

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4388875号
(P4388875)

(45) 発行日 平成21年12月24日(2009.12.24)

(24) 登録日 平成21年10月9日(2009.10.9)

(51) Int.Cl. F I
A 6 1 K 38/00 (2006.01)
A 6 1 K 9/08 (2006.01)
A 6 1 K 47/18 (2006.01)
A 6 1 K 47/42 (2006.01)
A 6 1 P 7/04 (2006.01)

A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 9/08
A 6 1 K 47/18
A 6 1 K 47/42
A 6 1 P 7/04

請求項の数 9 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2004-289910 (P2004-289910)	(73) 特許権者	501391179
(22) 出願日	平成16年10月1日(2004.10.1)		グリフォルス, エセ. ア.
(65) 公開番号	特開2005-112855 (P2005-112855A)		スペイン国 08005 バルセロナ, プ
(43) 公開日	平成17年4月28日(2005.4.28)		ランタ 26, トレ マプフレ, セ/デ
審査請求日	平成17年10月4日(2005.10.4)		ラ マリナ, 16-18
(31) 優先権主張番号	200302298	(74) 代理人	100064447
(32) 優先日	平成15年10月3日(2003.10.3)		弁理士 岡部 正夫
(33) 優先権主張国	スペイン(ES)	(74) 代理人	100085176
			弁理士 加藤 伸晃
		(74) 代理人	100106703
			弁理士 産形 和央
		(74) 代理人	100096943
			弁理士 臼井 伸一
		(74) 代理人	100091889
			弁理士 藤野 育男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト由来のF V I I I、vWFまたはF V I I I / vWF複合体の生物学的に安定な液体組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

金属用キレート剤、ヘパリン及びヘパリンナトリウムから選ばれる特定リガンドおよびアンチトロンビンとともにヒト由来のF V I I IもしくはvWFまたはF V I I I / vWF複合体の濃縮物を含むことを特徴とする、ヒト由来のF V I I IもしくはvWFまたはF V I I I / vWF複合体の生物学的に安定な液体組成物。

【請求項2】

前記金属用キレート剤は、前記濃縮物の2～100mmol/lの濃度で使用されることを特徴とする、請求項1に記載のヒト由来のF V I I IもしくはvWFまたはF V I I I / vWF複合体の生物学的に安定な液体組成物。

【請求項3】

前記金属用キレート剤はEDTAであることを特徴とする、請求項1に記載のヒト由来のF V I I IもしくはvWFまたはF V I I I / vWF複合体の生物学的に安定な液体組成物。

【請求項4】

前記金属用キレート剤はEDTACaNa₂(EDTAのナトリウムおよびカルシウム塩)であることを特徴とする、請求項1に記載のヒト由来のF V I I IもしくはvWFまたはF V I I I / vWF複合体の生物学的に安定な液体組成物。

【請求項5】

前記リガンドは、前記濃縮物の0.1～10U/mlの濃度で含まれることを特徴とす

る、請求項1に記載のヒト由来のF V I I Iもしくはv W FまたはF V I I I / v W F複合体の生物学的に安定な液体組成物。

【請求項6】

前記リガンドはヘパリンであることを特徴とする、請求項1に記載のヒト由来のF V I I Iもしくはv W FまたはF V I I I / v W F複合体の生物学的に安定な液体組成物。

【請求項7】

前記リガンドはヘパリンナトリウムであることを特徴とする、請求項1に記載のヒト由来のF V I I Iもしくはv W FまたはF V I I I / v W F複合体の生物学的に安定な液体組成物。

【請求項8】

前記アンチトロンビンは、0.01 IU / IU F V I I Iより大きい濃度で存在することを特徴とする、請求項1に記載のヒト由来のF V I I Iもしくはv W FまたはF V I I I / v W F複合体の生物学的に安定な液体組成物。

【請求項9】

前記アンチトロンビンは、0.01～1 IU / IU F V I I Iの濃度で存在することを特徴とする、請求項8に記載のヒト由来のF V I I Iもしくはv W FまたはF V I I I / v W F複合体の生物学的に安定な液体組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、第V I I I因子（F V I I I）もしくはフォン・ビルブラント因子（v W F）または第V I I I因子 / フォン・ビルブラント因子複合体（F V I I I / v W F）の生物活性の安定性が維持され、治療上使用することが可能な液体組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

F V I I I（第V I I I凝固因子）は、血液凝固の固有の経路のコースに必須である血漿タンパク質である。このF V I I Iの欠損または欠陥は、X染色体に関連した遺伝病である血友病Aとして知られる凝固メカニズムの衰退を招く。フォン・ビルブラント因子（v W F）は、損傷した血管表面への血小板付着を担う血漿タンパク質であり、したがってv W Fの量的または質的欠陥（フォン・ビルブラント病）は初期止血の衰退をもたらす。さらに、v W Fは、血漿中でF V I I I輸送体として作用する（非特許文献1）。

【0003】

自然状態でのF V I I I / v W F複合体は、F V I I I : v W Fにおいて1 : 100の比を有し、すなわちv W Fのおよそ100個の分子毎に対してF V I I Iの1個の分子が存在し、したがってF V I I I / v W F複合体の安定性の結果は、精製v W F濃縮物に当てはまる。

【0004】

精製F V I I I濃縮物は、血友病Aの治療用に臨床的実践で使用されている。高含有量のv W Fを有するF V I I I濃縮物もまた、フォン・ビルブラント病の治療用に治療上使用することができる。

【0005】

タンパク質、特に不安定な生物活性を有するタンパク質（例えば、F V I I I）の安定性は、それらの治療用調製物にとって主要な問題である。この問題は、製品を凍結乾燥させることでこれまで解決されてきており、したがってF V I I I、v W FまたはF V I I I / v W Fの濃縮物の治療用調製物は、それらの生物活性を保護するために凍結乾燥形態で入手可能である。現段階では、液体最終配合物でのF V I I I、v W FまたはF V I I I / v W Fの治療用濃縮物は世界中のどこにも販売されていない（非特許文献2）。

【0006】

凍結乾燥は、高価であり、さらに製品の収量を減少させるプロセスである。したがって、液体配合物は、凍結乾燥物の再構成を回避するため、より簡単な投与を可能にする。ま

10

20

30

40

50

た、適切な注入デバイスに予め計りとった液体製品（すぐに使用できる）を患者に利用しやすくすることができることにより、患者が抱く患者の疾患および患者に製品への依存の理解の点で心理的な有益性をもたらし得る。

【0007】

上述のように、これ以降に挙げる文献に関わらず、現段階では、液体配合物でのF V I I I、v W FまたはF V I I I / v W F複合体の治療用濃縮物は世界中のどこにも販売されていない。

【0008】

F V I I Iの安定性に関するこれまでの参考文献が存在する。

【0009】

特許文献1は、アルギニンならびに洗浄剤および／または有機ポリマーを有するF V I I Iの配合物に関する。この配合物は、安定剤としてアルブミンを添加することや、それを用いて1 0 0 0 I U / m gを上回る比活性を達成することも予知していない。このF V I I Iは凍結乾燥最終形態である。

【0010】

特許文献2は、凍結乾燥F V I I I濃縮物の再構成を容易にする目的で、アルギニンを有する配合物に関する。

【0011】

特許文献3は、プロセス工程中でF V I I Iを安定化するために、炭水化物を使用することに関する。このF V I I Iも凍結乾燥最終形態である。

【0012】

特許文献4は、血漿タンパク質、特に凝固因子、具体的にはF V I I IおよびF I Xの安定な液体配合物に関するが、それはv W Fにも関する。概して、その目的は、4℃～37℃で3年以上の安定性であり、活性の50%を維持することである。実施例の大部分は、F I Xに関するものであり、異なる分子が関与しているため、その安定性は、F V I I I / v W F複合体の安定性に匹敵しない。F V I I Iを用いて実施した試験は、その目的が最終生成物の安定性ではなく、連続短期注入（数時間または数日）用のポンプでの使用であるため、37℃で実施されている。それらの試験では、5日後のF V I I Iの水性配合物はその活性の50%以上を損失した。したがって、液体配合物（水中）は、それが治療用製品として販売されるのに十分な安定性、すなわち必要とされる6ヶ月以上、好ましくは1年以上の貯蔵寿命を提供しない。

【0013】

特許文献5は、r - V I I I S QおよびF I Xの溶液中の安定化に関する。この安定化は、炭水化物の添加、ならびに溶液の酸素含有量の低減あるいは酸化防止剤の添加および／または酸素の乏しい雰囲気中もしくは不活性ガス中での保管により実施される。この配合物は、r - V I I I S Q（これは、相当する遺伝子に由来する配列の大部分が排除された遺伝子操作により得られるタンパク質である）を参照して開発され特許となっている。提示されたデータは、25℃で12ヶ月間の安定性および7℃で18ヶ月間の安定性を実証する。r - V I I I S Qは遺伝的に改質された分子であるため、それらの結果は、血漿由来の天然ヒトF V I I IまたはF V I I I / v W F複合体に匹敵しない。r - V I I I S Qは、非ヒト細胞で「試験管内で（in vitro）」合成されるのに対し、血漿由来のヒトF V I I Iは、ヒト肝臓で「生体内で（in vivo）」合成される。このことは、これらの分子間にかなりの差異（例えば、分子中の糖の含有量の変化（これは、血漿半減期のような薬物動態の差異に反映される））が存在することを意味する。さらに、r - F V I I I S Qは、分子の一部（ほぼ40%）の欠失を包含する。著者によっては、組換え由来の第V I I I因子を用いた阻害剤の開発におけるより大きな影響を報告している。このことにより、可能であれば、r - V I I I S Qのようなこれらの組換え因子は天然ヒトF V I I Iとさらに識別される。したがって、血漿由来のヒトF V I I Iの分子はr - V I I I S Qと異なる分子であり、それらは異なる分子であるため、その安定性は比較することができないことが考慮されなくてはならない。v W Fはr - V

10

20

30

40

50

I I I S Qには存在しないことも留意されなくてはならない。

【0014】

特許文献6は、皮下、筋内または皮内投与用の1000IU/mlの最小濃度でのr-V I I I S Qの配合物に関する。上述の場合と同じ分子が関与するため、その結果は、ヒト由来のF V I I I、v W FまたはF V I I I / v W F複合体に匹敵しない。

【0015】

特許文献7は、特定濃度の二価金属イオンの存在を溶液中のr-V I I I S Qの安定性の改善と関連させており（具体的には、 Zn^{2+} および Cu^{2+} ）、また界面活性剤（Twee n）およびヒスチジンの存在も考慮している。この特許は、r-V I I I S Qを安定化するための別の試みを表しており、本発明の主題から逸脱している。

10

【0016】

したがって、治療用製品として使用することができるのに十分な期間、液体配合物において生物活性を提示することが可能であるような、すなわち6ヶ月以上の間溶液中で安定である血漿由来の天然ヒトF V I I I、v W FまたはF V I I I / v W F複合体の安定化に関する従来技術は存在しない。

【特許文献1】スペイン特許第ES 2. 111. 579号

【特許文献2】米国特許第5, 399, 670号

【特許文献3】スペイン特許第2. 097. 120号

【特許文献4】米国特許第5, 925, 738号

【特許文献5】P C T W O 96 / 30041号

【特許文献6】E P 710 114号

【特許文献7】P C T W O 01 / 03726号（E P 1 194 161号）

20

【非特許文献1】Physiological and clinical aspects of Von Willebrand factor; Haematologica Vol 86, suppl. 4, November 2001

【非特許文献2】W. Wang et al./International Journal of Pharmaceutics 259/2003; 1-15

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明の目的は、治療上使用することが可能であるのに十分な期間（5℃で6ヶ月以上）、F V I I I、v W FまたはF V I I I / v W F複合体の活性の十分な安定化を可能にする液体配合物（F V I I Iおよびv W Fの最小回収率およそ50%）を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明者等により実施した研究は、v W Fの活性に対する強力な酸化防止剤（例えば、N A C（N-アセチルシステイン））の負の作用、および金属用キレート剤によるそれらの置き換えがv W Fの活性を保護し、またF V I I Iに対する防御的效果も維持するという事実を解明した。

【0019】

さらに、実施した研究により、プロテアーゼ阻害剤（例えば、アンチトロンビン）および特定リガンド（ヘパリン）の添加によりF V I I I / v W F複合体の安定性の改善が達成されたことが示された。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

したがって、特にアルブミン、アミノ酸、界面活性剤、酸化防止剤（例えば、ビタミンC）を含有し、および／または酸素の乏しい雰囲気中で保管されるベース配合物に関して、金属用キレート剤（例えば、E D T A（2~100mmol/l））、プロテアーゼ阻害剤（例えば、セリンプロテアーゼ阻害剤（セルピン）および特にアンチトロンビン（0.01~1 IU / IU F V I I I））、および特定リガンド（例えば、ヘパリン（0.

50

1～10 U/ml)の添加により、液体配合物中のFV III/vWF複合体の十分な安定性が達成され、治療用製品として使用することができる。

【0021】

[実施例]

FV III凝固剤(FV III:C)は国際単位で表され、その濃度は国際単位/ミリリットル(IU FV III/ml)で表される。vWF活性は、リストセチン補因子(RCo)、IU/mlとして表される。

【実施例1】

【0022】

2つの異なる濃度(25 IU/mlおよび100 IU/ml)でのアルブミン5%、アルギニン200 mmol/l、ヒスチジン25 mmol/l、CaCl₂ 5 mmol/lとともに配合したFV III/vWF複合体(25および100 IU FV III/ml)の5℃および25℃での安定性の結果(活性の回収率%)。

【0023】

【表1】

25 IU FVIII/ml						
5℃						
期間(ヶ月)	1	3	4	6	8	平均勾配
FVIII 活性の回収率	94%	83%	--	60%	--	1月当たり -6.64%
25℃						
期間(週)	1	3	4	6	8	平均勾配
FVIII 活性の回収率	97%	79%	74%	--	46%	1週当たり -6.94%

【0024】

【表2】

100 IU FVIII/ml						
5℃						
期間(ヶ月)	1	3	4	6	8	平均勾配
FVIII 活性の回収率	98%	80%	--	64%	--	1月当たり -6.33%
25℃						
期間(週)	1	3	4	6	8	平均勾配
FVIII 活性の回収率	92%	83%	71%	--	28%	1週当たり -8.93%

【0025】

結果は、5℃で得られるFV III回収率と25℃で得られるFV III回収率との間に良好な相関を示し、25℃での1週の保存期間(加速安定性研究の条件)が5℃(目標温度)で1ヶ月の保存期間に等価であるということが表で観察される。

【実施例2】

【0026】

下記とともに配合したFV III/vWF複合体(25 IU FV III/ml)は以下の安定性の結果を与える：

【0027】

【表 3】

A1	キシリトール 4%	NAC 3mmol/l	グリシン 250mmol/l		Cl ₂ Ca 25mmol/l	ヘパリン ナトリウム 0.5 U/ml	アルブミン 5%
B1	キシリトール 4%		グリシン 250mmol/l	EDTACaNa ₂ 25mmol/l	Cl ₂ Ca 25mmol/l	ヘパリン ナトリウム 0.5 U/ml	アルブミン 5%
C1	キシリトール 4%	NAC 3mmol/l	グリシン 250mmol/l	EDTACaNa ₂ 25mmol/l	Cl ₂ Ca 25mmol/l		アルブミン 5%

【0028】

10

【表 4】

25℃で8週	FVIII 活性の回収率(%)	vWF:RCO 活性の回収率(%)
A1	61.8	41.1
B1	62.5	66.2
C1	74.2	19.8

【0029】

これらの結果は、強力な還元剤（例えば、NAC）のFVIII：C活性に対する防御的効果を金属用キレート剤の添加で置換することができることを示す。NACの存在はvWF活性の大きな損失をもたらす。ヘパリンは、vWF活性の保護剤として作用することが観察される。

20

【0030】

FVIII濃度25IU/mlでのEDTAおよびヘパリンナトリウムを含む配合物B1（これは、25℃で8週間安定である）を用いた場合、実施例1の結果により5℃で少なくとも8ヶ月の貯蔵寿命を推定することが可能である。

【実施例3】

【0031】

下記とともに配合したFVIII/vWF複合体（25IU FVIII/ml）は以下の安定性の結果を与える：

30

【0032】

【表 5】

A2	NAC 5 mmol/l	グリシン 250mmol/l	アルギニン 150mmol/l	EDTACaNa ₂ 25mmol/l	Cl ₂ Ca 25 mmol/l	ヘパリン ナトリウム 0.5 U/ml	Albumin 5%
B2	Vitamin C	グリシン 250mmol/l	アルギニン 150mmol/l	EDTACaNa ₂ 25mmol/l	Cl ₂ Ca 25 mmol/l	ヘパリン ナトリウム 0.5 U/ml	アルブミン 5%
C2	Vitamin E	グリシン 250mmol/l	アルギニン 150mmol/l	EDTACaNa ₂ 25mmol/l	Cl ₂ Ca 25 mmol/l	ヘパリン ナトリウム 0.5 U/ml	アルブミン 5%
D2	Vitamin C+E	Glycine 250mmol/l	Arginine 150mmol/l	EDTACaNa ₂ 25mmol/l	Cl ₂ Ca 25 mmol/l	Sodium heparin 0.5 U/ml	アルブミン 5%

40

【0033】

【表 6】

25℃で8週	FVIII 活性の回収率(%)	vWF:RCO 活性の回収率(%)
A2	70.4	18.3
B2	69.6	62.7
C2	69.6	75.2
D2	73.2	65.9

【0034】

金属用キレート剤およびヘパリンを含有する溶液中で、強力な還元剤（NAC）の存在は、FVIII:Cに対して大きな有益性なく、vWF:RCO活性の損失をもたらすのに対し、EDTAおよびヘパリンナトリウムを含むFVIIIの25IU/mlの濃度での配合物B2、C2およびD2を用いると、5℃で少なくとも8ヶ月の貯蔵寿命を推定することが可能である。

【実施例 4】

【0035】

グリシン280mmol/l、アルギニン350mmol/l、ヒスチジン25mmol/l、CaCl₂50mmol/l、アルブミン5%、ビタミンC100mmol/l、Tween80 50ppm、pH5.10ならびに下記の可変濃度のEDTACaNa₂およびヘパリンナトリウムとともに配合したFVIII/vWF複合体（25IU FVIII/ml）は以下の安定性の結果を与える：

【0036】

【表 7】

	EDTA 濃 度	ヘパリン 濃 度
A3	High (50mmol/l)	High (1 U/ml)
B3	High (50mmol/l)	Low (0.2 U/ml)
C3	Low (10mmol/l)	High (1 U/ml)
D3	Low (10mmol/l)	Low (0.2 U/ml)

【0037】

【表 8】

25℃で8週	FVIII 活性の回収率(%)	vWF:RCO 活性の回収率(%)
A3	85	71.7
B3	63.5	65.9
C3	70.4	95
D3	63.5	89.5

【0038】

FVIII濃度25IU/mlでは、ヘパリンと金属キレート化剤（EDTA）の併用添加により、上述の配合物にvWFの活性に関して高度の安定性が提供される。5℃で少なくとも8ヶ月の貯蔵寿命を推定することが可能である。

【実施例 5】

【0039】

製品の6つの別個のバッチにおける200IU FVIII/mlでの提唱配合物（グリシン280mmol/l、アルギニン350mmol/l、ヒスチジン25mmol/l、CaCl₂50mmol/l、ヘパリン1U/ml、EDTACaNa₂50mmol/l、アルブミン5%、ビタミンC100mmol/l、Tween80 50ppm

10

20

30

40

50

、配合物のpH 6.3)の研究は以下の安定性の結果を与える(25℃で8週)：

【0040】

【表9】

25℃ での週数	0	2	4	6	8
FVIII:C (%) 平均値±SD (n=6)	100	91.0±6.3	65.5±8.0	48.2±8.1	35.4±9.1
vWF:RCO (%) 平均値±SD (n=6)	100	105.4±8.5	87.7±19.7	94.7±17.5	85.8±13.8

【0041】

製品の濃度が増大すると(25から200IU FVIII/mlへ)、より低い活性が観察される。研究全体にわたっての活性の発生の監視は、初期と最終時期に加えて、2週、4週および6週の安定性のサンプリングを含む。研究した6つのバッチから得られたデータすべてを使用して、FVIII:CおよびvWF:RCOの活性の全体的な挙動を推定することが可能であり、それを一次速度論に適合させる。この分析から、活性の50%程度の回収率(FVIIIおよびvWF)が25℃で6週間(これは5℃での6ヶ月と等価である)に得られることを推定することが可能である。

【実施例6】

【0042】

プロテアーゼ阻害剤の防御的効果の研究。製品の6つの別個のバッチで200IU FVIII/mlにて提唱配合物を試験した。

【0043】

グリシン280mmol/l、アルギニン350mmol/l、ヒスチジン25mmol/l、CaCl₂50mmol/l、アルブミン5%、ビタミンC100mmol/l、Tween8050ppm、配合物のpH6.3、ヘパリン1U/ml、EDTACaNa₂50mmol/lおよびアンチトロンビン(0.05IU/IU FVIII)は以下の安定性の結果を与える(25℃で8週)：

【0044】

【表10】

25℃ での週数	0	2	4	6	8
FVIII:C (%) 平均値±SD (n=6)	100	94.5±4.5	86.9±5.2	71.5±3.2	67.6±5.0
vWF:RCO (%) 平均値±SD (n=6)	100	101.5±16.7	117.4±28.5	108.1±22.3	91.1±24.0

【0045】

プロテアーゼ阻害剤(アンチトロンビン)の添加により、第VIII因子に関して、およびリストセチン補因子(vWF)の活性に関してともに製品の安定性が増大する。実施例5で実施した分析と並行させた分析により、25℃で12週間(これは5℃での12ヶ月と等価である)に活性(FVIIIおよびvWF:RCO)の50%回収率を推定することが可能である。

【0046】

上記実施例から、低濃度の製品(25IU FVIII/ml)にて、金属用キレート剤(EDTA)およびヘパリンの添加により、FVIII/vWF複合体に関してより大

きな安定性が提供されることが理解されよう。この安定化は、高濃度のF V I I Iおよびv W F活性でさえ、プロテアーゼ阻害剤（アンチトロンビン）の添加で改善される。

フロントページの続き

- (74)代理人 100101498
弁理士 越智 隆夫
- (74)代理人 100096688
弁理士 本宮 照久
- (74)代理人 100102808
弁理士 高梨 憲通
- (74)代理人 100128646
弁理士 小林 恒夫
- (74)代理人 100128668
弁理士 齋藤 正巳
- (72)発明者 サルヴァドール グランチャ ガモン
スペイン国, 08400 グラノラズ (バルセロナ), セ/マ デュー デ モントセラト ス
メロ 38
- (72)発明者 フアン イグナシオ フォルケラ ニエト
スペイン国, 08480 アメトラ デル ヴァレス (バルセロナ), セ/ フレデリク モンポ
ウ スメロ 11
- (72)発明者 ペール リストル デバート
スペイン国, サバデル (バルセロナ), アルゲルスアリ, 71
- (72)発明者 マルタ マッソト リエラ
スペイン国, 08012 バルセロナ, セ/ ゴヤ スメロ 1

審査官 小堀 麻子

- (56)参考文献 特開平04-243899 (JP, A)
特開昭63-198632 (JP, A)
特表平10-509144 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- | | |
|--------|-------------|
| A 61 K | 38/00-38/58 |
| A 61 K | 47/00-47/48 |
| A 61 K | 9/00- 9/72 |