

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-501227

(P2014-501227A)

(43) 公表日 平成26年1月20日(2014.1.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10	4 H 0 4 5
C 0 7 K 1/16 (2006.01)	C 0 7 K 1/16	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-543623 (P2013-543623)
 (86) (22) 出願日 平成23年11月30日 (2011.11.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年8月12日 (2013.8.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/071339
 (87) 国際公開番号 W02012/079979
 (87) 国際公開日 平成24年6月21日 (2012.6.21)
 (31) 優先権主張番号 10195288.5
 (32) 優先日 平成22年12月16日 (2010.12.16)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/424,389
 (32) 優先日 平成22年12月17日 (2010.12.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509091848
 ノヴォ ノルディスク アー/エス
 デンマーク、ハウスヴェア ディーケー
 2880, ノヴォ アレー
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 第V I I I 因子水溶液

(57) 【要約】

本発明は、比較的高濃度のFVIIIを含む水溶液においてFVIIIを安定化するための方法に関する。本発明はさらに、このような水溶液およびその使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも濃度300mMの塩および濃度5～30%のグリセロールを含む水溶液においてFVIIIを保存するステップを含む、FVIII濃度が少なくとも1 µg/mlでありpHが5.5～8.5である水溶液においてFVIIIを安定化する方法。

【請求項 2】

前記水溶液が濃度2～20mMの二価陽イオンを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記水溶液が濃度0.05～0.3g/kgの界面活性剤を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記塩がNaClである、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記水溶液中の前記塩濃度が300～1000mMである、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

FVIIIがBドメイン切断型変異体であり、前記FVIII濃度が少なくとも1 µg/mlであり、前記塩濃度が約500mMであり、前記グリセロール濃度が10～20%であり、前記二価陽イオン濃度が約10mMであり、前記界面活性剤濃度が0.1～0.2g/kgであり、かつ前記溶液のpHが6～8である、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

少なくとも1 µg/mlのFVIIIを含み、pHが5.5～8.5であり、少なくとも濃度300mMの塩および濃度5～30%のグリセロールを含む、FVIII水溶液。

【請求項 8】

濃度0.05～0.3g/kgの界面活性剤をさらに含む、請求項7に記載の溶液。

【請求項 9】

濃度2～20mMの二価陽イオンをさらに含む、請求項7または8に記載の溶液。

【請求項 10】

前記塩がNaClである、請求項7から9のいずれか一項に記載のFVIII溶液。

【請求項 11】

前記水溶液中の前記塩濃度が300～1000mMである、請求項7から10のいずれか一項に記載のFVIII溶液。

【請求項 12】

FVIIIがBドメイン切断型変異体であり、前記FVIII濃度が少なくとも1 µg/mlであり、前記塩濃度が約500mMであり、前記グリセロール濃度が10～20%であり、前記二価陽イオン濃度が約10mMであり、前記界面活性剤濃度が0.1～0.2g/kgであり、かつ前記溶液のpHが6～8である、請求項7から11のいずれか一項に記載のFVIII溶液。

【請求項 13】

請求項1から6のいずれか一項に記載の方法および請求項7から12のいずれか一項に記載の溶液を用いた分離または精製の間FVIIIが安定化される、サイズ排除クロマトグラフィーによるFVIIIの分離または精製のための方法。

【請求項 14】

請求項1から6のいずれか一項に記載の方法および請求項7から12のいずれか一項に記載の溶液を用いた修飾工程の間FVIIIが安定化される、FVIIIの翻訳後修飾のための方法。

【請求項 15】

FVIIIを安定化するための、請求項7から12のいずれか一項に記載の溶液または請求項1から6のいずれか一項に記載の方法の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、第VIII因子の収率を改善するための方法の分野に関する。特に、本発明は、

10

20

30

40

50

第VIII因子凝集物形成/沈殿を減少させるのに有用な方法および緩衝液組成/水溶液に関する。

【背景技術】

【0002】

FVIII/第VIII因子は、血漿由来の形態、または、場合によっては例えば化学的方法および/もしくは酵素的な方法によって翻訳後修飾されてもよい、組換えタンパク質の形態のいずれかで、血友病Aの治療法/予防法において使用される大型の複合糖タンパク質である。

【0003】

高濃度の大型タンパク質を溶解状態で維持することは、それらが凝集物を形成する傾向があるため、通常は困難を伴う。(Bドメインを有するまたは有していない)FVIIIは他の大半のタンパク質と比べて溶解性が低いことが周知である。可視沈殿は、15 µg/mlという低濃度で発生することがあり、不可視沈殿は、はるかに低い濃度で起こり、このことは、例えば、1 µg/mlをかなり上回るようにFVIII濃度を維持することが望ましいタンパク質の翻訳後修飾との関係から、特に不適切である。また、高濃度のFVIIIを保存することが、例えば、FVIIIの貯蔵および/または精製に関して望ましい場合もある。最後に、Bドメイン欠失型/切断型変異体として発現される場合でさえ、哺乳動物細胞株において発現されるrFVIIIの高収率を実現することは困難である。したがって、FVIII濃度が少なくとも0.5 µg/mlである溶液においてFVIII沈殿に伴う収率低下を最小限にするために、rFVIII凝集物形成の量を減少させるための対策をとることがきわめて望ましい。

10

【0004】

*in vitro*のFVIII凝集物形成を減少させる方法に関する提案は過去にない。国際公開第09108806号では、塩濃度250mMのNaClが、翻訳後修飾の後のFVIII精製に関連した溶離ステップにおいて使用されている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開第09108806号

【特許文献2】国際公開第03031464号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

30

【0006】

本発明は、少なくとも濃度300mMの塩および濃度5~30%のグリセロールを含む水溶液においてFVIIIを保存するステップを含む、FVIII濃度が少なくとも1 µg/mlでありpHが5.5~8.5である水溶液においてFVIIIを安定化する方法に関する。本発明はさらに、このような溶液およびその使用に関する。

【0007】

この成分の組合せによって、比較的高いFVIII濃度という条件下でFVIIIが沈殿する傾向を弱めうるのが、本明細書において本発明者らによって示される。本発明の方法および溶液は、例えば、濃度が少なくとも0.5 µg/mlまで上昇するFVIIIの濃縮および/または精製に関してなど、FVIII濃度が0.5 µg/mlより低い状況に関してても有用である。

40

【0008】

発明の説明

「FVIII/第VIII因子」は、肝細胞によって主に産生される大型の複合糖タンパク質である。ヒトFVIIIは、シグナルペプチドを含む2351個のアミノ酸からなり、相同性に基いて定義されるいくつかの独特なドメインを含む。3つのAドメイン、1つの独特なBドメイン、および2つのCドメインがある。ドメインの順序はNH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOHのように記載することができる。FVIIIは、B-A3境界線で隔てられた2本の鎖として血漿中を循環している。これらの鎖は、二価の金属イオン結合によって連結されている。A1-A2-B鎖は、重鎖(HC)と呼ばれ、一方A3-C1-C2は軽鎖(LC)と呼ばれる。本明細書において、「FVIII」は、血漿由来のFVIIIもしくは組換えFVIII、野生型(wt)FVIII、または例えば発色アッセ

50

イにおいてFVIII活性を有する任意のFVIII変異体であると理解される。このようなFVIII変異体の例としては、Bドメイン切断型/欠失型変異体、および/または1つもしくは複数の側基に結合したFVIII(例えば、PEG、他の水溶性のポリマー、脂肪酸誘導体、Fc:FVIII融合物)、ならびに/あるいは1つまたは複数のAドメインおよび/またはCドメイン中に1つまたは複数のアミノ酸修飾を有するFVIII変異体などが挙げられる。このようなFVIII修飾の内の1つまたは複数の結果として、野生型FVIIIと比べて循環半減期が長いFVIII変異体が生じうる。

【0009】

「Bドメイン」:野生型FVIII分子中のBドメインの長さは、約907アミノ酸である。Bドメイン切断型FVIII分子/変異体中のBドメインの長さは、約10から約800アミノ酸、例えば、約10アミノ酸から約700アミノ酸(例えば、約12~500アミノ酸、12~400アミノ酸、12~300アミノ酸、12~200アミノ酸、15~100アミノ酸、15~75アミノ酸、15~50アミノ酸、15~45アミノ酸、20~45アミノ酸、20~40アミノ酸、または20~30アミノ酸など)などまで様々でありうる。切断されたBドメインは、重鎖および/もしくは軽鎖の断片ならびに/または野生型FVIII分子には存在しない人工的に導入された配列を含みうる。「Bドメイン切断型」および「Bドメイン欠失型」という用語は、本明細書において同義的に使用されてよい。

10

【0010】

溶液の「イオン強度 I 」は、その溶液におけるイオン濃度の周知の指標である。溶液のイオン強度 I は、その溶液中に存在するすべてのイオンの濃度の関数である。Table 1(表1)では、本発明に関連して使用されうる様々な塩のモル濃度をイオン強度に変換している。

20

【0011】

【表1】

	NaCl, KCl, NH ₄ Ac, NaAc, KAc, NH ₄ Cl	CaCl ₂ , CaAc ₂ , MgCl ₂ , MgAc ₂ ,
10mM	10	30
30mM	30	90
50mM	50	150
100mM	100	300
300mM	300	900
500mM	500	1500
1000mM	1000	3000

30

表1:様々な組成物の関数としてのイオン強度(I)

40

【0012】

本明細書において、「水溶液/水性緩衝液」とは、水が主な溶媒であり、かつ有機溶媒を全く含まないか、または微々たる量および/もしくは極微量の有機溶媒、例えば1%未満の有機溶媒などを含む、溶液であると理解される。

【0013】

本明細書において、「塩」とは、任意の塩、例えば、table 1(表1)に記載の塩の内の1つまたは複数であると理解される。

【0014】

本発明の文脈における「グリセロール」とは、グリセロールならびにグリセロールの代わりとなりうる他の化合物、例えば、エチレングリコール、プロピレングリコール、エリ

50

スリトール、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、1,3-プロパンジオール、ジエタノールアミン、スクロース、デキストロース、トレハロース、グルコースなどの例えば多価アルコールなどを意味する。このタイプの化合物が水溶液におけるFVIIIの安定化に関してグリセロールの代わりとなりうることは、当業者に周知である。

【0015】

本明細書において、「界面活性剤/表面活性剤」とは、任意の界面活性剤/表面活性剤、例えば、次の界面活性剤:SDS、Triton X-100、X114、CHAPS、DOC、NP-40、Tween 80およびTween 20の内の1つまたは複数を含むと意図される。

【0016】

本発明によれば、二価陽イオン、例えば Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} が溶液に添加される。「 Ca^{2+} 」は、table 1(表1)に記載した塩の内の1つまたは複数ならびに $Ca(OH)_2$ の形態で添加されうる。

10

【0017】

「サイズ排除クロマトグラフィー/SEC/ゲル濾過クロマトグラフィー」とは、溶液中の分子がそれらのサイズ(より正確には、それらの流体力学的体積)に基づいて分離されるクロマトグラフィー方法である。有機溶媒が移動相として使用される場合に使用されるゲル浸透クロマトグラフィーという名称に対して、典型的には、カラムを通して試料を輸送するのに水溶液が使用される場合、この技術はゲル濾過クロマトグラフィーとして公知である。SECは、ポリマーに関して優れた分子量(Mw)の結果をもたらすことができるため、広く使用されているポリマーの特性決定方法である。ゲル濾過クロマトグラフィーの主な用途は、タンパク質および他の水溶性ポリマーの分画であるのに対し、ゲル浸透クロマトグラフィーは、有機可溶性ポリマーの分子量分布を解析するのに使用される。

20

【0018】

本明細書において、「FVIIIの翻訳後修飾」とは、例えば、その分子と親水性ポリマー(例えばポリエチレングリコール(PEG))、脂肪酸誘導体、アルブミン、Fcドメインなどとの結合のような、rFVIIIまたは血漿由来FVIIIの任意の修飾であることが意図される。FVIIIの修飾/変換は、例えば、化学的アプローチおよび/または酵素的アプローチを用いて起こすことができる。ペプチドの酵素的翻訳後修飾のための方法の一例は、国際公開第03031464号において開示されている。

【0019】

本明細書において、「FVIIIの安定化」は、活性FVIIIの損失の減少であると意図される。比較的高いFVIII濃度を伴う条件下でのFVIIIの貯蔵、精製および翻訳後修飾に関して、FVIII収率低下の主な原因は、FVIII分子の「凝集/沈殿」である。したがって、本明細書において、「安定化」とは、高濃度FVIII溶液におけるFVIII沈殿の減少と考えることができる。実施例において、本発明による溶液および/または方法がFVIII収率低下の軽減をどのようにもたらすが示される。

30

【発明を実施するための形態】

【0020】

実施形態の一覧:

実施形態1:したがって、第1の態様において、本発明は、少なくとも濃度300mMの塩、濃度5~35%のグリセロール、濃度2~20mMの二価陽イオン(好ましくは Ca^{2+})、および濃度0.05~0.3g/kgの界面活性剤を含む水溶液においてFVIIIを保存するステップを含む、FVIII濃度が少なくとも $1\mu\text{g/ml}$ でありpHが5.5~8.5である水溶液においてFVIIIを安定化する方法に関する。

40

【0021】

実施形態2:実施形態のいずれかに記載の方法のFVIII濃度は、少なくとも約0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、15,000、20,000、または $25,000\mu\text{g/ml}$ であって

50

よい。

【 0 0 2 2 】

実施形態3:本発明による任意の実施形態のFVIII濃度は、例えば、1~25,000 µg/ml、例えば、1~20,000 µg/ml、1~15,000 µg/ml、1~10,000 µg/ml、1~5000 µg/ml、1~4000 µg/ml、1~3000 µg/ml、1~2000 µg/ml、1~1000 µg/ml、1~900 µg/ml、1~800 µg/ml、1~700 µg/ml、1~600 µg/ml、1~500 µg/ml、1~400 µg/ml、1~300 µg/ml、1~200 µg/ml、1~100 µg/ml、5~5000 µg/ml、5~4000 µg/ml、5~3000 µg/ml、5~2000 µg/ml、5~1000 µg/ml、5~900 µg/ml、5~800 µg/ml、5~700 µg/ml、5~600 µg/ml、5~500 µg/ml、5~400 µg/ml、5~300 µg/ml、5~200 µg/ml、5~100 µg/ml、10~25,000 µg/ml、10~20,000 µg/ml、10~15,000 µg/ml、10~10,000 µg/ml、10~5000 µg/ml、10~4000 µg/ml、10~3000 µg/ml、10~2000 µg/ml、10~1000 µg/ml、10~900 µg/ml、10~800 µg/ml、10~700 µg/ml、10~600 µg/ml、10~500 µg/ml、10~400 µg/ml、10~300 µg/ml、10~200 µg/ml、10~100 µg/ml、15~25,000 µg/ml、15~20,000 µg/ml、15~10,000 µg/ml、15~5000 µg/ml、15~4000 µg/ml、15~3000 µg/ml、15~2000 µg/ml、15~1000 µg/ml、15~900 µg/ml、15~800 µg/ml、15~700 µg/ml、15~600 µg/ml、15~500 µg/ml、15~400 µg/ml、15~300 µg/ml、15~200 µg/ml、15~100 µg/ml、20~5000 µg/ml、20~4000 µg/ml、20~3000 µg/ml、20~2000 µg/ml、20~1000 µg/ml、20~900 µg/ml、20~800 µg/ml、20~700 µg/ml、20~600 µg/ml、20~500 µg/ml、20~400 µg/ml、20~300 µg/ml、20~200 µg/ml、または20~100 µg/mlなどの範囲であってよい。

10

【 0 0 2 3 】

実施形態4:塩が、1つもしくは複数のナトリウム塩および/または1つもしくは複数のアンモニウム塩からなる群から選択される一価の塩である、本発明の実施形態のいずれかに記載の方法。このような塩の例はtable 1(表1)に記載されている。

20

【 0 0 2 4 】

実施形態5:塩がNaClである、本発明による実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【 0 0 2 5 】

実施形態6:水溶液中の塩濃度が275~1500mM、例えば、275~1400mM、275~1300mM、275~1200mM、275~1100mM、275~1000mM、275~900mM、275~800mM、275~700mM、275~600mM、275~500mM、275~400mM、300~1500mM、300~1400mM、300~1300mM、300~1200mM、300~1100mM、300~1000mM、300~900mM、300~800mM、300~700mM、300~600mM、300~500mM、300~400mM、325~1500mM、325~1400mM、325~1300mM、325~1200mM、325~1100mM、325~1000mM、325~900mM、325~800mM、325~700mM、325~600mM、325~500mM、325~400mM、350~1500mM、350~1400mM、350~1300mM、350~1200mM、350~1100mM、350~1000mM、350~900mM、350~800mM、350~700mM、350~600mM、350~500mM、350~400mM、400~1500mM、400~1400mM、400~1300mM、400~1200mM、400~1100mM、400~1000mM、400~900mM、400~800mM、400~700mM、400~600mM、400~500mM、450~1500mM、450~1400mM、450~1300mM、450~1200mM、450~1100mM、450~1000mM、450~900mM、450~800mM、450~700mM、450~600mM、500~1500mM、500~1400mM、500~1300mM、500~1200mM、500~1100mM、500~1000mM、500~900mM、500~800mM、500~700mM、または500~600mMなどである、本発明による実施形態のいずれか1つに記載の方法。

30

40

【 0 0 2 6 】

実施形態7:FVIIIがBドメイン切断型変異体である、本発明による実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【 0 0 2 7 】

実施形態8:グリセロール濃度が5~35%、例えば、5~30%、5~25%、5~20%、5~15%、5~10%、12.5~35%、12.5~30%、12.5~25%、12.5~20%、12.5~15%、15~35%、15~30%または15~20%(W/W)などである、本発明による実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【 0 0 2 8 】

実施形態9:二価陽イオン濃度が2~20mM、例えば、2~15mM、2~10mM、2~5mM、5~20mM、5~15mM、5~10mM、10~20mMまたは10~15mMなどである、本発明による実施形態のい

50

れか1つに記載の方法。二価陽イオンは、例えば、table 1(表1)に記載したカルシウム塩の形態で添加されてよい。

【0029】

実施形態10:界面活性剤濃度が0.05~0.5g/kg、例えば、0.05~0.4g/kg、0.05~0.3g/kg、0.05~0.2g/kg、0.05~0.1g/kg、0.1~0.5g/kg、0.1~0.4g/kg、0.1~0.3g/kgまたは0.1~0.2g/kgなどである、本発明による実施形態のいずれか1つに記載の方法。本発明に関連して使用するのに適した界面活性剤の例としては、SDS、Triton X-100、X114、CHAPS、DOC、NP-40、Tween 80およびTween 20が挙げられる。

【0030】

実施形態11:溶液のpHが5.5~8.5、例えば、5.5~8.0、5.5~7.5、5.5~7.0、5.5~6.5、5.5~6.0、6.0~8.5、6.0~8.0、6.0~7.5、6.0~7.0、6.0~6.5、6.5~8.5、6.5~8.0、6.5~7.5、6.5~7.0、7.0~8.5、7.0~8.0、7.0~7.5、7.5~8.5、7.5~8.0、または8.0~8.5などである、本発明による実施形態のいずれか1つに記載の方法。 10

【0031】

実施形態12:FVIII分子がBドメイン切断型変異体であり、FVIII濃度が少なくとも1 μ g/mlであり、塩濃度が約500mMであり、グリセロール濃度が10~20%であり、二価陽イオン濃度が約10mMであり、Tween濃度が0.1~0.2g/kgであり、かつ溶液のpHが6~8である、本発明による実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0032】

実施形態13:少なくとも1 μ g/mlのFVIIIを含み、pHが5.5~8.5であり、少なくとも濃度300mMの塩、濃度5~30%のグリセロール、濃度2~20mMの二価陽イオン(好ましくはCa²⁺)および濃度0.05~0.3g/kgの界面活性剤を含む、FVIII水溶液。界面活性剤は、好ましくはTween 20である。 20

【0033】

実施形態14:塩が、ナトリウム塩またはアンモニウム塩からなる群から選択される一価の塩である、本発明による実施形態のいずれか1つに記載のFVIII溶液。

【0034】

実施形態15:塩がNaClである、本発明による実施形態のいずれか1つに記載のFVIII溶液。

【0035】

実施形態16:水溶液中の塩濃度が300~1000mMである、本発明による実施形態のいずれか1つに記載のFVIII溶液。好ましくは、塩はNaClである。 30

【0036】

実施形態17:FVIII分子がBドメイン切断型変異体であり、FVIII濃度が少なくとも1 μ g/mlであり、塩濃度が約500mMであり、グリセロール濃度が10~20%であり、Ca²⁺濃度が約10mMであり、Tween濃度が0.1~0.2g/kgであり、かつ溶液のpHが6~8である、本発明による実施形態のいずれか1つに記載のFVIII溶液。

【0037】

実施形態18:本発明による実施形態のいずれか1つに記載のFVIII溶液は、実施形態2に関して説明したFVIII濃度、実施形態6において説明した塩濃度、実施形態8において説明したグリセロール濃度、実施形態9において説明した二価陽イオン濃度、実施形態10において説明した界面活性剤濃度、および実施形態11において説明したpHをさらに備えていてもよい。具体的な塩は、本明細書において提案する選択肢のいずれかから選択することができる。二価陽イオンの具体的な供給源も、本明細書において提案する選択肢のいずれかから同様に選択することができる。界面活性剤の具体的な供給源も、本明細書において提案する選択肢のいずれかから同様に選択することができる。 40

【0038】

実施形態19:本発明の実施形態のいずれか1つに記載の方法および/または本発明の実施形態のいずれか1つに記載の溶液を用いた分離または精製の間FVIIIが安定化される、サイズ排除クロマトグラフィーによるFVIIIの分離または精製のための方法。 50

【 0 0 3 9 】

実施形態20:本発明による実施形態のいずれか1つに記載の方法および/または本発明の実施形態のいずれか1つに記載の溶液を用いた修飾工程の間にFVIIIが安定化される、FVIIIの翻訳後修飾のための方法。

【 0 0 4 0 】

実施形態21:FVIIIを安定化するための、本発明の実施形態のいずれか1つに記載の溶液および/または本発明の実施形態のいずれか1つに記載の方法の使用。

【 0 0 4 1 】

実施形態22:少なくとも濃度300mMの塩および濃度5~30%のグリセロールを含む水溶液においてFVIIIを保存するステップを含む、FVIII濃度が少なくとも1 μ g/mlでありpHが5.5~8.5である水溶液においてFVIIIを安定化する方法。

10

【 0 0 4 2 】

実施形態23:水溶液が濃度2~20mMの二価陽イオンを含む、本発明の実施形態のいずれかに記載の方法。

【 0 0 4 3 】

実施形態24:二価陽イオンがMgCl₂である、本発明の実施形態のいずれかに記載の方法。

【 0 0 4 4 】

実施形態25:二価陽イオンがCaCl₂である、本発明の実施形態のいずれかに記載の方法。

【 0 0 4 5 】

実施形態26:水溶液が濃度0.05~0.3g/kgの界面活性剤を含む、本発明の実施形態のいずれか1つに記載の方法。界面活性剤は、好ましくはTweenである。

20

【 0 0 4 6 】

実施形態27:少なくとも1 μ g/mlのFVIIIを含み、pHが5.5~8.5であり、少なくとも濃度300mMの塩、および濃度5~30%のグリセロールを含む、FVIII水溶液。

【 0 0 4 7 】

実施形態28:濃度0.05~0.3g/kgの界面活性剤をさらに含む、本発明の実施形態のいずれかに記載の溶液。界面活性剤は、好ましくはTweenである。

【 0 0 4 8 】

実施形態29:濃度2~20mMの二価陽イオンをさらに含む、本発明の実施形態のいずれか1つに記載の溶液。

30

【 0 0 4 9 】

実施形態30:二価陽イオンがMgCl₂である、本発明の実施形態のいずれかに記載の溶液。

【 0 0 5 0 】

実施形態31:二価陽イオンがCaCl₂である、本発明の実施形態のいずれかに記載の溶液。

【 0 0 5 1 】

(実施例)

(実施例1)

FVIII溶液を10mM HEPES、0.5M NaCl、20%(v/v)グリセロール、2mM CaCl₂、0.02% tween80、pH7.5にバッファー交換し、約30mg/mlまで濃縮した。以下のパターンの緩衝液を用いて、タンパク質結晶化のための96ウェルマイクロタイタープレートを準備した:

40

横列(第VIII因子と混合した後の最終濃度):

- A. 50mM酢酸Na、pH5.0、
- B. 50mM His、pH5.5、
- C. 50mM His、pH6.0、
- D. 50mMイミダゾール、pH6.5、
- E. 50mMイミダゾール、pH7.0
- F. 50mM HEPES、pH7.5
- G. 50mM HEPES、pH8.0
- H. 50mM Gly-gly、pH9.0

縦列:

50

- 1 および 7:0M NaCl
 2 および 8:0.08M NaCl
 3 および 9:0.2M NaCl
 4 および 10:0.33M NaCl
 5 および 11:0.53M NaCl
 6 および 12:0.8M NaCl

【 0 0 5 2 】

ウェルはすべて、20%グリセロール、0.02% tween80を含有した。縦列1~6は2mM CaCl₂を含有し、縦列7~12は16mM CaCl₂を含有した。FVIII溶液200nl+緩衝液400nlを液滴として混合し、透明なフィルムでプレートを密封し、24時間インキュベートし、顕微鏡下で検査した。次の尺度に基づいて、液滴の沈殿を採点した:なし:清澄、低度:わずかな沈殿物、高度:多量の沈殿物。これらの結果を下記の表に示す。

【 0 0 5 3 】

【表 2】

	2 mM CaCl ₂						16 mM CaCl ₂						
	0 M NaCl	0.08 M NaCl	0.2 M NaCl	0.33 M NaCl	0.53 M NaCl	0.8 M NaCl	0 M NaCl	0.08 M NaCl	0.2 M NaCl	0.33 M NaCl	0.53 M NaCl	0.8 M NaCl	
pH5.0	高度	高度	高度	高度	高度	高度	高度	高度	高度	高度	高度	高度	低度
pH5.5	高度	高度	高度	なし	なし	なし	高度	高度	低度	なし	なし	なし	なし
pH6.0	高度	高度	なし	なし	なし	なし	高度	高度	なし	なし	なし	なし	なし
pH6.5	高度	高度	低度	なし	なし	なし	高度	高度	なし	なし	なし	なし	なし
pH7.0	高度	低度	なし	なし	なし	なし	高度	なし	なし	なし	なし	なし	なし
pH7.5	低度	なし	なし	なし	なし	なし	高度	なし	なし	なし	なし	なし	なし
pH8.0	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	低度	なし
pH9.0	高度	高度	高度	低度	低度	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし

表 2:顕微鏡下で観察した、様々な条件下での 10mg/ml 第 VIII 因子の 600 ナノリットルの液滴における沈殿

【 0 0 5 4 】

0.33M以上のNaCl濃度(縦列4~6、10~12)が、特に最低pH値において沈殿を回避するのに最も好都合であることが認められる。

【 0 0 5 5 】

(実施例2)

第VIII因子溶液を10mM HEPES、0.5M NaCl、20%(v/v)グリセロール、10mM CaCl₂、0.02% tween80、pH7.5にバッファー交換し、アミコン(amicon)スピンフィルターを用いて19mg/mlまで濃縮した。以下のパターンを用いて、384ウェルのマイクロタイタープレートを準備した:

横列(第VIII因子と混合した後の最終濃度):

- A 50mM His、pH5.5、
 B 50mM His、pH6.0、
 C 50mM イミダゾール、pH6.5
 D 50mM イミダゾール、pH7.0
 E 50mM HEPES、pH7.5

F 50mM HEPES、pH8.0

縦列:

1:0M NaCl

2:0.17M NaCl

3:0.23M NaCl

4:0.3M NaCl

5:0.4M NaCl

6:0.5M NaCl

【 0 0 5 6 】

ウェルはすべて、20%グリセロール、0.02% tween80および10mM CaCl₂を含有した。第VI
II因子の最終濃度が5mg/mlになるように、緩衝液および第VIII因子を混合した。各ウェル
の光散乱の強度をWyatt DynaProプレートリーダーによって測定した。強度が高いほど、
自己会合が多いことが示される。これらの結果を下記の表に示す。

10

【 0 0 5 7 】

【表 3】

正規化された強度						
	pH5.5	pH6	pH6.5	pH7	pH7.5	pH8
0.17 M NaCl	4.98E+08	1.01E+09	5.07E+08	2.91E+09	1.27E+09	1.18E+09
0.23 M NaCl	1.53E+09	9.86E+08	1.67E+09	7.52E+08	6.15E+08	5.02E+08
0.3 M NaCl	1.22E+09	3.27E+09	8.34E+08	4.44E+08	3.67E+08	4.24E+08
0.4 M NaCl	8.27E+08	1.92E+09	3.18E+08	2.12E+08	2.63E+08	3.05E+08
0.5 M NaCl	1.52E+09	4.65E+08	2.16E+08	1.55E+08	1.63E+08	1.92E+08

20

表 3:様々な pH 値および NaCl 濃度における 5mg/ml FVIII の散乱光の強度(正規化され
た計数率)

【 0 0 5 8 】

自己会合の低度が低いことを示す最低の強度は、NaClが高濃度の場合に見出されることが認められる。

【 0 0 5 9 】

本発明のいくつかの特徴を本明細書において示し説明してきたが、当業者は多くの改良、
代用、変更および均等物に想到するであろう。したがって、添付の特許請求の範囲は、
本発明の真の精神の範囲内であるこのような改良および変更すべてを包含することを意図
することを理解すべきである。

30

【 0 0 6 0 】

(実施例3)

UF/DF

N8を含む溶液2150gのpHおよびCaCl₂をそれぞれ6.13および合計10mmol/kgに調整した。
続いて、N8を含む溶液を限外濾過によって約4mg/mlまで濃縮し、次いで、5倍体積量の緩
衝液(20mmol/kgヒスチジン、9mmol/kg HCl、0.5mol/kg NaCl、10mM/kg CaCl₂、20%グリセ
ロールを含有する、pH6.16)を用いたダイアフィルトレーションによってバッファー交換
した。次いで、N8を含む溶液を9.54mg/mlまでさらに濃縮した。収率は、分析方法によっ
て97~98%の範囲であった。濃縮完了後に測定した全HMWPのレベルを下記の表に示す。結
論として、これにより、高濃度NaClという条件下では、FVIII濃度は有意に上昇するもの
のHMWP形成はないことが実証される。

40

【 0 0 6 1 】

【表 4】

試料の説明	HMWP (%)	二量体(%)	全 HMWP (%)
N8 出発原料	< 0.3	< 0.3	< 0.3
N8 UF/DF	< 0.3	< 0.3	0.4

表 4:

【 0 0 6 2 】

(実施例4)

10

FVIIIのPEG化

出発原料は、結果としてpH6.1となる、0.5M塩化ナトリウム、10mM塩化カルシウム、20%グリセロール、20mMヒスチジンおよび9mM塩酸中に7.5mg/mlのFVIIIを含有する溶液であった。この溶液210mlにシアリダーゼ1.3mg、ST3Gal1 42mgおよび40K PEG 1.7gを添加し、周囲の室温で17.7時間、反応させた。反応の最後の時点で、濁りの徴候も沈殿の徴候もなかった。

【 0 0 6 3 】

(実施例5)

FVIII分子のフロースルーモードでの疎水性相互作用クロマトグラフィー

20

このステップの目的は、40Kポリエチレングリコール基によって共有結合的に修飾されたFVIII分子のシアル酸付加のために使用された酵素(ST3Gal3)およびHMWP(高分子量タンパク質)を、疎水性相互作用クロマトグラフィーを用いて除去することであった。直径0.5cmのカラムをTSKフェニル5PW樹脂でベッド高10.5cmまで充填して、ベッド容積2.1mlとした。450mM塩化ナトリウム、10mM塩化カルシウム、10%グリセロール、0.02%ポリソルベート80、20mMヒスチジンおよび9mM塩酸からなる5カラム容量の緩衝液でカラムを平衡化して、pH6.1および約35mS/cmの導電率を得た。濃度1.05mg/mlのFVIII分子および0.025mg/mlのST3Gal3を含むロード試料(load)に塩化ナトリウムを添加して、平衡緩衝液と同じ導電率(35mS/cm)に到達させ、かつヒスチジンおよび塩酸を加えてpH6.1に調整した。ロード試料(37.5ml)、続いて平衡緩衝液をカラムに通過させた。精製されたFVIII産物は、カラムに結合せず、通過画分中に回収され、濃度0.85mg/mlで41.1mlが得られた。収率は88.7%であった。高分子量タンパク質の含有量は1.5%から1.0%に減少した。ST3Gal3は約24000ppmから1328ppmに減少し、これは約18分の1への減少に相当した。

30

【 0 0 6 4 】

(実施例6)

SEC実施例

40K PEGに共有結合されているrFVIIIaならびにその反応物質(rFVIIIおよびPEG)の双方を含有する反応混合物に対して、GE Healthcareから入手したAKTAエクスペローラーおよびSuperdex 200 1.8L(10×23.5cm h)を充填したBPG10カラムを用いて、サイズ排除クロマトグラフィーを実施した。流速は0.8CV/時(4.24ml/分)であり、温度は22℃であり、ランニング緩衝液は以下からなった:

40

【 0 0 6 5 】

【表 5】

L-ヒスチジン	5.8g/kg	37.4mmol/kg
37% HCl	0.7g/kg	7.1mmol/kg
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.97g/kg	6.6mmol/kg
L-メチオニン	0.21g/kg	1.4mmol/kg
NaCl	34.9g/kg	597mmol/kg
スクロース	11.6g/kg	33.9mmol/kg
ポリソルベート 80	10g/kg	

10

【 0 0 6 6 】

添加する前に、1CVの水酸化ナトリウムを用いてカラムを清掃し、UVを自動ゼロ設定する前に1.2CVの緩衝液で平衡化した。

【 0 0 6 7 】

濃度1.05mg/mlの反応混合物92ml (CVの約5%) (合計97mg)をカラムに添加した。

【 0 0 6 8 】

UV吸光度のシグナルが0.15AU/cmを超えた場合、プール(pool)を採取した。濃度0.46mg/mlのプール体積202mlが得られ、収率は98%となった。

20

【 0 0 6 9 】

説明したサイズ排除クロマトグラフィーのステップは、加工酵素ならびに他の混在物を減少させるために使用される。加工酵素ST3Gal3は、SECステップによって330分の1に(約1328ppmから4ppmまで)減少した。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/071339

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/37 A61K47/48 C07K14/755 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/108806 A1 (NOVO NORDISK AS [DK]; DEFREES SHAWN [US]) 3 September 2009 (2009-09-03) cited in the application	7-12
Y	abstract paragraph [0068]; figure 1	1-6, 13-15
Y	EP 1 016 673 A1 (GENETICS INST [US] INST GENETICS LLC [US]) 5 July 2000 (2000-07-05) abstract paragraph [0017] - paragraph [0030] examples 1-9	1-15
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 January 2012		Date of mailing of the international search report 03/02/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mossier, Birgit

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/071339

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/48635 A1 (BESMAN MARC [US]; BJORNSON ERIK [US]; JAMEEL FERAZ [US]; KASHI RAMESH) 24 August 2000 (2000-08-24) abstract page 4, line 25 - page 6, line 10 claims 1-5,32-34 -----	1-15
Y	US 5 605 884 A (LEE TED C K [US] ET AL) 25 February 1997 (1997-02-25) abstract examples 8,9 -----	1-15
Y	WO 2006/103298 A2 (NOVO NORDISK AS [DK]; OESTERGAARD HENRIK [DK]; BOLT GERT [DK]; DOCK ST) 5 October 2006 (2006-10-05) abstract page 18, line 3 - page 22, line 18 -----	1-15
A	EP 0 314 095 A1 (RORER INT OVERSEAS [US]) 3 May 1989 (1989-05-03) abstract -----	1-15
A	WO 03/006505 A1 (GRADIPORE LTD [AU]) 23 January 2003 (2003-01-23) abstract page 5, line 20 - page 6, line 16 -----	1-15
Y	GOULIAN M ET AL: "Stabilization of factor 8 by glycerol.", NATURE 2 JUL 1966 LNKD- PUBMED:5967470, vol. 211, no. 5044, 2 July 1966 (1966-07-02), pages 74-75, XP002632006, ISSN: 0028-0836 abstract -----	1-15
A	FATOUROS ANGELICA ET AL: "Recombinant factor VIII SQ: The influence of formulation parameters on structure and surface adsorption", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS (AMSTERDAM), vol. 194, no. 1, 20 January 2000 (2000-01-20), pages 69-79, XP002632007, ISSN: 0378-5173 the whole document -----	1-15

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/071339

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FATOUROS ANGELICA ET AL: "Recombinant factor VIII SQ: Influence of oxygen, metal ions, pH and ionic strength on its stability in aqueous solution", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 155, no. 1, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 121-131, XP002475005, ISSN: 0378-5173, DOI: DOI:10.1016/S0378-5173(97)00155-5 the whole document	1-15
A	SAENKO E L ET AL: "Strategies towards a longer acting factor VIII", HAEMOPHILIA, BLACKWELL SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 12, no. SUPPL. 3, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 42-51, XP002434557, ISSN: 1351-8216, DOI: DOI:10.1111/J.1365-2516.2006.01260.X abstract; table 1	1-15
A	THIM L ET AL: "Purification and characterization of a new recombinant factor VIII (N8)", HAEMOPHILIA, BLACKWELL SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 16, no. 2, 1 March 2010 (2010-03-01), pages 349-359, XP002583862, ISSN: 1351-8216, DOI: DOI:10.1111/J.1365-2516.2009.02135.X [retrieved on 2009-11-11] abstract page 351, column 2, paragraph 5 - page 352, column 1, paragraph 1	1-15
A	WANG WEI ET AL: "Correlation of rFVIII inactivation with aggregation in solution.", PHARMACEUTICAL RESEARCH (DORDRECHT), vol. 20, no. 4, April 2003 (2003-04), pages 693-700, XP002632008, ISSN: 0724-8741 abstract	1-15

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/071339

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TIMASHEFF S N: "THE CONTROL OF PROTEIN STABILITY AND ASSOCIATION BY WEAK INTERACTIONS WITH WATER: HOW DO SOLVENTS AFFECT THESE PROCESSES?", ANNUAL REVIEW OF BIOPHYSICS AND BIOMOLECULAR STRUCTURE, ANNUAL REVIEWS INC., PALO ALTO, CA, US, vol. 22, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 67-97, XP009083800, ISSN: 1056-8700, DOI: DOI:10.1146/ANNUREV.BB.22.060193.000435 the whole document table 1	1-15
A	----- WO 2006/053299 A2 (BAYER HEALTHCARE LLC; PAN CLARK Q [US]; MURPHY JOHN E [US]; MEI BAISON) 18 May 2006 (2006-05-18) abstract	1-15
A	----- WO 2007/126808 A1 (BAXTER INT [US]; BAXTER HEALTHCARE SA [CH]; SIEKMANN JUERGEN [AT]; VAR) 8 November 2007 (2007-11-08) abstract	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/071339

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2009108806 A1	03-09-2009	EP 2257311 A1	08-12-2010		
		TW 200940096 A	01-10-2009		
		WO 2009108806 A1	03-09-2009		

EP 1016673 A1	05-07-2000	AT 198277 T	15-01-2001		
		AT 316981 T	15-02-2006		
		AU 677797 B2	08-05-1997		
		CA 2124690 A1	14-04-1994		
		CZ 9401328 A3	16-11-1994		
		DE 69329795 D1	01-02-2001		
		DE 69329795 T2	05-07-2001		
		DE 69333974 T2	03-08-2006		
		DK 0627924 T3	30-04-2001		
		EP 0627924 A1	14-12-1994		
		EP 1016673 A1	05-07-2000		
		EP 1652534 A2	03-05-2006		
		ES 2154650 T3	16-04-2001		
		FI 942573 A	01-06-1994		
		GR 3035472 T3	31-05-2001		
		HU 211670 A9	28-12-1995		
		HU 220194 B	28-11-2001		
		JP 3905921 B2	18-04-2007		
		JP H07501560 A	16-02-1995		
		NO 942033 A	01-06-1994		
		NZ 256921 A	28-05-1996		
		PT 627924 E	31-05-2001		
		SK 65994 A3	08-03-1995		
		US 5733873 A	31-03-1998		
		WO 9407510 A1	14-04-1994		

		WO 0048635 A1	24-08-2000	AT 365052 T	15-07-2007
				AU 777972 B2	04-11-2004
				AU 2884300 A	04-09-2000
BR 0008405 A	30-04-2002				
CA 2362927 A1	24-08-2000				
CA 2634663 A1	24-08-2000				
CA 2634664 A1	24-08-2000				
CA 2634674 A1	24-08-2000				
CN 1399560 A	26-02-2003				
CN 101683522 A	31-03-2010				
CN 101810854 A	25-08-2010				
CZ 20012996 A3	13-03-2002				
DE 60035260 T2	18-10-2007				
DK 1154796 T3	24-09-2007				
EP 1154796 A1	21-11-2001				
EP 2130554 A1	09-12-2009				
EP 2193809 A1	09-06-2010				
ES 2288843 T3	01-02-2008				
JP 2003520764 A	08-07-2003				
JP 2008201801 A	04-09-2008				
JP 2009046499 A	05-03-2009				
MX PA01008515 A	06-06-2003				
PL 203177 B1	30-09-2009				
PL 203893 B1	30-11-2009				
PL 204701 B1	26-02-2010				
PL 356453 A1	28-06-2004				
PT 1154796 E	28-09-2007				
US 6586573 B1	01-07-2003				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/071339

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2008176791 A1	24-07-2008
		WO 0048635 A1	24-08-2000
US 5605884	A	25-02-1997	NONE
WO 2006103298	A2	05-10-2006	EP 1871801 A2 02-01-2008
			JP 2008534559 A 28-08-2008
			US 2008227691 A1 18-09-2008
			WO 2006103298 A2 05-10-2006
EP 0314095	A1	03-05-1989	AU 2452088 A 04-05-1989
			CA 1329760 C 24-05-1994
			DE 3876600 D1 21-01-1993
			DE 3876600 T2 15-04-1993
			EP 0314095 A1 03-05-1989
			ES 2053676 T3 01-08-1994
			GR 3006506 T3 30-06-1993
			JP 1149733 A 12-06-1989
			JP 2544968 B2 16-10-1996
WO 03006505	A1	23-01-2003	CA 2453388 A1 23-01-2003
			CN 1538973 A 20-10-2004
			CN 1854150 A 01-11-2006
			EP 1414857 A1 06-05-2004
			JP 2005504740 A 17-02-2005
			US 2003106798 A1 12-06-2003
			US 2007215475 A1 20-09-2007
			WO 03006505 A1 23-01-2003
WO 2006053299	A2	18-05-2006	AU 2005304622 A1 18-05-2006
			BR P10517795 A 21-10-2008
			CA 2586379 A1 18-05-2006
			CN 101124331 A 13-02-2008
			EP 1824988 A2 29-08-2007
			EP 2363414 A2 07-09-2011
			EP 2371856 A2 05-10-2011
			HR 20070268 A2 30-09-2007
			JP 2008524117 A 10-07-2008
			KR 20070110260 A 16-11-2007
			MA 29663 B1 01-08-2008
			NZ 555032 A 26-02-2010
			WO 2006053299 A2 18-05-2006
			ZA 200703696 A 27-08-2008
WO 2007126808	A1	08-11-2007	AU 2007245190 A1 08-11-2007
			BR P10708832 A2 14-06-2011
			CA 2647314 A1 08-11-2007
			EP 2010222 A1 07-01-2009
			JP 2009532351 A 10-09-2009
			KR 20080108147 A 11-12-2008
			NZ 572050 A 30-09-2011
			WO 2007126808 A1 08-11-2007

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 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
C 0 7 K 14/755 (2006.01)	C 0 7 K 14/755	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T, J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R, O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H, U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72) 発明者 クリスティーナ・イエスパゴーオ
デンマーク・DK - 2 8 8 0・ハウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)・ノヴォ・ノルディ
スク・アーノエス・コーポレイト・パテント

(72) 発明者 アレ・ボクスネス
デンマーク・DK - 2 8 8 0・ハウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)・ノヴォ・ノルディ
スク・アーノエス・コーポレイト・パテント

(72) 発明者 イェーヌス・クラロープ
デンマーク・DK - 2 8 8 0・ハウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)・ノヴォ・ノルディ
スク・アーノエス・コーポレイト・パテント

(72) 発明者 クリスティアン・リシエル
デンマーク・DK - 2 8 8 0・ハウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)・ノヴォ・ノルディ
スク・アーノエス・コーポレイト・パテント

F ターム (参考) 4C076 AA12 CC14 DD01F DD01Q DD23Q DD38Q FF36 FF63
4C084 AA03 BA01 BA08 BA22 BA23 BA44 CA33 DB62 MA05 MA17
NA03 ZA532
4H045 AA20 AA50 BA10 CA40 DA66 EA20 GA22