイヌで、80～100時間維持された。IVおよびSQ投与の間でWBCTに差異はないように見えた。低投与量のTheraPEG-pdFVIIII（HA6）をSQで与えられたとき、止血は56～75時間維持された。対照的に、SQ投与された非PEG化FVIIIIではWBCTが減少したが、12分未満のWBCTが持続しなかった。

#### 【0251】

活性凝固時間（Activated Clotting Time）（ACT）

ACTは、高投与量のTheraPEG-pdFVIIII（HA1-4）を受けたすべてのイヌで、投与後約80時間、200秒未満の正常な範囲に減少した。IVおよびSQ投与の間でATCプロファイルに差はなかった。

#### 【0252】

低投与量のTheraPEG-pdFVIIII（HA6）をSQで与えると、200秒未満のACTが少なくとも36時間維持された。対照的に、SQで与えた非PEG化FVIIIIではACTは減少したが、200秒未満の持続ACTにはならなかった。

#### 【0253】

活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）

APTTは、高投与量のTheraPEG-pdFVIIII（HA1-4）を受けたすべてのイヌで、投与後約60時間、60秒未満に減少した。IVおよびSQ投与の間でAPTTプロファイルに差はなかった。

#### 【0254】

低投与量のTheraPEG-pdFVIIII（HA6）をSQで与えると、60秒未満のAPTTが40時間維持された。対照的に、SQで与えた非PEG化FVIIIIでは

10

20

30

40

50

A P T Tは減少したが、最も短いA P T T時間は80秒であった。この個体のA P T Tが投与後の持続時間の研究でベースライン値を下回ったままである理由は不明であるが、イヌごとの変動によるものでありうる。

【0255】

F V I I Iの血漿濃度および薬物動態

すべてのイヌにおける時間に対するF V I I I血漿濃度を図11に示す。S Q投与されたイヌのみのデータを図12に示す。生データを表23～28に示す。鍵となるP Kパラメータを表16に示す。

【0256】

S Q投与されたT h e r a P E G - F V I I Iの半減期は、H A 1および2について、それぞれ、18.3時間および16.6時間であった。I V投与されると、半減期は、H A 3および4について、それぞれ、15.2時間および13.9時間と、少し短くなった。S Q投与後のバイオアベイラビリティは32%と計算された。非P E G化F V I I I (H A 5)のS Q投与後のF V I I Iの濃度は、大部分は定量レベルより低く、したがってP Kパラメータは計算できなかった。

10

【0257】

【表 1 6】

表16

投与量 (mg/kg)	イヌ 参照	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (%正常)	$AUC_{0-t}$ (%正常.h)	$AUC_{0-\infty}$ (%正常.h)	$\lambda_z$ (/h)	$t_{1/2}$ (h)
0.135	HA1(SQ)	8.00	31.20	871.4	1066.8	0.0379	18.3
0.141	HA2(SQ)	8.00	32.80	1085.3	1171.7	0.0417	16.6
0.143	HA3(IV)	0.16	176.40	2929.8	3698.0	0.0456	15.2
0.130	HA4(IV)	0.16	179.20	3302.8	3522.8	0.0500	13.9
0.068	HA6(SQ)	4.00	9.01	345.2	510.1*	0.0143*	48.4*

\* データの変動のため近似値

【 0 2 5 8 】

結論

10

20

30

40

50

高投与量のTheraPEG-FVIIの皮下投与は、WBC T、APTTおよびACTによる測定と同様に、1回の投与量の後、80～100時間の止血制御の結果となった。これらのアッセイのSQのプロファイルは、IVで与えられたTheraPEG-FVIIの等価投与量のプロファイルと区別できなかった。これは、TheraPEG-FVIIのSQ送達の実行可能性を明確に示す。

【0259】

TheraPEG-pdFVIIの半減期は、13.9～18.3時間であった。これは、血友病Aのイヌにおいて7～11時間と報告されている(Karpf et al., Haemophilia 17, 5 (2011))市販の組み換えFVIIと比較して、半減期の明らかな延長を示す。したがって、TheraPEG-FVIIは、生物学的に利用可能なSQであるだけでなく、半減期が延長されることが示された。

10

【0260】

TheraPEG-pdFVIIのSQ投与後のFVIIのPKプロファイルは、IV投与と比較して、 $C_{max}$ およびAUCが大幅に減少し、バイオアベイラビリティが32%と決定された。しかしながら、この投与量レベルでは、PK曲線の「遅い放出」の性質によって、曝露が、IV投与後と同じ時間、SQ投与後、正常レベルの5%を超えて維持され、これは等価な機能的反応を説明している可能性がある。 $C_{max}$ およびAUCの減少は、SQ送達されたTheraPEG-FVIIの作用の持続時間の増加と合わせて、この製品および投与オプションの可能性、さらなる安全性の特性を強調した。

20

【0261】

非PEG化FVIIの皮下投与は、血漿中に検出可能なFVIIが得られないという結果になり、凝固時間は低下したが、止血の持続的な維持はできなかった。これは、非PEG化FVIIは非常に低いSQバイオアベイラビリティを有するが、非常に少量のFVIIが止血に影響しうることを示す。非PEG化FVIIと対照的に、低投与量のTheraPEG-pdFVIIは、正常の9%までの血漿レベルとなり、止血が56～75時間維持された。したがって、TheraPEGのpdFVIIへの付加は、SQ投与したとき、より大きいバイオアベイラビリティおよび機能的反応をもたらした。結論としては、この研究は、FVIIのTheraPEG化は、皮下投与可能で、作用の持続時間の長い、優れた生成物をもたらすことを明確に示した。

30

【0262】

【表 17】

表17

HA1 (SQ PEG-pdFVIII) イヌ12

時間(h)	WBCT(分)	APTT(分)	ACT(分)	ELISA(%正常)
0.00	40.00	186.95	378.00	0
0.16	31.00	178.4	400	0
0.50	32.00	168.1	319	0
1.00	8.50	114.1	229	0
2.00	8.75	81.3	241	0
3.50	7.00	57.3	177	7.8
8.00	7.50	40.4	167	31.2
12.00	6.50	51.4	183	29.4
20.00	5.25	33.4	184	23.4
26.50	5.50	37.3	194	21.4
33.50	5.80	40.4	196	15.4
48.50	6.40	81.3	205	7.4
58.00	8.13	58.5	183	3.8
72.00	9.00	71.5	188	0.1
94.00	13.00	119.2	275	0
117.75	29.00	146.4	400	0
145.50	33.00	174.3	386	
170.00	31.75	137	360	
398.00	32.65	140.8	365	
696.00	30.00	133.4	347	

10

20

30

【 0 2 6 3 】

【表 18】

表18

HA2 (SQ PEG-pdFVIII) イヌ13

時間(h)	WBCT(分)	APTT(分)	ACT(分)	ELISA(%正常)
0.00	36.50	117.50	367.00	0
0.16	12.50	79.8	265	0
0.50	7.50	52.5	197	0
1.00	7.50	39.3	181	4.4
2.16	7.00	40.4	179	12.8
4.00	7.75	33.4	172	24.6
8.00	6.00	30.6	168	32.8
11.00	6.75	35.3	177	26.6
21.00	5.00	36.3	185	29.8
24.75	7.50	32.4	173	26.4
32.50	7.75	51.4	186	18.8
46.00	7.25	47.9	183	9.2
52.25	8.00	50.2	185	1.4
72.75	8.00	56.1	213	3.6
97.00	19.75	122.7	314	0
120.50	24.00	174.3	400	
143.50	26.00	176.3	371	
165.00	33.50	306.4	400	

10

20

30

【 0 2 6 4 】

【表 19】

表19

HA3 (IV PEG-pdFVIII) イヌ14

時間(h)	WBCT(分)	APTT(分)	ACT(分)	ELISA(%正常)
0.00	24.00	239.45		0
0.16	4.00	38.3	174	176.4
0.50	4.00	38.3	158	169.4
1.00	4.50	32.4	174	172.2
2.00	5.50	37.3	180	154.8
3.50	6.50	31.5	179	140.6
8.00	4.50	44.6	160	116.4
12.00	4.90	29.6	166	98.6
20.00	5.00	28.7	176	70.2
26.50	6.00	42.5	171	52.2
33.50	6.75	37.3	163	35
48.50	7.63	43.5	179	13.6
58.00	7.13	44.6	184	4
72.00	6.00		209	0
94.00	9.00		234	0
117.75	19.00	112.4	320	0
145.50	26.25	176.3	347	
170.00	29.25	114.1	333	
398.00	40.00	142.6	362	
696.00	30.00	53.7	294	

10

20

30

【 0 2 6 5 】

【表 2 0】

表20

HA4 (IV PEG-pdFVIII) イヌ15

時間(h)	WBCT(分)	APTT(分)	ACT(分)	ELISA(%正常)
0.00	26.25	84.2	396	0
0.16	40.00	77	227	179.2
0.50	22.50	62.3	168	170.8
1.00	8.25	33.4	151	166.2
2.16	6.00	24.4	158	151.8
4.00	5.25	30.6	165	129.8
8.00	7.50	29.6	150	115.6
11.00	8.50	31.5	157	100.2
21.00	6.50	35.3	185	68.8
24.75	7.00	34.3	162	55
32.50	7.00	38.3	177	35.8
46.00	6.25	43.5	174	18.4
52.25	6.75	45.7	167	11
72.75	7.00	53.7	203	0
97.00	22.00	79.8	334	0
120.50	20.50	102.5	356	
143.50	23.50	178.4	306	
165.00	34.50	114.1	371	

10

20

30

【 0 2 6 6 】

【表 2 1】

表21

HA5 (SQ pdFVIII) イヌ17

時間(h)	WBCT(分)	APTT(分)	ACT (分)	ELISA(%正常)
0.00	31	104.2		0
0.166	21	137	351	0
0.5	31.5	100.9	311	0
1	19.25	105.8	268	0
2	16	98.5	268	0
4	18	84.2	261	0
8	13.25	105.8	238	0.186
12	13	79.8	200	0
18	12.5	93.1	230	0
24	10.25	82.7	226	0
36	15.5	84.2	247	0
48	18.5	122.7	237	0
56	19.25	148.3	278	0
72	23		364	0.489
96	25.5	122.7	347	0
120		109.1	328	0
192	37.00	87.1	334	0
432	40	128	375	0

10

20

30

【 0 2 6 7 】

## 【表 2 2】

表22

HA6 (SQ PEG-pdFVIII 低投与量) イヌ16

時間(h)	WBCT(分)	APTT(分)	ACT(分)	ELISA(%正常)
0.00	31.75	81.3	321	0
0.166	39	104.2		0
0.5	33.5	115.8	298	0
1	12.5	94.2	224	0
2	8.25	82.7	190	0.131
4	9	62.3	168	9.006
8	9	44.5	188	8.621
12	7.5	40.4	156	3.053
18	7	49.1	179	5.148
24	7.75	57.3	168	6.167
36	11.5	62.3	180	6.553
48	8.75	68.8	217	2.419
56	15	74.2	178	5.01
72	10.5	88.6	215	2.364
96	27	110.7	281	0
120		90.1		0
192	31.25	100.9	323	0
432	35.5	93.1	333	0

10

20

30

## 【0268】

## 実施例 8 : イヌにおける皮下投与に対する免疫応答

本発明において、皮下投与から生じる免疫応答は低くなることが観察された。この効果は、血液因子投与の分野の当業者によって本発明以前に予測されたものと正反対である。皮下投与することによって、存在する非常に高いレベルの免疫応答（F V I I I 阻害剤の頻度）が悪化するであろうということが一般に受け入れられていた。

## 【0269】

本発明において、非常に驚くべき結果が見出された。免疫（阻害剤）応答の発生を低下させるために、免疫応答のレベルが全身曝露のレベルに直接関連する皮下投与を採用することが提案された。皮下投与を提供することによって、 $C_{max}$  が大幅に低下し、そうすることで免疫応答が低下した。

40

## 【0270】

本発明の実施例において、PEG 化生成物を免疫環境、すなわちイヌの系のほとんどの試験に露出していた。静脈内に与えられたとき、ベセスダ値（阻害剤量の単位）が最も高く、最も早いことがわかる。対照的に、皮下送達では、 $C_{max}$  およびより低く、より遅いベセスダ反応からわかるように、全身曝露が非常に少ない。実際に、すべての中で最も低い値は、SQ で与えられた裸の F V I I I であり、これは全身曝露がほとんどなく、阻害剤値がみられなかった。図 1 3 / 表 2 3 に得られたデータを示す。

## 【0271】

50

【表 23】

表23

まとめ				ベセスダ単位			
生成物および経路	N(被験体数)	Cmax	PRE	7日	14日	30日	
PEGFVIII IV	2	177.8	0	0	20	17.5	
PEGFVIII SQ	2	32	0	0	10	17	
PEGFVIII SQ (LD)	1	9.0	0	0	0	6	
FVIII SQ	1	0.5	0	0	0	0	

10

## 【0272】

図13のプロットは、この治療によって刺激されたときに、時間に対して、血漿中にどの程度の阻害剤活性が見出されたかを示す。直接IV治療の場合、系によりゆっくりと到達し、免疫系に対して刺激の少ないSQ治療と比較して、より高い阻害剤のレベルがより速く発生する。

## 【0273】

実施例9：ラットにおける皮下投与についての比較研究

この実施例は、PEGなどのポリマーに共役したとき、血液因子にみられる驚くべき貯蔵効果について述べる。さらに、この結果は、PEGのサイズ(または量)からタンパク質上に与えられる水和のレベルを操作することによって、皮下腔から血液因子が利用できるようになる速度を設計することが可能であることを示す。

20

## 【0274】

3つの異なる形態のPEG化によるPEG化された第VIIa因子の相対的な薬物動態をラット被験体で研究し、皮下腔からの送達の観点でこれらの性能を比較した。

## 【0275】

天然、組み換えの第VIIa因子、および3つの異なるPEG化形態のFVIIaをラット被験体に、皮下(SQ)または静脈内(IV)投与した：

a) TherapePEG化FVIIa：Polytherics社の「TherapePEG」技術(他に、およびWO 2011/135308に記載される)を用いてFVIIaを20kDaのPEG分子にモノ-PEG化した。

30

## 【0276】

b) GlycoPEG化FVIIa：ジ-共役された20kDaのPEGが主成分であり、いくつかの相当量のより高次のPEG生成物をも含む試験生成物を与える標準的なglycoPEG化技術によって、FVIIaをPEGに共役させた：

c) HATU-触媒PEG化FVIIa：FVIIaを20kDaのPEGにモノPEG化した(US5644029に記載されるものから導出される共役法を用いて)。

## 【0277】

TherapePEG-FVIIa

20kDaのPEGを、5mMのリン酸Na、pH8.0、15mMのNaCl、2mMのEDTAに、10mg/mLで分散させた。その後、これを20で3時間培養した。バイアル瓶のFVIIa(5.3mg)を、20mMのクエン酸ナトリウム、pH6.0、0.1MのNaCl、10mMのEDTA中で、0.8mg/mLに再構成した。これを20で10分間培養した。その後、24mMのTCEPの1.5モル当量(ME)および0.4mMのSeCMの0.025MEを添加し、20で1時間培養した。その後、2MEの活性化されたPEGを還元されたFVIIaに添加した。混合物を20で1時間、その後5で17時間培養した。その後、PEG化FVIIaを精製するために、調合緩衝液(formulation buffer)中で、Superdex 200カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーを行った。

40

## 【0278】

50

生成物の分析のために、再構成された r F V I I a、活性化された P E G、反応混合物、および選択された S u p e r d e x 画分 ( 2 5、3 0、3 5、3 9、4 5、5 1、8 0 ) を非還元 S D S - P A G E ゲルで処理した。P E G 化 F V I I a を含む画分を、凍結乾燥に先立って、プールして、約 3 m L に濃縮した。濃縮した S E C のプールは、凍結乾燥の前および後の両方で、凝固活性 ( c l o t t i n g a c t i v i t y ) および逆相 H P L C アッセイを、還元および非還元 S D S - P A G E によって試験した。

【 0 2 7 9 】

G l y c o P E G 化 F V I I a

バイアル瓶の r F V I I a ( 5 . 3 m g ) を、2 . 5 m L の M O P S 緩衝食塩水中で再構成した。その後、再構成した r F V I I a を、P D 1 0 脱塩カラム上で M O P S 緩衝食塩水に緩衝液交換し、1 m g / m L まで希釈した。緩衝液交換した r F V I I a を氷上に置き、1 0 0 m M の過ヨウ素酸ナトリウムを、最終濃度 2 . 5 m M まで添加した。混合物を最大 3 0 分間、暗所で培養した。グリセロール ( 5 0 % ) を、最終濃度 3 % まで添加した。次いで、Z e b a スピンカラムを用いて、混合物を 0 . 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液に緩衝液交換した。アミノオキシ P E G の 5 0 m g / m L のストック溶液を作製し、この P E G の 1 0 M E を脱塩された F V I I a に添加した。反応混合物を、4 で一晩さらに培養する前に、1 ~ 2 時間室温で培養した。その後、G l y c o P E G 化 F V I I a を、上記のように S E C クロマトグラフィーによって精製した。

10

【 0 2 8 0 】

生成物の分析のために、選択された S E C 画分 ( 2 3、2 7、3 2、3 5、4 0 および 8 0 ) を非還元 S D S - P A G E で処理した。G l y c o P E G 化 F V I I a を含む画分は、凍結乾燥に先立って、プールして、約 3 m L に濃縮した。濃縮した S E C のプールは、凍結乾燥の前および後の両方で、凝固活性および逆相 H P L C アッセイを、還元および非還元 S D S - P A G E によって試験した。

20

【 0 2 8 1 】

H A T U P E G - F V I I a

バイアル瓶の r F V I I a ( 5 . 3 m g ) を、2 . 5 m L のホウ酸塩緩衝液中で再構成し、P D 1 0 カラム上でホウ酸塩緩衝液に緩衝液交換し、0 . 5 m g / m L まで希釈した。メトキシ - P E G のストック溶液をアセトニトリル中で 1 6 m g / m L に作製した。緩衝液交換した r F V I I a を H A T U の 1 . 0 M E および D I E A の 2 . 5 M E を用いて室温で 1 0 分間活性化した。活性化後、メトキシ - P E G の 8 M E を活性化された r F V I I a に 2 ~ 5 分間かけて添加した。次いで、反応混合物を 8 0 ~ 1 0 0 分間室温で培養した。その後、H A T U P E G 化 F V I I a を、上記のように S E C クロマトグラフィーによって精製した。

30

【 0 2 8 2 】

生成物の分析のために、選択された S E C 画分を非還元 S D S - P A G E で処理した。H A T U P E G 化 F V I I a を含む画分は、凍結乾燥に先立って、プールして、約 3 m L に濃縮した。濃縮した S E C のプールは、凍結乾燥の前および後の両方で、凝固活性および逆相 H P L C アッセイを、還元および非還元 S D S - P A G E によって試験した。

40

【 0 2 8 3 】

方法

0 . 5 m g / k g の投与量での製剤を、I V または S Q のいずれかで、健康なラットの被験体に投与した。I V 投与では、適当な体積の試験物質を尾静脈に注射した。S Q 投与では、適当な体積の試験物質を首筋に注射した。対照試験物質 ( ネイティブ r F V I I a ) の投与後、血液試料を以下の時間間隔で採取した：

【 0 2 8 4 】

【表 2 4】

時間(h)	0.033	0.25	0.5	1	1.5	2	3	4	6	8	12	18	24	36	48
IV対照	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
SQ対照		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

10

20

30

40

【 0 2 8 5 】

試験物質の投与後、血液試料を以下の時間間隔で採取した：

【 0 2 8 6 】

【表 2 5】

表25	時間(h)	0.033	0.25	0.5	1	2	4	6	8	12	18	24	48	72	96	120
	IV物質	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	SQ物質		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

10

20

30

40

【 0 2 8 7】

それぞれの時点で、血液試料から血漿を調製し、FVIIa濃度をStago Asserachrom VII:Ag ELISAアッセイを用いて決定した。このアッセイは、血漿試料中の第VII/VIIa因子濃度の定量的な決定のための酵素結合免疫測定法の手順である。このアッセイは、ウサギ抗ヒトFVII抗体であらかじめコートしたマイクロタイターウェルから構成されるサンドイッチELISAである。抗体がFVIIaに対してPEG-FVIIaとは異なる親和性を有するため、標準曲線は、試験血漿中に存在するFVIIaに適切なタンパク質の希釈により準備した、すなわち、rFVIIa

50

を投与したラットの血漿のアッセイには r F V I I a ( 0 . 7 8 ~ 5 0 n g / m l )、または、 P E G - r F V I I a を投与したイヌの血漿のアッセイには P E G - r F V I I a ( 0 . 7 8 ~ 5 0 n g / m l )。

【 0 2 8 8 】

血漿試料を、標準曲線に入るように、適当な濃度に希釈した。希釈した血漿試料と標準試料を設置し、室温で培養し、その後、洗浄し、続いてウサギ抗ヒト F V I I H R P 共役体および O P D ( 比色分析 H R P 基質 ) で成長させた。プレートを 4 9 2 n m で読み、試験試料の濃度 ( n g / m l ) を標準曲線から読みとった。この研究の結果を表 2 6 ( a ) と ( b ) に示す。ここで、 P E G 化 F V I I a 分子およびネイティブの F V I I a である対照アームのそれぞれに投与経路が 2 つ ; 静脈内 ( I V ) 投与および皮下 ( S Q ) 投与 ; ある。

10

【 0 2 8 9 】

表 2 6 ( a ) および ( b ) に示されるように、 P E G 化 F V I I a 分子およびネイティブの F V I I a である対照アームのそれぞれに、静脈内 ( I V ) 投与および皮下 ( S Q ) 投与の 2 つの投与経路がある。

【 0 2 9 0 】

この実施例は、 P E G などのポリマーに共役したとき、血液因子にみられる驚くべき貯蔵効果について述べる。さらに、この結果は、 P E G のサイズ ( または量 ) からタンパク質上に与えられる水和のレベルを操作することによって、皮下腔から血液因子が利用できるようになる速度を設計することが可能であることを示す。

20

【 0 2 9 1 】

表 2 6 ( a ) および ( b ) に示された結果から、以下のことがわかる :

- ・全ての P E G 化タンパク質は、裸のタンパク質と比べて血漿半減期が長かった。

【 0 2 9 2 】

モノ - P E G 化生成物、すなわち T h e r a P E G および H A T U P E G 化タンパク質は、ジ - P E G 共役体 ( G l y c o P E G ) よりも血漿に入る速度が遅く、したがって、より顕著な貯蔵効果があることがわかった。これは、各生成物の I V および S Q の半減期の差を比較することから推定されうる。

【 0 2 9 3 】

・ T h e r a P E G - F V I I a では、 I V の  $t_{1/2}$  は 8 . 6 8 時間であり、 S Q に よって与えられた同じ生成物の 2 3 . 2 時間と比較した。これは 2 . 7 倍の増加を示し、このモノ - P E G 化生成物で非常に大きい貯蔵効果が示された。

30

【 0 2 9 4 】

・同様に、モノ - P E G 化 H A T U P E G - F V I I a では、 S Q の  $t_{1/2}$  は I V の  $t_{1/2}$  に対して 1 . 7 倍 ( 2 4 . 3 / 1 4 . 0 7 ) の増加によって示される、高い貯蔵効果を有する。

【 0 2 9 5 】

・対照的に、多 P E G 化 ( h e a v i l y P E G y l a t e d ) 生成物である G l y c o P E G - F V I I a では、両方の製品の半減期は同等に ( 2 2 . 3 / 1 9 . 3 4 = 1 . 1 5 倍 ) より近く、この生成物の S Q 投与は、 I V 投与と比較して貯蔵効果が小さいことが示唆される。

40

【 0 2 9 6 】

つまり、モノ - P E G 化生成物は、 S Q 投与されたとき、ジ - P E G 化生成物よりも、皮下腔を通過してより長く分散されることに抵抗し、したがって高い貯蔵効果を与えるものと考えられる。モノ - P E G 化生成物上の P E G の量の減少は、タンパク質のより多くを露出させたままにするであろう ; G l y c o P E G 生成物上の P E G 被覆が大きいほど、皮下腔内でより水分散性が高くなり、リンパ管を通過して血漿へ入る速度が速くなるものと考えられる。

【 0 2 9 7 】

したがって、驚くべきことに、デポー放出の最長の持続時間を達成するためには、より

50

少ない程度のPEG化が必要とされる。理論によって拘束されることなく、これは、より少ない程度のPEG化によってタンパク質の一部が皮下組織にさらされ、これによってリンパを通じた拡散の速度が遅くなる、ということで説明されうる。一方、より高い程度のPEG化は、タンパク質を完全に被覆し、生成物を自由に、血液循環に速やかに入れるようにする。

【0298】

これは、標的分子の修飾（この場合はPEG化によって）が、放出特性を見事に修正し、これによって長期にわたる血中の生成物の濃度およびそのバイオアベイラビリティを修正するために調整されうるという教示を支持する。

【0299】

PEG化とその後の皮下投与の組み合わせによって、みかけの半減期において35倍の増加が観察される（裸のFVIIaの0.66時間から皮下（SQ）投与後の23.2時間に）という、非常に驚くべき全体としての効果がある。

【0300】

最後に、全体に、バイオアベイラビリティは、より高いPEG化種、すなわちGlycoPEGを支持し、より高いPEGおよび水和レベルは、より高い移動度の程度、したがって、バイオアベイラビリティを促進することが確認されることがわかる。

【0301】

【表 26 - 1】

表 26(a)

試験物質	投与経路	ラット	T <sub>max</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	AUC <sub>0-t</sub> (ng.h/ml)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng.h/ml)	t <sub>1/2</sub> (h)
FVIIa	IV	1	0.03	2251.8	600	624	0.55
		2	0.03	2538.3	711	728	0.75
		3	0.03	1892.3	533	561	0.66
		平均	0.03	2227.47	615	638	0.65
TheraPEG-FVIIa	IV	4	0.03	10024.5	33598	34021	8.97
		5	0.03	8181	22051	22435	9.42
		6	0.03	10799.7	23251	23449	7.66
		平均	0.03	9668.40	26300	26635	8.68
GlycoPEG-FVIIa	IV	7	0.03	6647.2	55987	57138	21.24
		8	0.03	5674.9	46702	47609	21.21
		9	0.03	6227.3	47188	47663	15.57
		平均	0.03	6183.13	49959	50803	19.34
HATU 触媒 PEG-FVIIa	IV	10	0.03	8090.5	31172	31775	13.49
		11	0.03	7586.5	30448	31003	13.07
		12	0.03	7557.1	35317	35697	15.66
		平均	0.03	7744.70	32312	32825	14.07

【 0 3 0 2 】

10

20

30

40

【表 26 - 2】

試験物質	投与経路	ラット	T <sub>max</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	AUC <sub>0-t</sub> (ng.h/ml)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng.h/ml)	t <sub>1/2</sub> (h)	バイオアベイラビリティ (% AUC <sub>0-t</sub> SQ vs IV)
TheraPEG-FVIIa	SQ	16	18.0	215.5	8015	9557	23.96	30.5
		17	12.0	117.6	3695	4839	21.15	14.0
		18	18.0	129.3	4227	5805	24.52	16.1
		平均	16.0	154.13	5312	6734	23.21	20.2
GlycoPEG-FVIIa	SQ	19	18.0	297.8	16868	17665	22.27	33.8
		20	24.0	234.3	12471	13456	23.55	25.0
		21	18.0	407.6	22243	22871	21.16	44.5
		平均	20.0	313.23	17194	17997	22.33	34.4
HATU 触媒 PEG-FVIIa	SQ	22	18.0	224.8	10234	10996	20.85	31.7
		23	18.0	138.7	5544	6750	28.03	17.2
		24	18.0	249.1	11277	12147	24.03	34.9
		平均	18.0	204.20	9018	9964	24.30	27.9

表 26 (b)

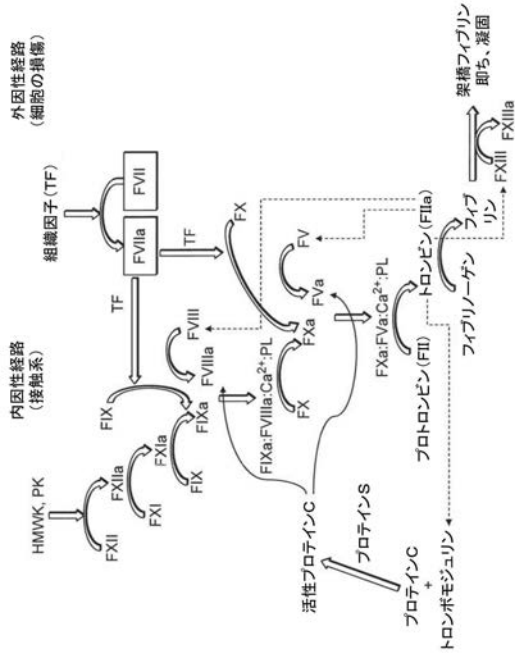
10

20

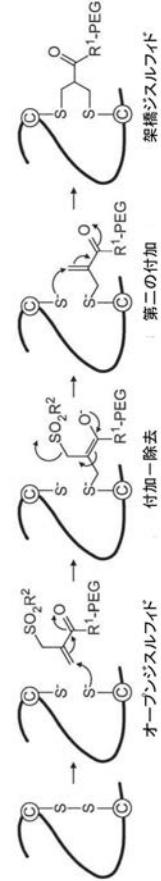
30

40

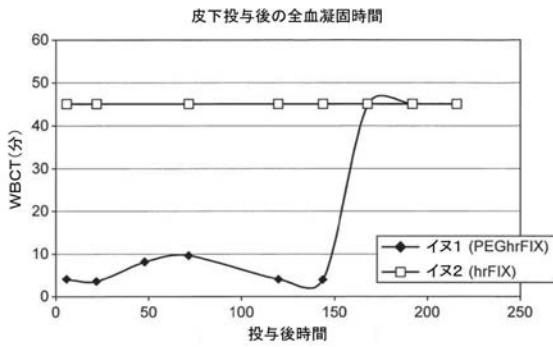
【 図 1 】



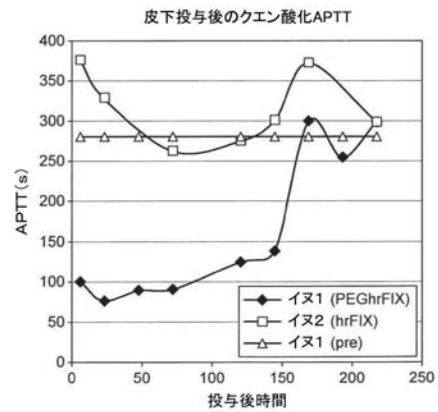
【 図 2 】



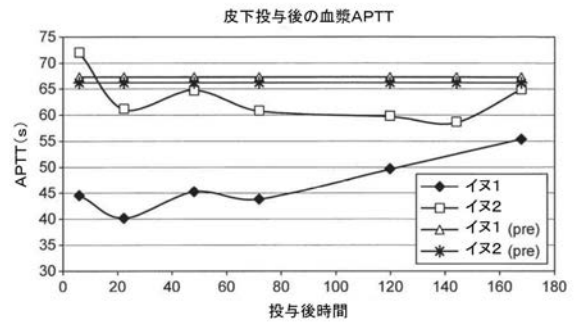
【 図 3 】



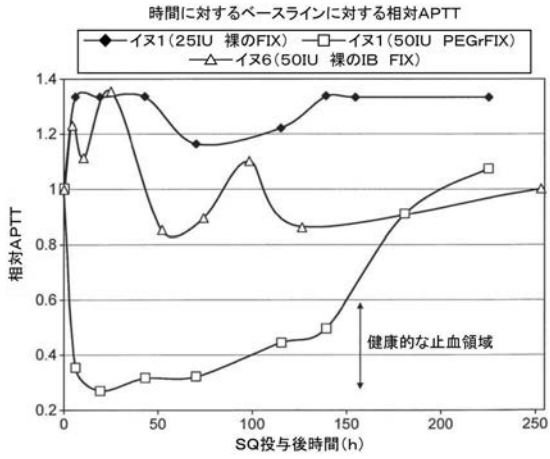
【 図 4 】



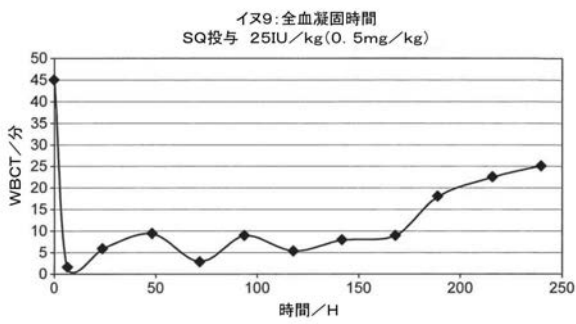
【 図 5 】



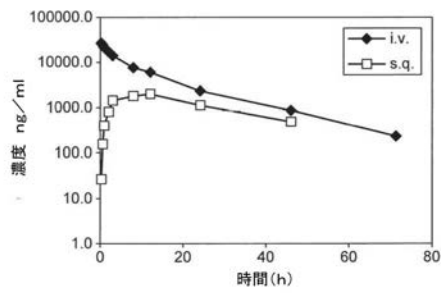
【 図 6 】



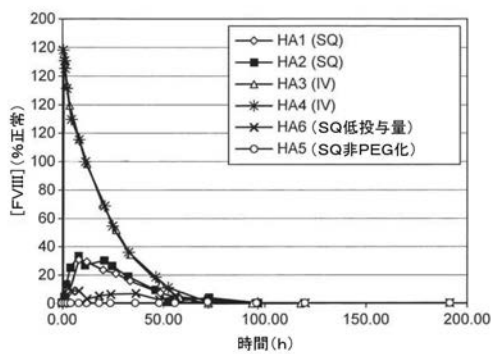
【 図 7 】



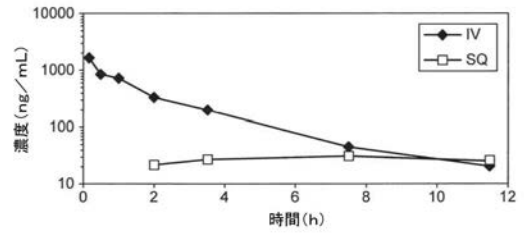
【 図 1 0 】



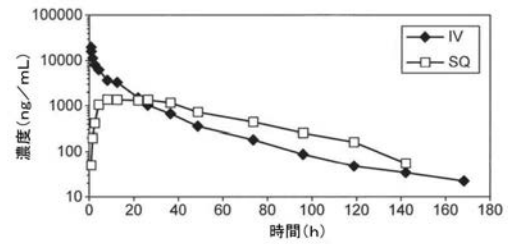
【 図 1 1 】



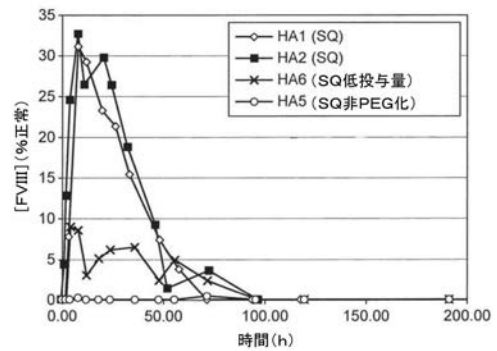
【 図 8 】



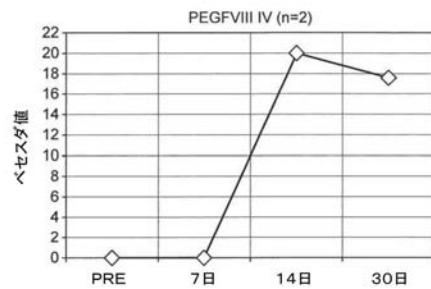
【 図 9 】



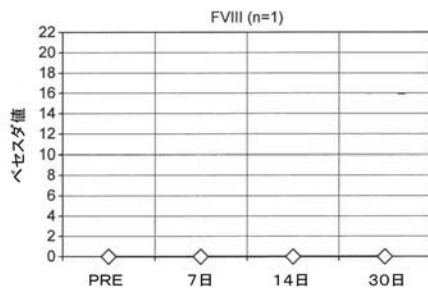
【 図 1 2 】



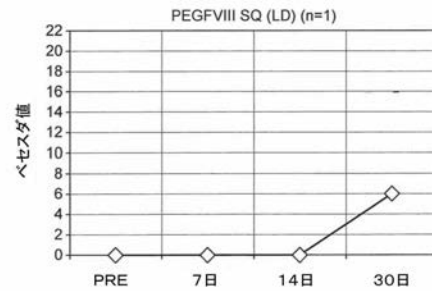
【 図 1 3 a 】



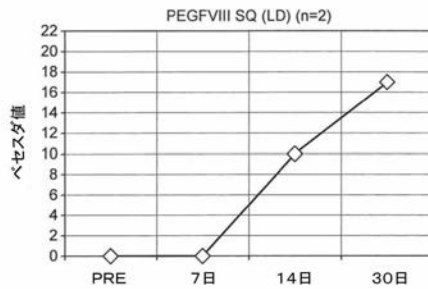
【図 1 3 b】



【図 1 3 d】



【図 1 3 c】



## 【手続補正書】

【提出日】平成29年9月29日(2017.9.29)

## 【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者の血液凝固疾患または外傷の治療に用いられる血液凝固因子の薬剤組成物であって

ポリエチレングリコール(PEG)分子に共役した血液凝固因子である第VII因子を含み、

正常な止血が維持される間隔で患者に皮下投与され、

前記PEG分子は、セリンもしくはトレオニン残基を介して、糖残基上のヒドロキシル残基を介して、単一のシステイン残基を介して、またはアミド、N-末端アミノ基、もしくはカルボキシル基を介して、直接的または間接的に前記血液凝固因子に共役される、薬剤組成物。

【請求項 2】

賦形剤をさらに含む、請求項 1 に記載の薬剤組成物。

【請求項 3】

前記賦形剤は、リポソーム、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 2 に記載の薬剤組成物。

【請求項 4】

前記血液凝固因子の投与量が1～1000IU/kgである、請求項1～3のいずれか1項に記載の薬剤組成物。

【請求項5】

前記血液凝固因子の投与量が5～500IU/kgである、請求項1～3のいずれか1項に記載の薬剤組成物。

【請求項6】

前記血液凝固因子の投与量が100～250IU/kgである、請求項1～3のいずれか1項に記載の薬剤組成物。

【請求項7】

前記血液凝固因子の投与量が50～200IU/kgである、請求項1～3のいずれか1項に記載の薬剤組成物。

【請求項8】

前記血液凝固因子の投与量が25～50IU/kgである、請求項1～3のいずれか1項に記載の薬剤組成物。

【請求項9】

前記血液凝固因子の投与量が5～50IU/kgである、請求項1～3のいずれか1項に記載の薬剤組成物。

【請求項10】

少なくとも1日1回投与される、請求項1～9のいずれか1項に記載の薬剤組成物。

【請求項11】

1日2回投与され、患者が第1投与および第2投与を受ける、請求項10に記載の薬剤組成物。

【請求項12】

前記第2投与が、前記第1投与と別々に、同時に、または連続して投与される、請求項11に記載の薬剤組成物。

【請求項13】

ポリエチレングリコール(PEG)分子に共役した血液凝固因子である第VII因子を含み、皮下に投与される薬剤組成物であって、

前記血液凝固因子の投与量が1～1000IU/kgであり、

前記PEG分子は、セリンもしくはトレオニン残基を介して、糖残基上のヒドロキシル残基を介して、単一のシステイン残基を介して、またはアミド、N-末端アミノ基、もしくはカルボキシル基を介して、直接的または間接的に前記血液凝固因子に共役される、薬剤組成物。

【請求項14】

治療薬である第VII因子のPEG化形態を含み、皮下に投与される薬剤組成物であって、

前記PEGは、直接的または間接的に前記治療薬に共役され、

血中の前記治療薬の濃度が治療量に達しないレベルに低下する前に患者に繰り返し皮下投与されて患者に持続的な治療効果を与え、

前記PEG分子は、セリンもしくはトレオニン残基を介して、糖残基上のヒドロキシル残基を介して、単一のシステイン残基を介して、またはアミド、N-末端アミノ基、もしくはカルボキシル基を介して、直接的または間接的に前記血液凝固因子に共役される、薬剤組成物。

【請求項15】

請求項1～14のいずれか1項に記載の薬剤組成物および投与用ビヒクルを含む、キット。

## 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 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	M
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 38/43	
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 38/46	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 38/00	
A 6 1 K 38/36 (2006.01)	A 6 1 K 38/36	
A 6 1 K 38/37 (2006.01)	A 6 1 K 38/37	

- (72)発明者 ウォルフ - ギャラウェイ, リチャード  
英国, ロンドン, ベッドフォード スクエア 13, レヴァトン ハウス, レヴァトン ライセン  
ス ホールディングス リミテッド
- (72)発明者 メイヨ, ジョン チャールズ  
英国, ロンドン, ベッドフォード スクエア 13, レヴァトン ハウス, レヴァトン ライセン  
ス ホールディングス リミテッド
- (72)発明者 アール, マイケル ジェイムス  
英国, ロンドン, ベッドフォード スクエア 13, レヴァトン ハウス, レヴァトン ライセン  
ス ホールディングス リミテッド

F ターム(参考) 4C076 AA95 BB16 CC03 CC14 CC30 CC32 EE06E EE06M EE06N EE09F  
EE09M EE09N EE13E EE13M EE13N EE23E EE23M EE23N EE30E EE30M  
EE30N EE32E EE32M EE32N EE37E EE37M EE37N EE38E EE38M EE38N  
EE41E EE41M EE41N EE48E EE48M EE48N EE59E EE59N FF32 FF34  
4C084 AA17 BA37 BA41 BA44 DB01 DC10 DC15 DC16 DC17 DC18  
DC20 MA05 MA70 NA10 NA11 NA12 NA20 ZA531 ZA532 ZB352  
4C085 AA14 CC23 GG04

【外国語明細書】

2018024684000001.pdf

2018024684000002.pdf

2018024684000003.pdf

2018024684000004.pdf