

(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2016-518321

(P2016-518321A)

(43) 公表日 平成28年6月23日(2016.6.23)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
A61K 38/43 (2006.01)	A 61 K 37/465	Z N A	4 C 076
A61P 7/04 (2006.01)	A 61 P 7/04		4 C 084
A61K 9/08 (2006.01)	A 61 K 9/08		4 H 045
A61K 47/26 (2006.01)	A 61 K 47/26		
A61K 47/48 (2006.01)	A 61 K 47/48		
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 42 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号	特願2016-501214 (P2016-501214)	(71) 出願人	507021757 バイエル・ヘルスケア・エルエルシー Bayer HealthCare LLC アメリカ合衆国、ニュージャージー 07 981-0915、ホイッパー、バイエル ル・ブルバード100
(86) (22) 出願日	平成26年3月11日 (2014.3.11)	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月12日 (2015.11.12)	(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/023357	(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明
(87) 國際公開番号	W02014/150477	(74) 代理人	100129713 弁理士 重森 一輝
(87) 國際公開日	平成26年9月25日 (2014.9.25)		
(31) 優先権主張番号	61/799,495		
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	61/869,191		
(32) 優先日	平成25年8月23日 (2013.8.23)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

(54) 【発明の名称】組み換え因子VIII配合物

(57) 【要約】

ポリマーが接合したFVIII、例えば、PEG化因子VIIIのための配合物を含め、液体および凍結乾燥した組み換え因子VIII配合物が提供される。

【選択図】図18

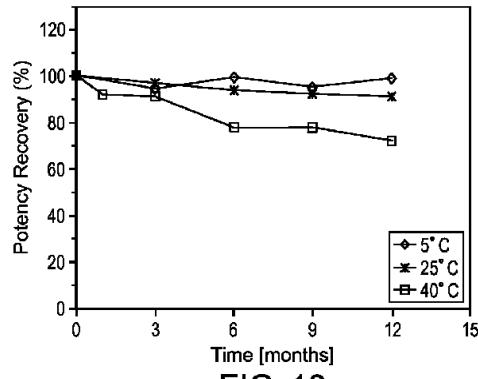


FIG. 18

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

r F V I I I 配合物であって、
 (a) 約 1 m M ~ 約 5 m M の範囲の二価のカチオン；
 (b) 約 1 5 0 m M ~ 約 2 5 0 m M の範囲の塩化ナトリウムまたは塩化カリウム；
 (c) 約 5 0 p p m ~ 約 2 0 0 p p m の範囲の非イオン性界面活性剤；および
 (d) 約 1 0 0 I U / m l ~ 約 5 0 0 0 I U / m l の範囲の r F V I I I を含み、
 r F V I I I が、配列番号 3 のアミノ酸配列中の 1 つ以上の非システイン残基がシステイン残基と置き換わったアミノ酸配列を含み、
 r F V I I I 配合物は、p H が約 p H 6 . 0 ~ 約 p H 7 . 5 の範囲である、r F V I I I 配合物。

【請求項 2】

(a) 約 1 0 m M ~ 約 5 0 m M の範囲のヒスチジン；
 (b) 約 1 0 m M ~ 約 1 0 0 m M の範囲の糖または糖アルコール；および
 (c) 約 1 5 0 m M ~ 約 4 0 0 m M の範囲のグリシンをさらに含む、請求項 1 に記載の r F V I I I 配合物。

【請求項 3】

r F V I I I 配合物であって、
 (a) 1 0 m M ~ 1 0 0 m M の範囲の M O P S ；
 (b) 0 . 5 重量 % ~ 1 0 重量 % の糖または糖アルコール；
 (c) 0 . 5 m M ~ 2 0 m M の範囲の二価のカチオン；
 (d) 1 0 m M ~ 1 0 0 m M の範囲の塩化ナトリウムまたは塩化カリウム；
 (e) 5 0 ~ 1 5 0 p p m の非イオン性界面活性剤；および
 (f) 約 1 0 0 0 I U / m l ~ 約 1 5 0 0 I U / m l の範囲の r F V I I I を含み、
 r F V I I I 配合物が、r F V I I I 以外の一級アミン基または二級アミン基を有する成分を 5 . 0 重量 % 未満含む、r F V I I I 配合物。

【請求項 4】

ヒスチジンおよびグリシンを本質的に含まない、請求項 3 に記載の r F V I I I 配合物。

【請求項 5】

生体適合性ポリマーに r F V I I I を共有結合させるための方法であって、
 (a) 請求項 3 または 4 に記載の r F V I I I 配合物を得ることと；
 (b) r F V I I I 上のアミン基と反応性の化学部分で官能基化されたポリマーを加え、反応混合物を作成することと；
 (c) r F V I I I に対するポリマーの共有結合が起こるような時間条件および温度条件で、反応混合物をインキュベートすることとを含む、方法。

【請求項 6】

r F V I I I 配合物であって、
 (a) 1 0 m M ~ 1 0 0 m M の範囲の M O P S ；
 (b) 1 5 0 m M ~ 3 0 0 m M の範囲の N a C l ；
 (c) 1 m M ~ 2 0 m M の範囲の二価のカチオン；および
 (d) 約 1 0 0 I U / m l ~ 約 5 0 0 0 I U / m l の範囲の接合していない r F V I I I を含む、r F V I I I 配合物。

【請求項 7】

(a) 0 . 5 % ~ 1 0 % の範囲の糖または糖アルコール；および
 (b) 2 0 p p m ~ 2 5 0 p p m の範囲の非イオン性界面活性剤をさらに含む、請求項 6 に記載の r F V I I I 配合物。

【請求項 8】

r F V I I I 配合物であって、

10

20

30

40

50

- (a) 10 mM ~ 100 mM の範囲の MOPS またはヒスチジン；
- (b) 25 mM ~ 200 mM の範囲の NaCl；
- (c) 1 mM ~ 20 mM の範囲の二価のカチオン；および
- (d) 約 100 IU / mL ~ 約 5000 IU / mL の範囲の接合した rFVIII を含む、rFVIII 配合物。

【請求項 9】

- (a) 0.5 % ~ 10 % の範囲の糖または糖アルコール；および
- (b) 20 ppm ~ 250 ppm の範囲の非イオン性界面活性剤をさらに含む、請求項 8 に記載の rFVIII 配合物。

【請求項 10】

- rFVIII 配合物であって、
- (a) 約 0 mM、または約 1 mM ~ 約 20 mM の範囲のヒスチジン；
 - (b) 0.5 % ~ 20 % の範囲のスクロースまたはトレハロース；
 - (c) 約 1 mM ~ 約 5 mM の範囲の二価のカチオン；
 - (d) 約 0 mM、または約 10 mM ~ 約 50 mM の範囲の塩化ナトリウム；
 - (e) 約 0 mM、または約 20 ppm ~ 約 80 ppm の範囲の非イオン性界面活性剤；
 - (f) 約 0 %、または約 1.0 % ~ 約 5.0 % の範囲のグリシン、および
 - (g) 約 100 IU / mL ~ 約 5000 IU / mL の範囲の接合した rFVIII を含み； rFVIII 配合物は、pH が約 pH 6.0 ~ 約 pH 7.5 の範囲である、rFVIII 配合物。

10

20

【請求項 11】

- (a) 塩化ナトリウムが、約 10 mM ~ 約 50 mM の範囲で存在し；
- (b) スクロースが、0.5 % ~ 2.0 % の範囲で存在し、
- (c) グリシンが、約 1.0 % ~ 約 5.0 % の範囲で存在し、
- (d) ヒスチジンが、約 1 mM ~ 約 20 mM の範囲で存在し、
- (e) 非イオン性界面活性剤が、約 20 ppm ~ 約 80 ppm の範囲で存在する、請求項 10 に記載の rFVIII 配合物。

【請求項 12】

- (a) 塩化ナトリウムが、1.0 重量 % 未満の量で存在するか、または存在せず；
- (b) スクロースまたはトレハロースが、0.5 % ~ 20 % の範囲で存在し、
- (c) グリシンが、1.0 重量 % 未満の量で存在するか、または存在しない、請求項 10 に記載の rFVIII 配合物。

30

【請求項 13】

スクロースまたはトレハロースが、1.0 % ~ 10.0 % の範囲で存在する、請求項 12 に記載の rFVIII 配合物。

【請求項 14】

血友病 A を処置することが必要な患者に、請求項 1、3、6、8 または 10 のいずれか一項に記載の治療に有効な量の rFVIII 配合物を投与することを含む、血友病 A を処置する方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本出願は、2013年3月15日に出願された米国仮出願第 61/779,495 号および 2013 年 8 月 23 日に出願された米国仮出願第 61/869、191 号の利益を請求し、この両者は、その全体が本明細書に参考として組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

血友病 A は、凝固因子 VIII (「FVIII」) の欠損によって引き起こされ、最も一般的な遺伝性の凝固障害であり、男性 5000 人あたり 1 人に発生すると概算されている。血友病 A の現在の処置は、組み換えヒト FVIII または血漿から誘導されるヒト F

50

VIIIの静脈内注射を伴う。FVIIIの注射は、出血事象に応答して要求に応じて行われるか、または週に2~4回投与される予防治療として行われる。予防治療によって血友病Aの合併症が減るという多くの研究が示されているが、頻繁な静脈内注射の必要性が、患者のコンプライアンスに対する障壁を作り出し、患者の生活の質に影響を与える。頻繁な注射が必要なのは、主に、患者でのFVIIIの循環血中半減期が12~14時間と短いことに起因する。

【0003】

長鎖ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール(「PEG」)を共有結合により付加すると、タンパク質治療薬の半減期が延びることが示されている。PEG化は、タンパク質に対するPEG分子の共有結合である。

10

【0004】

米国特許第5,763,401号(Nayyar)は、全長組み換えFVIII(「FL-rFVIIH」)の安定でアルブミンを含まない凍結乾燥した配合物を開示する。米国特許第7,632,921号(Panら)およびMeiら、Rational design of a fully active, long-acting PEG化されたfactor VII for hemophilia A treatment、116 BLOOD 270-279(2010)は、1つ以上の生体適合性ポリマー(例えば、PEG)に共有結合した、システインを増やしたFVIII変異体を開示する。米国特許第7,087,723号(Besmanら)は、アルブミンを含まないFVIII配合物に関する。Osterbergら、Development of a freeze-dried albumin-free formulation of recombinant因子VIII SQ、Pharmaceutical Research、vol. 14、No. 7(1997)、pp. 892-898およびOsterbergら、B-domain deleted recombinant因子VIII formulation and stability、Seminars in Hematology、vol. 38、No. 2、suppl. 4(2001年4月)、pp. 40-43は、塩化ナトリウム、スクロース、ヒスチジン、塩化カルシウム無水物およびポリソルベート80を含有する配合物を含め、凍結乾燥のためのB-ドメイン欠損FVIIIの配合物を記載する。Fatourossら、Recombinant因子VIII SQ-influence of oxygen, metal ions, pH and ionic strength on its stability in aqueous solution、Int. J. of Pharmaceutics 155(1997)121-131は、アルブミンを含まない溶液中で保存する際のrFVIIISQの特性を開示する。国際公開第2011/027152号(Jezekら)は、FVIIIの配合物を開示する。

20

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国特許第5,763,401号明細書

40

【特許文献2】米国特許第7,632,921号明細書

【特許文献3】米国特許第7,087,723号明細書

【特許文献4】国際公開第2011/027152号パンフレット

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Meiら、Rational design of a fully active, long-acting PEG化されたfactor VII for hemophilia A treatment、116 BLOOD 270-279(2010)。

【非特許文献2】Osterbergら、Development of a freeze-dried albumin-free formulation of re

50

combinant 因子VIII SQ、Pharmaceutical Research、vol. 14、No. 7 (1997)、pp. 892 - 898。

【非特許文献3】Osterbergら、B-domain deleted recombinant 因子VIII formulation and stability、Seminars in Hematology、vol. 38、No. 2、suppl. 4 (2001年4月)、pp. 40 - 43。

【非特許文献4】Fatourosら、recombinant 因子VIII SQ-influence of oxygen、metal ions、pH and ionic strength on its stability in aqueous solution、Int. J. of Pharmaceutics 155 (1997) 121 - 131。 10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

一実施形態では、本発明は、rFVIII配合物であって、(a)約1mM～約5mMの範囲の二価のカチオン；(b)約150mM～約250mMの範囲の塩化ナトリウムまたは塩化カリウム；(c)約50ppm～約200ppmの範囲の非イオン性界面活性剤；および(d)約100IU/ml～約5000IU/mlの範囲のrFVIIIを含み、rFVIIIが、配列番号3のアミノ酸配列中の1つ以上の非システィン残基がシスティン残基と置き換わったアミノ酸配列を含み、rFVIII配合物は、pHが約pH6.0～約pH7.5の範囲である、rFVIII配合物に関する。別の実施形態では、本発明は、rFVIII配合物であって、(a)10mM～100mMの範囲のMOPS；(b)0.5重量%～10重量%の糖または糖アルコール；(c)0.5mM～20mMの範囲の二価のカチオン；(d)10mM～100mMの範囲の塩化ナトリウムまたは塩化カリウム；(e)50～150ppmの非イオン性界面活性剤；および(f)約1000IU/ml～約1500IU/mlの範囲のrFVIIIを含み、rFVIII配合物が、rFVIII以外の一級アミン基または二級アミン基を有する成分を5.0重量%未満含む、rFVIII配合物に関する。 20

【0008】

さらに別の実施形態では、本発明は、rFVIII配合物であって、(a)10mM～100mMの範囲のMOPS；(b)150mM～300mMの範囲のNaCl；(c)1mM～20mMの範囲の二価のカチオン；および(d)約100IU/ml～約500IU/mlの範囲の接合していないrFVIIIを含む、rFVIII配合物に関する。さらなる実施形態では、本発明は、rFVIII配合物であって、(a)10mM～100mMの範囲のMOPSまたはヒスチジン；(b)25mM～200mMの範囲のNaCl；(c)1mM～20mMの範囲の二価のカチオン；および(d)約100IU/ml～約5000IU/mlの範囲の接合したrFVIIIを含む、rFVIII配合物に関する。なおさらなる実施形態では、本発明は、rFVIII配合物であって、(a)約0mM、または約1mM～約20mMの範囲のヒスチジン；(b)0.5%～20%の範囲のスクロースまたはトレハロース；(c)約1mM～約5mMの範囲の二価のカチオン；(d)約0mM、または約10mM～約50mMの範囲の塩化ナトリウム；(e)約0mM、または約20ppm～約80ppmの範囲の非イオン性界面活性剤；(f)約0%、または約1.0%～約5.0%の範囲のグリシン、および(g)約100IU/ml～約5000IU/mlの範囲の接合したrFVIIIを含み；rFVIII配合物は、pHが約pH6.0～約pH7.5の範囲である、rFVIII配合物に関する。 30 40

【0009】

当業者は、以下に記載する図面が、単なる説明のためのものであることを理解するだろう。図面は、本明細書で与えられる本開示の範囲または特許請求の範囲をいかなる様式にも限定することを意図していない。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【0010】

【図1】図1は、全長ヒト因子VIIIAおよびBDD-rFVIIIAのドメインを模式的に示す。

【図2】図2は、ジスルフィド結合によって接続したドメインを有するBDD-rFVIIIA変異体の相対濁度を示すグラフである。濁度は、塩化ナトリウムの濃度を徐々に増やしたバッファー中に測定された。濁度は、 340 nm で測定された。バッファーは、塩化ナトリウムに加え、20mMのヒスチジン、2.5mMの塩化カルシウム、29mMのスクロース、293mMのグリシンおよび80ppmのポリソルベート80を含んでいた。
10

【図3】図3は、ジスルフィド結合によって接続したドメインを有するBDD-rFVIIIA変異体の相対濁度を示すグラフである。濁度は、ポリソルベート80の濃度を徐々に増やしたバッファー中に測定された。濁度は、 340 nm で測定された。バッファーは、ポリソルベート80に加え、20mMのヒスチジン、30mMの塩化ナトリウム、2.5mMの塩化カルシウム、29mMのスクロースおよび293mMのグリシンを含んでいた。

【図4】図4は、ジスルフィド結合によって接続したドメインを有するBDD-rFVIIIA変異体の相対濁度を示すグラフである。濁度は、ヒト血清アルブミン(「HSA」)の濃度を徐々に増やしたバッファー中に測定された。濁度は、 340 nm で測定された。バッファーは、20mMのヒスチジン、30mMの塩化ナトリウム、2.5mMの塩化カルシウム、29mMのスクロース、293mMのグリシンおよび80ppmのポリソルベート80を含んでいた。
20

【図5】図5は、ジスルフィド結合によって接続したドメインを有するBDD-rFVIIIA変異体の相対濁度を示すグラフである。濁度は、ポリソルベート80およびHSAと組み合わせて、塩化ナトリウムの濃度を徐々に増やしたバッファー中に測定された。濁度は、 340 nm で測定された。バッファーは、塩化ナトリウム、HSAおよびポリソルベート80に加え、20mMのヒスチジン、2.5mMの塩化カルシウム、29mMのスクロースおよび293mMのグリシンを含んでいた。

【図6】図6は、賦形剤を添加する前または後の、ドメインを接続するジスルフィド結合を有するBDD-rFVIIIA変異体の溶液中の透明性の変化を示す。左から右に、(1)賦形剤(HSA、塩化ナトリウムおよびポリソルベート80)の組み合わせ、(2)HSA、(3)塩化ナトリウム、(4)ポリソルベート80および(5)HSA、ポリソルベート80および塩化ナトリウムを添加する前である。
30

【図7】図7は、40で7日間保存中の、ヒスチジン、MOPSおよびTEAバッファー中の全長FVIIIAの液体安定性を示すグラフである。

【図8】図8は、25でのMOPSおよびヒスチジンバッファー中のrFVIIIA安定性を示すグラフである。

【図9】図9は、PEG化されたBDD-rFVIIIAの構造を示す図である。A3領域から突出する鎖は、PEG分子を表す。

【図10】図10は、23で6日間保存中に、塩化ナトリウムが、PEG化されたBDD-rFVIIIAの有効性の回収率に与える影響を示すグラフである。
40

【図11】図11は、23で6日間保存中に、塩化ナトリウムが、PEG化されていないBDD-rFVIIIAの有効性の回収率に与える影響を示すグラフである。

【図12】図12は、26週間後の凍結乾燥された配合物A中のPEG化されたBDD-rFVIIIAの正規化された有効性の傾向を示すグラフである。配合物Aは、2.5mMの塩化カルシウム、30mMの塩化ナトリウム、20mMのヒスチジン、293mMのグリシン、29mMのスクロースおよび80ppmのポリソルベート80を含有する。

【図13】図13は、26週間後の凍結乾燥された配合物B中のPEG化されたBDD-rFVIIIAの正規化された有効性の傾向を示すグラフである。配合物Bは、2.5mMの塩化カルシウム、30mMの塩化ナトリウム、20mMのヒスチジン、346mMのグリシン、38mMのスクロースおよび80ppmのポリソルベート80を含有する。
50

【図14】図14は、26週間後の凍結乾燥された配合物C中のPEG化されたBDD-rFVIIの正規化された有効性の傾向を示すグラフである。配合物Cは、2.5mMの塩化カルシウム、20mMのヒスチジン、234mMのスクロースおよび80ppmのポリソルベート80を含有する。

【図15】図15は、26週間後の凍結乾燥された配合物D中のPEG化されたBDD-rFVIIの正規化された有効性の傾向を示すグラフである。配合物Dは、2.5mMの塩化カルシウム、20mMのヒスチジン、211mMのトレハロースおよび80ppmのポリソルベート80を含有する。

【図16】図16は、30ヶ月までの凍結乾燥された配合物A中のPEG化されたBDD-rFVIIの正規化された有効性の傾向を示すグラフである。配合物Aは、2.5mMの塩化カルシウム、30mMの塩化ナトリウム、20mMのヒスチジン、293mMのグリシン、29mMのスクロースおよび80ppmのポリソルベート80を含有する。
10

【図17】図17は、13週間までの凍結乾燥された配合物B中のPEG化されたBDD-rFVIIの正規化された有効性の傾向を示すグラフである。配合物Bは、2.5mMの塩化カルシウム、30mMの塩化ナトリウム、20mMのヒスチジン、346mMのグリシン、38mMのスクロースおよび80ppmのポリソルベート80を含有する。

【図18】図18は、12ヶ月までの凍結乾燥された配合物A中のPEG化されたBDD-rFVII(200IU/mL)の正規化された有効性の傾向を示すグラフである。配合物Aは、2.5mMの塩化カルシウム、30mMの塩化ナトリウム、20mMのヒスチジン、293mMのグリシン、29mMのスクロースおよび80ppmのポリソルベート80を含有する。
20

【図19】図19は、9ヶ月までの凍結乾燥された配合物A中のPEG化されたBDD-rFVII(1200IU/mL)の正規化された有効性の傾向を示すグラフである。配合物Aは、2.5mMの塩化カルシウム、30mMの塩化ナトリウム、20mMのヒスチジン、293mMのグリシン、29mMのスクロースおよび80ppmのポリソルベート80を含有する。

【図20】図20は、BDD-rFVII SQのアミノ酸配列(配列番号NO:3)である。

【図21】図21は、FL-rFVIIのアミノ酸配列(配列番号1)である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本明細書を解釈する目的のために、特に指示のない限り、以下の定義を適用する。本明細書に引用されるすべての参考文献は、その全体が本明細書に参考として組み込まれる。

【0012】

因子VII : 因子VII(「FVII」)は、約200kDaの重鎖と、80kDaの軽鎖とで構成されるヘテロダイマーとして循環する凝固因子である。重鎖は、構造的に関連するA1ドメインとA2ドメインと、固有のBドメインを含み、軽鎖は、A3ドメイン、C1ドメインおよびC2ドメインを含む。例えば、Meiら、116-BLOO D 270-279(2010)を参照。例えば、FVIIのドメインを示す図1も参照。「因子VII」または「FVII」という用語は、本明細書で使用される場合、血漿から誘導されるか、または組み換えDNA技術の使用によって作られるかによらず、野生型ヒトFVIIに特徴的なある程度の凝固促進活性を有するすべての因子VII分子を指す。本明細書で使用される場合、FVIIは、野生型因子FVIIまたは活性化された野生型因子FVIIの凝固促進活性の一部またはすべてを保持する、野生型因子VIIまたは組み換え因子VIIの改変された形態またはトランケーションされた形態を含み、野生型因子VIIまたは活性化された野生型因子VIIの活性を超える凝固促進活性を有する改変体またはトランケーションされた形態を含む。FVIIは、活性な因子VIIを含む融合産物、例えば、免疫グロブリンフラグメントまたはドメインとの融合物も含む。FVIIを含有する治療調製物の市販例としては、商標名KOGENATE FSの名称で販売されるものが挙げられる(Bayer Healthc
40

10

20

30

40

50

are LLC、バークレー、CA、米国から入手可能)。

【0013】

組み換え因子VIII : 組み換え因子VIII(「rFVIII」)は、本明細書で使用される場合、組み換え技術によって作られるFVIII、またはその生物学的に活性な誘導体を指し、哺乳動物の血漿から得られるFVIIIを含まない。

【0014】

全長ネイティブヒト因子VIII(「FL-FVIII」)は、2,351アミノ酸の一本鎖糖タンパク質である。発現した2,351アミノ酸配列は、配列番号1として与えられる。しかし、発現したポリペプチドが小胞体の内腔に移動する場合は、19アミノ酸シグナル配列が開裂し、第2の配列が得られる。この第2の配列は、本明細書では配列番号2として与えられ、最初の19アミノ酸が欠損しており、VIIIの所与のアミノ酸配列に対し、研究者が、数による位置(例えば、Arg³⁷²)を割り当てるために従来から使用されている配列である。従って、特に明記されていない限り、本明細書に与えられるようなアミノ酸残基の数による位置のすべての割り当ては、配列番号2に基づく。例えば、従来のように、また、本明細書で使用される場合、BDD-rFVIIIにおいて変異したアミノ酸に言及するとき、変異したアミノ酸は、全長FVIIIの配列の位置によって名付けられる。例えば、BDD-rFVIII変異体は、K1808Cアミノ酸置換を含んでいてもよく、この場合、全長配列(ここでは配列番号2)の1808に類似する位置にあるリジン(K)が、システイン(C)に置換されている。

10

20

30

40

50

【0015】

B-ドメインが欠損した(「BDD」)因子VIII : 本明細書で使用される場合、BDDまたはBDD-rFVIIIは、Bドメインのすべてまたは一部の欠失を伴うアミノ酸配列を有することを特徴とする。一実施形態では、BDDは、BDD-SQとして知られる分子であり、因子VIIIのBドメインのすべてではないが、14アミノ酸の欠失を含む。BDD-SQでは、Bドメインの最初の4アミノ酸(配列番号4)は、Bドメインの最後の10残基に接続している(配列番号5)。例えば、Lindら、Novel forms of B-domain-deleted recombinant factor VIII molecules, 232 EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY 19-27 (1995)を参照。ドメイン構成によるBDDを示す図1も参照。BDD-SQは、本明細書で使用される場合、配列番号3のアミノ酸配列を含む。因子VIIIのBドメインは、血友病Aの代替治療として有効であることが示されている90kDのA1-A2重鎖と80kDの軽鎖とを有するBDD分子としては不必要であると思われる。Bドメインの別の部分が欠失しているか、またはBドメインのすべてが欠失しているFVIII分子も、本発明の配合物および方法に含まれる。

【0016】

BDD変異体またはBDD-rFVIII変異体 : BDD変異体またはBDD-rFVIII変異体は、FVIIIの凝固促進活性の少なくとも一部を維持し、BDD-SQとは少なくとも1個のアミノ酸残基が異なるBDD-SQの改変体である。BDD変異体またはBDD-rFVIII変異体は、BDD-SQとはアミノ酸配列が異なる改変体を含み、例えば、限定されないが、1個以上のアミノ酸残基の部位特異的突然変異によるものを含む。限定されないが、BDD変異体またはBDD-rFVIII変異体は、米国特許第7,928,199号(G riffinら)に開示される、システイン残基が導入されたFVIIIポリペプチドを含む。

【0017】

PEG化 : PEG化は、例えば、FVIII上に存在する部位に結合する活性な官能基を有するPEGが接続することによる、タンパク質に対する長鎖ポリエチレンゴリコール(PEG)分子の共有結合である。PEG化に使用される1つの方法は、ネイティブタンパク質中に存在するリジン残基またはN末端アミンに対する、官能基化されたPEG部分の結合である。FVIIIが多くのアミン残基を含有するため、アミン官能基化されたポリマーは、FVIII上の異なる部位にランダムに接合している。

【0018】

部位特異的なPEG化によって、特定の部位に対するPEG分子の標的化を可能にする。これらの特異的な部位は、導入された表面に露出するシステインを含んでいてもよく、この部位にPEGポリマーが接合することができる。米国特許第7,632,921(Panら)を参照。PEGは、FVIIIA上の糖に対する共有結合によってFVIIIAに接続してもよい。例えば、米国特許出願公開第20110112028号(Turecekら)を参照。PEGは、FVIIIA上のグリカン(例えば、O-グリカン)に対するPEGの酵素カップリングによってFVIIIAに接続してもよい。Stennickeらは、シリダーゼおよび過剰なCMP-SA-グリセロール-PEG試薬と共にバッファー内で全長FVIIIAをインキュベートすることによる、FVIIIBドメイン中の固有のO-グリカンに対するPEGの選択的なカップリングを開示する。Stennickeら、「A novel B-domain O-glycosylated FVIIIA(N8-GP) demonstrates full efficacy and prolonged effect in hemophilic mice models」、121(11) BLOOD 2108-16(2013)。米国特許出願公開第20130137638号(Bolt)は、トランケーションされたBドメインを有するFVIIIA改変体に対するPEGの接続を開示する。FVIIIA分子は、トランケーションされたBドメイン中のO-接続したオリゴ糖を介し、親水性ポリマーと共有結合している。米国特許出願公開第20120322738号(Behrens)は、Bドメイン中のO-接続した糖を介し、FVIIIAにPEGを共有結合することを含む、FVIIIAにポリマーを接合する方法を開示する。本明細書で使用される場合、PEG化されたFVIIIAは、上述の当該技術分野で公知の種々の方法を含め、任意の方法によるPEG化を含む。

10

20

30

40

【0019】

国際単位IU：国際単位(すなわちIU)は、標準的なアッセイによって測定されるようなFVIIIAの血液凝固活性(有効性)の測定単位である。標準的なアッセイは、当該技術分野で記載されるような1ステージアッセイを含む。例えば、Leeら、An effect of predilution on potency assays of Factor VIIA concentrates, 30 THROMBOSIS RESEARCH 511-519(1983)を参照。この1ステージアッセイは、活性化された部分的なトロンボプラスチン時間(aPTT)に基づく。FVIIIAは、因子XからXaへの酵素変換において、因子IXa、カルシウムおよびリン脂質存在下、補因子として作用する。このアッセイでは、希釈した試験サンプルを、FVIIIAが欠損した血漿基質とaPTT試薬の混合物と共に37℃でインキュベートする。このインキュベートした混合物に塩化カルシウムを加え、血餅生成が開始する。血餅が生成するのにかかる時間(秒)と、FVIIIA:C濃度のlog対数とに逆相関が存在する。未知のサンプルの活性レベルは、試験材料の種々の希釈物の血餅生成時間と、既知の活性を有する標準材料の一連の希釈物から構築された曲線とを比較することによって内挿し、1mLあたりの国際単位で報告される(IU/mL)。色素アッセイも有用であり、商標名COATES T SP FVIIIA(Chromogenix AB、モルンダル、スウェーデンから入手可能)のアッセイを含め、商業的に購入されてもよい。色素生成アッセイ方法は、2つの連続した工程からなり、色強度は、FVIIIA活性に比例する。第1の工程では、因子Xは、最適量のカルシウムイオンおよびリン脂質存在下、FIXaとその補因子FVIIIAによって、FXaに活性化される。過剰量の因子Xは、因子Xの活性化速度が、単にFVIIIAの量に依存するように存在する。第2の工程では、因子Xaが色素生成基質を加水分解し、発色団が得られ、その色強度は、405nmで測光法によって読み取られる。未知のものの有効性が計算され、アッセイの妥当性は、傾き比の統計方法を用いて確認される。活性は、1mLあたりの国際単位で報告される(IU/mL)。

【0020】

フリーズドライする、凍結する、凍結乾燥する：「フリーズドライする」は、表示され

50

る本文に特に指示のない限り、調製物から水を取り出すために、医薬調製物の温度が第1および第2の凍結乾燥プロセスで上げられる凍結乾燥プロセスの一部を示すために用いられる。凍結乾燥プロセスの「凍結する」工程は、第1および第2の乾燥段階の前に行われる工程である。「凍結乾燥する」は、特に指示のない限り、凍結乾燥のプロセス全体を指し、凍結乾燥およびフリーズドライ工程の両方を含む。

【0021】

本開示の特定の態様の中で、PEG化されたFVIIIAおよびBDD-rFVIIIAを含む配合物を含め、rFVIIIAおよびBDD-rFVIIIAを含む配合物を、当該技術分野で公知の方法に従って凍結乾燥することができる。例えば、米国特許第5,399,670号および第5,763,401号は、溶解度を高めた凍結乾燥したFVIIIA配合物を製造する方法論を記載し、この方法論は、本明細書に記載される配合物を凍結乾燥するために使用されてもよい。凍結乾燥プロセスは、凍結段階、第1の乾燥段階および第2の乾燥段階を含む。凍結段階では、アニーリング工程が存在する。凍結段階は、-40を超えない温度で行われ、アニーリング工程は、-15を超えない温度で行われ、第1の乾燥は、0を超えない温度で行われ、第2の乾燥は、30を超えない温度で行われる。設定温度が凍結温度、アニーリング温度、最終的な凍結温度、第1の乾燥温度および第2の乾燥温度に達したら、関与する特定のタンパク質サンプルを考慮して当業者によって簡単に理解されるように、このような温度を、合理的な期間（例えば、1時間、2時間、3時間、または3時間より長く）保持してもよい。

10

【0022】

アニーリング：用語「アニーリング」は、凍結乾燥を受ける医薬調製の凍結乾燥プロセスにおいて、調製物の凍結乾燥の前の工程を示すために用いられ、この調製物の温度は、低い温度から高い温度まで上げられ、次いで、所定時間後に再び冷却される。

20

【0023】

增量剤：本明細書の目的のために、增量剤は、凍結乾燥した後に、医薬調製物の「ケーキ」または残留する固体塊の構造を与え、崩壊を防止する化学物質である。結晶化可能な增量剤は、凍結乾燥中に結晶化させることができる本明細書に記載されるような增量剤を意味する。

30

【0024】

界面活性剤：本明細書で使用される場合、用語「界面活性剤」は、「非イオン性界面活性剤」、例えば、ポリソルベート20およびポリソルベート80を含むポリソルベート、ポロキサマー184または188を含むポロキサマー、ブルロニックポリオール（BASF Wyandotte Corporation製の商標名PLURONICで販売される）および他のエチレン／ポリプロピレンブロックポリマーを含む。非イオン性界面活性剤は、処理および保存の間に、界面の相互作用を減らし、タンパク質が吸着するのを防ぐことによって、rFVIIIAを安定化する。非イオン性界面活性剤の使用によって、rFVIIIAの変性を起こすことなく、配合物が剪断力および表面応力にさらされる。本明細書に開示される配合物は、1種類以上の（1種類または複数の）非イオン性界面活性剤を含む配合物を含み、本明細書では、ポリソルベート、例えば、ポリソルベート20（商標名TWEEN 20で販売される）またはポリソルベート80（商標名TWEEN 80で販売される）を含む配合物が例示される。

40

【0025】

モル浸透圧濃度：本明細書で使用される場合、用語「モル浸透圧濃度」は、溶質濃度の測定値を指し、溶媒1kgあたりの溶質の浸透圧モル数であると定義される。望ましいレベルのモル浸透圧濃度は、1種類以上の安定化剤（例えば、マンニトール、デキストロース、グルコース、トレハロース、および／またはスクロースを含む糖または糖アルコール）を加えることによって達成することができる。モル浸透圧濃度を得るために適したさらなる安定化剤は、参考文献、例えば、handbook of Pharmaceutical Excipients (Fourth Edition, Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, Scien

50

ce & Practice Publishers) または Remingtons : The Science and Practice of Pharmacy (Nineteenth Edition, Mack Publishing Company) に記載されている。本明細書に記載される配合物は、モル浸透圧濃度が約 240 mOsm/kg ~ 約 450 mOsm/kg または約 750 mOsm/kg または約 1000 mOsm/kg、または約 270 mOsm/kg ~ 約 425 mOsm/kg、または約 300 mOsm/kg ~ 約 410 mOsm/kg の範囲である。

【0026】

適切な場合はいつでも、単数形で使用される用語は、複数のものも含み、その逆も真である。特に述べられていない限り、または「1つ以上の」の使用が明確に不適切である場合を除き、「1つの(a)」の使用は、「1つ以上の」を意味する。「または」の使用は、特に述べられていない限り、「および/または」を意味する。「～を含む(comprise)」、「～を含む(comprises)」、「～を含む(comprising)」、「～を含む(include)」、「～を含む(includes)」および「～を含む(including)」の使用は、相互に置き換え可能であり、限定することを意図していない。用語「例えば」も、限定することを意図していない。例えば、用語「～を含む(including)」は、「～を含むが、限定されない」を意味する。さらに、1つ以上の実施形態の記載が、「～を含む(comprising)」という用語を使用する場合、当業者は、ある特定の場合において、1つ以上の実施形態が、「～から本質的になる」および/または「～からなる」という言語を用いて代替的に記載されてもよいことを理解するだろう。

10

20

30

【0027】

本明細書で使用される場合、用語「約」は、提供された単位値の ± 10 % を指す。本明細書で使用される場合、用語「実質的に」は、目的の特徴または特性の程度の全体またはおおよその値を示す定性的な状態を指す。生物学の当業者は、生物学的現象および化学的現象が、あるにしても、生物学的および化学的な組成物および材料の試験、製造および貯蔵に影響を与える多くの変数のため、また、生物学的および化学的な組成物および材料の試験、製造および貯蔵に使用される設備および装置に固有の誤差のため、絶対的な結果を達成するか、または避けることはまれであることが理解するだろう。従って、実質的という用語は、多くの生物学的現象および化学的現象に固有の完全さが潜在的ないものを捕捉するために使用される。

【0028】

本明細書に記載される本発明の配合物は、重量基準、例えば、重量 % 基準、またはモル濃度基準の成分濃度の観点で記載されてもよい。本発明は、これらの配合物の凍結乾燥した調製物も包含することが理解されるべきであり、適切な希釀剤（例えば、生理食塩水または水）で再構築される場合、投与または保存のために報告される濃度を有する。本明細書の範囲は、この範囲の終点を含む。

40

【0029】

特に示されていない限り、パーセントという用語は、重量 / 体積パーセントを表し、温度は、摂氏スケールである。

40

【0030】

(組成物の成分)

本発明の F V T I I 組成物は、安定化剤、緩衝剤、塩化ナトリウム、カルシウム塩を含んでいてもよく、有利には、他の賦形剤を含んでいてもよい。これらの賦形剤は、凍結乾燥した調製物および/または液体調製物中の F V I I I の安定性を最大限にするために選択されている。

【0031】

本組成物に使用される增量剤は、好ましくは、マンニトール、グリシンおよびアラニンからなる群から選択される。マンニトール、グリシン、またはアラニンは、1 ~ 5 %、2 ~ 3 % および 2 . 2 ~ 2 . 6 % の量で存在していてもよい。グリシンは、選択された增量

50

剤であってもよい。增量剤を含有しない組成物も想定される。

【0032】

本組成物に使用される安定化剤は、糖類または糖アルコールからなる群から選択され、限定されないが、スクロース、マンニトール、デキストロース、グルコースおよびトレハロースからなる群から選択される。これらの薬剤は、組成物中に、0.5～10%、1～8%、2～7%、3～6%、4～5%、1～5%、1～4%、1～3%、または1～2%の量で存在する。增量剤を含有する組成物では、スクロースは、1～3%の量で好ましい安定化剤である。增量剤を含まない組成物では、スクロースまたはトレハロースは、約8%の量で安定化剤として選択されてもよい。これらの糖類または糖アルコールは、細胞保護剤としても機能する。

10

【0033】

それに加え、バッファーは、特定の本発明の組成物中に存在する。凍結乾燥中、FVIがpH移動によって悪い影響を受け得ると考えられるため、バッファーは、例えば、凍結乾燥を受けるFVI-II配合物中で有用であろう。緩衝剤は、バッファーとして作用する能力を有する、生理学的に許容される化学物質または化学物質の組み合わせであってもよく、ヒスチジンおよびMOPS(3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸)を含む。ヒスチジンは、約20mMの量で選択される緩衝剤であってもよい。

【0034】

FVI-IIの活性を保存するために、本発明の組成物は、FVI-IIと相互作用し、その活性を維持することができるカルシウムまたは別の二価のカチオンも含んでいてもよく、おそらく、FVI-IIの重鎖および軽鎖の会合を維持することによると思われる。1mM～5mMのカルシウム塩を使用してもよい。カルシウム塩は、塩化カルシウムであってもよいが、他のカルシウム塩、例えば、グルコン酸カルシウム、グルビオン酸カルシウム、またはグルセブチン酸カルシウムであってもよい。本発明のFVI-II組成物は、界面活性剤、特に、ポリソルベート20およびポリソルベート80、ポロキサマー184または188を含むポロキサマー、フルロニックポリオール(BASF Wyandotte

20

Corporation製の商標名PLURONICで販売される)および他のエチレン/ポリプロピレンブロックポリマーからなる群から選択される非イオン性界面活性剤も含んでいてもよい。界面活性剤は、約80ppmの量のポリソルベート80であってもよい。

30

【0035】

本組成物に使用されるFVI-IIは、生体適合性ポリマー、例えば、PEGに共有結合してもよい。本明細書で使用される場合、用語「ポリエチレングリコール」または「PEG」は、相互に置き換え可能であり、任意の水溶性ポリ(エチレンオキシド)を含む。PEGは、以下の構造「-(OCH₂CH₂)_n-」を含み、(n)は、2～4000である。本明細書で使用される場合、PEGは、末端酸素が置き換わっているかいないかに依存して、「-CH₂CH₂-O(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-」および「-(OCH₂CH₂)_nO-」も含む。用語「PEG」は、種々の末端基または「末端を保護する」基、例えば、限定されないが、ヒドロキシル基またはC1-20アルコキシ基、例えば、メトキシを有する構造を含む。用語「PEG」は、大部分の(つまり、50%より多い)-OCH₂CH₂-繰り返しサブユニットを含むポリマーも意味する。特定の形態に關し、PEGは、任意の種々の数の分子量および構造または幾何形状であってもよく、例えば、分枝鎖、線状、フォーク状および多官能であってもよい。本明細書で使用される場合、用語「PEG化」は、ポリエチレングリコール(PEG)が、タンパク質のような分子に共有結合するプロセスを指す。官能基(例えば、生体適合性ポリマー)が活性化していると記載されている場合、この官能基は、別の分子上の求電子試薬または求核試薬と簡単に反応する。

40

【0036】

本明細書に開示される接合体に使用される生体適合性ポリマーは、本明細書に記載されるか、または当該技術分野で公知の任意のポリマーであってもよい。生体適合性ポリマー

50

は、薬物動態において望ましい改良を与えるように選択される。例えば、ポリマーの属性、大きさおよび構造は、活性を受け入れられないほど低下させることなく、FVIIの循環血中半減期を向上させるか、またはFVIIの抗原性を減らすように選択される。ポリマーは、PEGを含んでいてもよい。例えば、ポリマーは、末端を保護する部分、例えば、ヒドロキシル、アルコキシ、置換アルコキシ、アルケンオキシ、置換アルケンオキシ、アルキンオキシ、置換アルキンオキシ、アリールオキシおよび置換アリールオキシで末端が保護されたポリエチレングリコールであってもよい。ある実施形態では、ポリマーは、メトキシポリエチレングリコール、例えば、粒径が3kD～200kDのメトキシポリエチレングリコールを含んでいてもよい。

【0037】

10

ポリマーは、反応性部分を含んでいてもよい。例えば、ポリマーは、官能性FVIIポリペプチド上の遊離システインと反応し、共有結合を生成することができるスルフヒドリル反応性部分を含んでいてもよい。このようなスルフヒドリル反応性部分としては、チオールトリフラート部分、トレシラート部分、アジリジン部分、オキシラン部分、S-ピリジル部分またはマレイミド部分が挙げられる。ポリマーは、直鎖であってもよく、片方の末端に、他の末端のスルフヒドリル（例えば、メトキシ）およびスルフヒドリル反応性部分と強反応性ではない「保護部」を含んでいてもよい。接合体は、粒径が5kD～64kDのPEG-マレイミドを含んでいてもよい。または、ポリマーは、アミン反応性部分、例えば、スクシンイミジルプロピオネート、スクシンイミジルブタノエート、ベンゾトリアゾールカーボネート、ヒドロキシスクシンイミド、アルデヒド、例えば、ピロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、アセタール、ピペリドン、メチルケトン、などを含んでいてもよい（例えば、米国特許第7,199,223号（Bossard）を参照）。

20

【0038】

FVII分子を、FVIIの炭水化物部分に対するポリマーの接合によって生体適合性ポリマーに接合してもよい。米国特許出願公開第20110112028号（Turecekら）を参照。FVIIの酸化された炭水化物部分に水溶性ポリマーを接合することによって、FVII分子を水溶性ポリマーに接合してもよい。水溶性ポリマーは、ある実施形態では、PEG、ポリシアル酸（「PSA」）およびデキストランからなる群から選択される。さらに別の態様では、活性化された水溶性ポリマーは、PEG-ヒドラジド、PSA-ヒドラジンおよびアルデヒド-活性化されたデキストランからなる群から選択される。本発明の別の態様では、炭水化物部分は、NaIO₄を含むバッファー中にインキュベートすることによって酸化される。

30

【0039】

本発明で使用されるのに適したFVIIタンパク質は、特定の既知のアミノ酸配列と同一性を有する。例えば、本発明で使用するのに適したFVII改变体は、既知のFVIIアミノ酸配列、例えば、全長FVIIのアミノ酸配列（配列番号1）またはBD-D-FVIIのアミノ酸配列（配列番号3）に対して少なくとも約70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の同一性を有する改変体である。本発明では、既知のFVII配列に対し、定義される配列差を有する遺伝子改変体、例えば、ネイティブ配列、既知の配列またはコントロール配列、例えば、全長FVIIのアミノ酸配列（配列番号1）またはBDD-SQのアミノ酸配列（配列番号3）と比較したとき、アミノ酸配列において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、1～10、1～5、2～6または3～8の違いを有するアミノ酸配列を含むFVII分子も有用である。対立遺伝子改変体も本発明に有用である。FVIIの対立遺伝子改変体の例は、米国特許出願公開第2010/0256062号（Howardら）；Howardら、「African-Americans Express Multiple Haplotypic Forms of the Wildtype Factor VII (FVII) Protein: A Possible Role for Pharmacogenetics in FVII」

40

50

Inhibitor Development?」Blood、Vol. 104、2004、Abstract 384；およびVicil、K.Rら、「Inhibitors of Factor VIII in Black Patients with Hemophilia」、The New England Journal of Medicine、Vol. 360、2009、pp. 1618-27に開示される。対立遺伝子改変体としては、例えば、位置484でのアルギニンをヒスチジンに変える置換(R484H)、776位置でアルギニンをグリシンに変える置換(R776G)、1241位置でアスパラギン酸をグルタミン酸に変える置換(D1241E)および2238位置でメチオニンをバリンに変える置換(M2238V)を含め、アミノ酸置換を含むものが挙げられる。アミノ酸置換を示すために使用される番号付けシステムは、本明細書の配列番号2に基づく。

10

【0040】

比較のためのヌクレオチドまたはアミノ酸配列のアラインメント方法は、当該技術分野で周知である。本発明のアラインメントは、適切な方法によって、SmithおよびWaterman、Adv. Appl. Math. 2:482(1981)の局所的な同一性アルゴリズム(BESTFIT)を用いることによって測定されてもよく、NeedlemanおよびWimsc'h、J. Mol. Biol. 48:443-53(1970)の同一性アラインメントアルゴリズム(GAP)を用いることによって、またはPearsonおよびLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444(1988)類似性を検索するための方法(TfastaおよびFasta)を用いることによって、比較のための配列の最適なアラインメントを行ってもよい。アラインメントは、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実行を用いて、限定されないが、IntelliGenetics(マウンテンビュー、カリフォルニア)製のPC/Genieプログラム中のCLUSTAL、Wisconsin Genetics Software Package、Version 8(Genetics Computer Groupから入手可能(GCG(登録商標)プログラム(Accelrys, Inc.、サンディエゴ、CA))の中のGAP、BESTFIT、BLAST、FASTAおよびTFASTAを用いて行われてもよい。CLUSTALプログラムは、HigginsおよびSharp、Gene 73:237-44(1988)；HigginsおよびSharp、CABIOS 5:151-3(1989)；Corpetら、Nucleic Acids Res. 16:10881-90(1988)；Huangら、Computer Applications in the Biosciences 8:155-65(1992)およびPearsonら、Meth. Mol. Biol.

20

24:307-31(1994)によく記載される。複数の配列の最適な全体的なアラインメントのために使用する1つのプログラムは、PILEUP(FengおよびDoollittle、J. Mol. Evol. 25:351-60(1987))であり、HigginsおよびSharp、CABIOS 5:151-53(1989)に記載される方法に似ている。BLASTファミリーのプログラムを、例えば、他の適切なFVII分子を特定するためのデータベースの類似性検索に使用することができる。CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、Chapter 19、Ausubelら編集、Greene Publishing and Wiley-Interscience、New York(1995)を参照。

30

【0041】

上述のように、FVIIのBドメインは、活性に不必要であると考えられる。特定の実施形態では、本発明で使用されるFVIIは、Bドメインのすべてまたは一部が欠損していてもよい。従って、本発明は、全長FVII(配列番号1)のアミノ酸1~740と少なくとも約70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、このようなアミノ酸配列をコードし、全長FVII(配列番号1)のアミノ酸1689

40

50

～2351と少なくとも約70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%同一性を有するアミノ酸配列を含むか、このようなアミノ酸配列をコードする、FVII改変体またはこのような改変体をコードするヌクレオチド配列に適用される。または、本発明は、配列番号1の全長アミノ酸配列と少なくとも約70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、このようなアミノ酸配列をコードする、FVII改変体またはこのような改変体をコードするヌクレオチド配列に適用される。

10

【0042】

本発明の特定の実施形態では、FVIIは、部位特異的突然変異の結果、例えば、FVIIに対する結合部位を作成するか、または生体適合性ポリマー（例えばPEG）に共有結合するものであってもよい。FVII活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の部位特異的突然変異は、当該技術分野で公知の任意の方法によって行われてもよい。方法は、ポリマーに共有結合するために選択される部位にシステインコドンを導入するような突然変異誘発を含む。この突然変異誘発は、市販の部位特異的突然変異誘発キット、例えば、STRATAGENE CQUICK CHANGE II 部位特異的突然変異誘発キット、CLONETECH TRANSFORMER 部位特異的突然変異誘発キット K1600-1番、INVITROGEN GENTAYLOR 部位特異的突然変異誘発システム 12397014番、PROMEGA ALTERED SITE II の in vitro 突然変異誘発システムキット Q6210番、またはTAKARA MIRUS BIO LA PGR 突然変異誘発キット TAK RR016番を用いて達成されてもよい。本明細書に記載される接合体は、最初に、官能性FVIIポリペプチド表面の1つ以上のアミノ酸ためのコドンを、システインのためのコドンと交換し、組み換え発現系の中にシステイン変異体を作成し、変異体と、システイン特異的なポリマー試薬とを反応させ、ムテインを精製することによって調製されてもよい。この系では、システイン部位へのポリマーの付加は、ポリマー上のマレイミドに活性な官能基によって達成することができる。例えば、米国特許第7,632,921号（Panら）を参照。

20

30

【0043】

使用されるスルフヒドリル反応性ポリマーの量は、誘導体化されるシステインのモル量と少なくとも等モルであるべきであり、過剰に存在してもよい。5倍過剰または10倍過剰のスルフヒドリル反応性ポリマーを使用してもよい。共有結合に有用な他の条件も、当該分野の技術の範囲内である。

【0044】

ポリマー（例えば、PEG）の共有結合のためにあらかじめ規定された部位は、FVII活性に関与しないか、または in vivo で FVII を安定化させる他の機能（例えば、vWF に結合する）に関する、rFVTIIポリペプチドまたはBDD rFVIIIIポリペプチドの表面に露出した部位から選択することができる。このような部位は、FVIIが不活性化されるか、または循環から排出される機構に関することが知られている部位からも、最もよく選択される。アミノ酸をシステインで置換する部位としては、(a)低密度リポタンパク質受容体に関連するタンパク質、(b)硫酸ヘパリンプロテオグリカン、(c)低密度リポタンパク質受容体および/または(d)FVII阻害活性のための結合部位またはこれらの部位付近のアミノ酸残基が挙げられる。「結合部位またはこれらの部位付近」とは、この部位に対する生体適合性ポリマーの共有結合によって、結合部位の立体障害が生じるような結合部位に十分に近い残基を意味する。このような部位は、例えば、結合部位の 20 以内であると予想される。

40

【0045】

生体適合性ポリマーは、rFVIIIIポリペプチドまたはBDD rFVIIIIポリペ

50

プチド、またはこれらの変異改变体に、81、129、377、378、468、487、491、504、556、570、711、1648、1795、1796、1803、1804、1808、1810、1864、1903、1911、2091、2118および2284の1つ以上のFVIIIAミノ酸位置で共有結合してもよい。官能性FVIIAIポリペプチド上の1つ以上の部位（例えば、1つまたは2つ）は、ポリマー接続のためにあらかじめ規定された部位であってもよい。具体的な実施形態では、ポリペプチドは、モノPEG化されているか、またはジPEG化されており、このことは、1個のPEG分子または2個のPEG分子がそれぞれ、それぞれのFVIIAIに結合していることを意味する。

【0046】

10

FVIIAI変異体の部位特異的なPEG化は、(a)変異体が、FVIIAI変異体の露出した表面にアミノ酸残基についてシステイン交換を有し、システインが保護されているような部位特異的FVIIAI変異体を発現し、(b)システイン変異体を穏和に還元し、保護を放出するための条件で、システイン変異体と、還元剤とを接触させ；(c)システイン変異体から保護および還元剤を除去し、(d)還元剤を除去した後に、PEG化されたFVIIIAMテインが生成するような条件で、システイン変異体を、スルフヒドリルカップリング部分を含むPEGで処理することによって達成することもできる。PEGのスルフヒドリルカップリング部分は、チオール部分、トリフラート部分、トレシラート部分、アジリジン部分、オキシラン部分、S-ピリジル部分およびマレイミド部分からなる群から選択され、マレイミドであってもよい。

20

【0047】

別の実施形態では、生体適合性ポリマー（例えば、PEG）を、アミンに特異的な官能基で官能基化されたポリマーを使用することによって共有結合する。ポリマーは、例えば、FVIIAI上のリジンと反応性であるようなmPEGトレシラートまたはmPESクシンイミジルサクシネートで官能基化されてもよい。カップリングは、固体状態で活性化されたmPEGを、FVIIAIの溶液に加え、室温で回転させることによって、FVIIAI上のランダムなリジンで起こり得る。改変度は、使用される活性化されたmPEGの過剰度によってゆるく制御されるだろう。Rostinら、「B-Domain Deleted recombinant Coagulation Factor VIIIModified with Monomethoxy Polyethylene Glycol」11 Bioconjug. Chem.、2000、pp.387-396。PEG化の条件および試薬のさらなる例は、米国特許第7,199,223号（Bossard）および米国特許第4,970,300号（Fullerton）に与えられる。本発明は、FVIIAIに対し、生体適合性ポリマーを共有結合させるための方法にも関し、本発明の液体配合物の片方は溶液であり、この溶液内で反応が起こる。

30

【0048】

本開示は、血友病Aを処置することが必要な患者に、本明細書に記載される治療に有効な量の1つ以上の配合物を投与することを含む、患者の血友病Aを処置する方法も提供する。これらの配合物は、静脈内注射、皮下注射によって、または連続的な注入によって患者に投与されてもよい。

40

【0049】

本明細書で使用される場合、rFVIIAI配合物またはPEG化されたrFVIIAI配合物の「治療に有効な量」という用語は、治療効果を与えることが必要な患者に、投与計画で治療効果を与える配合物の量を指す。例えば、血友病Aの代替治療のために、静脈内注射のために10～30IU/kg（体重）の量の組み換え全長FVIIAIが推奨される。血友病Aを有する子供の予防のために、静脈内注射のために25IU/kg（体重）の量の組み換え全長FVIIAIが推奨される。血友病Aを有する子供の予防のために、手術の前に、静脈内注射のために15～30IU/kg（小さな手術）または50IU/kg（大きな手術）の組み換え全長FVIIAIが推奨される。本発明の配合物に使用される種々のFVIIAI分子のための対応する投薬量は、当業者が決定することができる。好まし

50

くは、本発明の治療用のFVII配合物は、単回使用で、100、250、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3400、3600、3800、4000、または5000IUの投薬量で、これらの任意の2つの投薬量範囲で、すなわち、100～250IU、100～500IU、1000～2000IUなどで提供されてもよく、終点を含む。これらが低粘度であるため、本明細書に開示されるrFVII配合物およびPEG-rFVITT配合物は、例えば、超濾過および滅菌濾過によって簡便に処理することができ、静脈内注射、皮下注射および連続注入を含む注射によって患者に投与することができる。

【0050】

10

本明細書に記載されるFVII組成物は、所定の濃度で凍結乾燥し、再構築することができる。これらのFVII組成物を、もっと希釈した形態で再構築することもできる。例えば、凍結乾燥され、および/または2mlの溶液に通常のように再構築された本発明の調製物も、もっと大容積の希釈剤（例えば、5ml）に再構築することもできる。この場合には、FVIIが、FVIIのもっと希釈した溶液でもっと迅速に起こり得るような活性の喪失があまりないと考えられるため、特に、FVII調製物が患者にすぐに注射される場合に適している。

【0051】

20

(実施形態1)

組み換えFVIIは、血漿から誘導されるFVII（例えば、von Willebrand因子(vWF)）を安定化する血漿タンパク質が存在しない状態で作られる。このような安定化するタンパク質が存在しないと、rFVIIがきわめて不安定になる。それに加え、rFVIIは、治療薬溶液に非常に低濃度で存在し（治療投薬量1000IUのBDD-SQのために、1mlあたり0.02mgのタンパク質）、表面吸着によって活性の低下を引き起す。

【0052】

30

本発明の一実施形態は、rFVII、特に、BDD-rFVII、さらに特定的には、ドメイン（例えば、A1ドメインと、A2ドメインまたはA3ドメイン）の間が架橋したBDD-rFVII変異体の配合物である。一実施形態では、配合物は、例えば、Griffinらに対する米国特許第7,928,199号（2011年4月19日に登録）に記載されるようなジスルフィド架橋によって、A2ドメインと、A1ドメインまたはA3ドメイン、好ましくは、A2ドメインとA3ドメインを架橋する二重のシステイン突然変異を有するFVIIの配合物であり、限定されないが、FVIIの変異体を含み、1つ以上のシステインが、1つ以上の部位に導入されたBDD-SQ（配列番号3）の変異体を含み、その結果、少なくとも一対のシステインが、野生型FVIIにはみられないジスルフィド結合を生成する。一実施形態では、変異体FVIIは、少なくとも一対の組み換えによって導入されたシステインを含み、一対のシステインは、Met 662およびAsp 1828、Ser 268およびPhe 673、He 312およびPro 672、Ser 313およびAla 644、Met 662およびLys 1827、Tyr 664およびThr 1826、Pro 264およびGin 645、Arg 282およびThr 522、Ser 285およびPhe 673、His 311およびPhe 673、Ser 314およびAla 644、Ser 314およびGin 645、Val 663およびGlu 1829、Asn 694およびPro 1980およびSer 695およびGlu 1844からなる群から選択される少なくとも一対の残基を置き換える。本実施形態の配合物に適したFVII分子は、溶液中で凝集し、および/または高い沈殿の傾向を示すという欠点がある。これらの欠点は、安定な治療投薬量を調製するときに問題となる。また、例えば、生体適合性ポリマー（例えばPEG）の共有結合によって、FVII分子をさらに処理すべき場合、FVII分子は、好ましくは、良好な処理を与え、例えば、PEG化したときに良好な収率を与えるような溶液であり、FVIIが懸濁物または溶液であり、懸濁しないことを

40

50

必要とする。一実施形態では、本出願のFVI₁I配合物は、沈殿および／または凝集を減らすか、または止め、安定性を与えるのに十分な量で塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを含有する。

【 0 0 5 3 】

実施形態1の配合物は、以下のとおりであってもよい。rFVIIIA配合物は、

(a) 約 0 mM ~ 約 20 mM、約 1 mM ~ 約 20 mM、約 1 mM ~ 約 50 mM、約 10 mM ~ 約 50 mM、約 10 mM ~ 約 20 mM、約 10 mM ~ 約 30 mM、または約 20 mM ~ 約 50 mM の範囲のヒスチジン；

(b) 約 0 mM ~ 約 29 mM、約 1 mM ~ 約 29 mM、約 1 mM ~ 約 300 mM、約 10 mM ~ 約 30 mM、約 10 mM ~ 約 100 mM、約 10 mM ~ 約 200 mM、約 10 mM ~ 約 50 mM、約 29 mM ~ 約 58 mM、約 34 mM ~ 約 58 mM、約 58 mM ~ 約 1000 mM、または約 100 mM ~ 約 300 mM の範囲、または約 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100、200、または約 300 mM の量の糖または糖アルコール；

(c) 約 1 mM ~ 約 2 mM、約 1 mM ~ 約 2 . 5 mM、約 1 . 5 mM ~ 約 3 . 5 mM、または約 1 mM ~ 約 5 mM の範囲の二価のカチオン、例えば、二価のカルシウム塩（塩化カルシウムを含む）；

(d) 約 150 mM ~ 約 250 mM、約 150 mM ~ 約 220 mM、約 150 mM ~ 約 200 mM、約 150 mM ~ 約 190 mM、約 170 mM ~ 約 250 mM; 約 200 mM ~ 約 220 mM、約 170 mM ~ 約 200 mM、約 200 mM ~ 約 250 mM、約 170 mM ~ 約 220 mM、約 190 mM ~ 約 220 mM、約 210 mM ~ 約 220 mM、約 150 mM ~ 約 180 mM、約 150 mM ~ 約 160 mM、または約 220 mM ~ 約 250 mM の範囲の塩化ナトリウムまたは塩化カリウム;

(e) 約 20 ppm ~ 約 200 ppm、約 20 ppm ~ 約 50 ppm、約 20 ppm ~ 約 80 ppm、約 50 ppm ~ 約 80 ppm、約 80 ppm ~ 約 100 ppm、約 80 ppm ~ 約 200 ppm、約 50 ppm ~ 約 100 ppm、または約 50 ppm ~ 約 200 ppm の範囲の非イオン性界面活性剤、または、約 60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、160、170、180、190、200、または 210 ppm の非イオン性界面活性剤；

(f) 約 0 mM ~ 約 50 mM、約 1 mM ~ 約 50 mM、約 50 mM ~ 約 100 mM、約 100 mM ~ 約 150 mM、約 150 mM ~ 約 293 mM、約 150 mM ~ 約 400 mM、約 200 mM ~ 約 300 mM；約 250 mM ~ 約 300 mM、または約 200 mM ~ 約 400 mM の範囲のグリシン、または、約 100、200、210、230、240、250、260、270、280、290、293、295、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、または約 400 mM のグリシン；および

(g) 約 100 IU / ml ~ 約 5000 IU / ml、約 100 IU / ml ~ 約 2000 IU / ml、約 100 IU / ml ~ 約 3000 IU / ml、約 100 IU / ml ~ 約 4000 IU / ml、約 100 IU / ml ~ 約 12000 IU / ml、約 250 IU / ml ~ 約 5000 IU / ml、約 250 IU / ml ~ 約 10000 IU / ml、約 250 IU / ml ~ 約 20000 IU / ml、約 250 IU / ml ~ 約 30000 IU / ml、約 500 IU / ml ~ 約 10000 IU / ml、約 500 IU / ml ~ 約 30000 IU / ml、約 1000 IU / ml ~ 約 20000 IU / ml、約 1000 IU / ml ~ 約 40000 IU / ml、または約 1000 IU / ml ~ 約 50000 IU / ml の範囲、または約 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3500、3800、4

0 0 0、4 2 0 0、4 5 0 0、4 8 0 0、5 0 0 0、5 5 0 0、または6 0 0 0 I U / m 1 の r F V I I I 1、B D D - r F V I I I I 、B D D - r F V I I I 变異体および F V I I I ドメイン間に架橋を有する B D D - r F V I I I 变異体から選択される r F V I I I 1 を含み、r F V I I I 1 配合物は、p H が約 p H 6 . 0 ~ 約 p H 6 . 5、約 p H 6 . 0 ~ 約 p H 7 . 0、約 p H 6 . 0 ~ 約 p H 7 . 5、約 p H 6 . 5 ~ 約 p H 7 . 5、または約 p H 7 . 0 ~ 約 p H 7 . 5 の範囲、または p H が約 p H 6 . 0、6 . 5、7 . 0、7 . 1、7 . 2、7 . 3、7 . 4 または約 p H 7 . 5 である。

【0 0 5 4】

実施形態 1 の他の態様では、本発明は、

(a) 約 0 m M ~ 約 2 0 m M 、約 1 0 m M ~ 約 5 0 m M 、または約 1 0 m M ~ 約 3 0 m M の範囲のヒスチジン；

(b) 約 1 m M ~ 約 2 9 m M 、約 1 0 m M ~ 約 3 0 m M 、約 1 0 m M ~ 約 1 0 0 m M 、約 1 0 m M ~ 約 2 0 0 m M 、約 1 0 m M ~ 約 5 0 m M 、約 2 9 m M ~ 約 5 8 m M 、または約 3 4 m M ~ 約 5 8 m M の範囲、または約 2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、または 4 0 m M の量の糖または糖アルコール；

(c) 約 1 m M ~ 約 2 m M 、約 1 m M ~ 約 2 . 5 m M 、約 1 . 5 m M ~ 約 3 . 5 m M 、または約 1 m M ~ 約 5 m M の範囲の二価のカチオン、例えば、二価のカルシウム塩（塩化カルシウムを含む）；

(d) 約 1 5 0 m M ~ 約 2 0 0 m M 、約 1 5 0 m M ~ 約 2 2 0 m M 、約 1 7 0 m M ~ 約 2 5 0 m M の範囲の塩化ナトリウムまたは塩化カリウム；

(e) 約 2 0 p p m ~ 約 8 0 p p m 、約 8 0 p p m ~ 約 1 0 0 p p m 、約 5 0 p p m ~ 約 1 0 0 p p m 、または約 5 0 p p m ~ 約 2 0 0 p p m の範囲の非イオン性界面活性剤、または、約 7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、1 0 0、1 0 5、1 1 0、1 1 5、または 1 2 0 p p m の非イオン性界面活性剤；

(f) 約 1 m M ~ 約 5 0 m M 、約 1 5 0 m M ~ 約 3 0 0 m M 、約 1 5 0 m M ~ 約 4 0 0 m M 、約 2 0 0 m M ~ 約 3 0 0 m M ；または約 2 5 0 m M ~ 約 3 0 0 m M の範囲、または約 2 5 0、2 6 0、2 7 0、2 8 0、2 9 0、2 9 3、2 9 5、3 0 0、3 1 0、または約 3 2 0 m M のグリシン；および

(g) 約 1 0 0 I U / m l ~ 約 5 0 0 0 I U / m l 、約 1 0 0 I U / m l ~ 約 2 0 0 0 I U / m l 、約 1 0 0 I U / m l ~ 約 3 0 0 0 I U / m l 、約 1 0 0 I U / m l ~ 約 4 0 0 0 I U / m l 、約 1 0 0 I U / m l ~ 約 1 2 0 0 I U / m l 、約 2 5 0 I U / m l ~ 約 5 0 0 0 I U / m l 、約 2 5 0 I U / m l ~ 約 1 0 0 0 I U / m l 、約 2 5 0 I U / m l ~ 約 3 0 0 0 I U / m l 、約 5 0 0 I U / m l ~ 約 1 0 0 0 I U / m l 、約 5 0 0 I U / m l ~ 約 3 0 0 0 I U / m l 、約 1 0 0 0 I U / m l ~ 約 2 0 0 0 I U / m l 、約 1 0 0 0 I U / m l ~ 約 3 0 0 0 I U / m l 、約 1 0 0 0 I U / m l ~ 約 4 0 0 0 I U / m l 、または約 1 0 0 0 I U / m l ~ 約 5 0 0 0 I U / m l の範囲、または約 1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0、6 0 0、7 0 0、8 0 0、9 0 0、1 0 0 0、1 2 0 0、1 4 0 0、1 6 0 0、1 8 0 0、2 0 0 0、2 2 0 0、2 4 0 0、2 6 0 0、2 8 0 0、3 0 0 0、3 2 0 0、3 5 0 0、3 8 0 0、4 0 0 0、4 2 0 0、4 5 0 0、4 6 0 0、4 8 0 0、5 0 0 0、5 5 0 0、または 6 0 0 0 I U / m l の B D D - r F V I I I 、B D D - r F V I I I 变異体および F V I I I ドメイン間に架橋を有する B D D - r F V I I I 变異体から選択される r F V I I I 1 を含み、

r F V I I I 配合物は、p H が約 p H 6 . 0 ~ 約 p H 7 . 5、約 p H 6 . 5 ~ 約 p H 7 . 5、または約 p H 7 . 0 ~ 約 p H 7 . 5 の範囲であるか、または p H が約 p H 6 . 0、6 . 5、7 . 0、7 . 1、7 . 2、7 . 3、7 . 4 または約 p H 7 . 5 である、r F V I I I 配合物に関する。

【0 0 5 5】

特定の実施形態では、糖または糖アルコールは、スクロースであり、塩化ナトリウムが

10

20

30

40

50

存在する。

【0056】

実施形態1の別の態様では、本発明は、

- (a) 約10 mM～約30 mMの範囲のヒスチジン；
- (b) 約10 mM～約30 mM、約10 mM～約100 mM、約10 mM～約200 mM、約10 mM～約50 mM、約29 mM～約58 mM、または約34 mM～約58 mMの範囲の糖または糖アルコール；
- (c) 約1 mM～約2 mM、約1 mM～約2.5 mM、約1.5 mM～約3.5 mM、または約1 mM～約5 mMの範囲の二価のカルシウム塩（塩化カルシウムを含む）；
- (d) 約150 mM～約220 mM、約170 mM～約250 mMの範囲の塩化ナトリウムまたは塩化カリウム；
- (e) 約50 ppm～約200 ppmの範囲の非イオン性界面活性剤；
- (f) 約1 mM～約50 mM、約150 mM～約300 mM、約150 mM～約400 mM、約200 mM～約300 mM、または約250 mM～約300 mMの範囲のグリシン；および
- (g) 約100 IU/ml～約5000 IU/ml、約100 IU/ml～約2000 IU/ml、約100 IU/ml～約3000 IU/ml、約100 IU/ml～約4000 IU/ml、約100 IU/ml～約12000 IU/ml、約250 IU/ml～約5000 IU/ml、約250 IU/ml～約20000 IU/ml、約250 IU/ml～約30000 IU/ml、約500 IU/ml～約10000 IU/ml、約500 IU/ml～約30000 IU/ml、約1000 IU/ml～約20000 IU/ml、約1000 IU/ml～約30000 IU/ml、約1000 IU/ml～約40000 IU/ml、または約1000 IU/ml～約50000 IU/mlの範囲、または約100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3500、3800、4000、4200、4500、4600、4800、5000、5500、または6000 IU/mlのBDD-rFVII_I、BDD-rFVII_I変異体およびFVII_IDメイン間に架橋を有するBDD-rFVII_I変異体から選択されるrFVII_Iを含み、

rFVII_I配合物は、pHが約pH6.0～約pH7.5、約pH6.5～約pH7.5、または約pH7.0～約pH7.5の範囲であるか、またはpHが約pH6.0、6.5、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4または約pH7.5である、rFVII_I配合物に関する。

【0057】

実施形態1のさらに別の態様では、本発明は、

- (a) 約10 mM～約30 mMの範囲のヒスチジン；
- (b) 約10 mM～約50 mMの範囲のスクロース；
- (c) 約1.5 mM～約3.5 mMの範囲の塩化カルシウム；
- (d) 約150 mM～約220 mMまたは約170 mM～約220 mMの範囲の塩化ナトリウム；
- (e) 約70 ppm～約90 ppmの範囲の非イオン性界面活性剤；
- (f) 約200 mM～約300 mMまたは約250 mM～約300 mMの範囲のグリシン；および
- (g) 約100 IU/ml～約2000 IU/ml、約100 IU/ml～約3000 IU/ml、約250 IU/ml～約10000 IU/ml、約250 IU/ml～約30000 IU/ml、約500 IU/ml～約20000 IU/ml、約500 IU/ml～約30000 IU/ml、約1000 IU/ml～約20000 IU/ml、または約1000 IU/ml～約30000 IU/mlのBDD-rFVII_I、BDD-rFVII_I変異体およびFVII_IDメイン間に架橋を有

するBDD-rFVII変異体から選択されるrFVIIを含み、rFVII配合物は、pHが約pH6.0～約pH7.5、約pH6.5～約pH7.5、または約pH7.0～約pH7.5の範囲、またはpHが約pH6.0、6.5、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4または約pH7.5である、rFVII配合物に関する。

【0058】

実施形態1のrFVII配合物は、アルブミン、例えば、HSAを含んでいてもよい。特定の実施形態では、HSAは、約10～約50mg/mL、約15～約30mg/mL、約20～約30mg/mLまたは約25～約30mg/mLの範囲で存在する。

【0059】

(実施形態2)

FVIIに対する生体適合性ポリマーの共有結合性付加の間、バッファー成分が共有結合性付加を妨害し得ることが観察された。例えば、FVIIが、リジン残基に付加するようなアミン反応性基を有するように官能基化されたPEGを用いてPEGに共有結合した場合、反応バッファー中のアミン含有成分がこの反応を妨害することが観察された。従って、本発明は、FVIIに対する付加反応が起こり得る液体FVII配合物またはバッファーを改良したものを含む。実施形態2の一態様では、液体FVII配合物は、FVII以外の一級アミン基または二級アミン基を含む成分を含まないか、または10重量%未満、または5重量%未満、または1重量%未満、または0.5重量%未満、またはわずか痕跡量のFVII以外の一級アミン基または二級アミン基を含む成分を含む。この実施形態の本発明のFVII配合物は、ヒスチジンおよびグリシンの使用を避ける配合物を含む。ヒスチジンおよびグリシンは、PEG化プロセスを妨害し得るアミンを含有する。

10

20

30

40

50

【0060】

本発明の実施形態2の一態様は、pH6～7でバッファー能を有し、塩化カルシウム(重要なrFVII安定化剤)との不溶性複合物またはキレートを生成せず、一級アミン基または二級アミン基を有する成分を含まないか、またはこのような成分を10重量%以下、5重量%以下、1重量%以下の重量%で、または痕跡量含む、rFVIIの配合物である。この配合物は、MOPSを10mM～100mMの範囲で、10mM～70mMの範囲で、10mM～50mMの範囲で、10mM～40mMの範囲で、10mM～30mMの範囲で、12mM～30mMの範囲で、14mM～30mMの範囲で、16mM～30mMの範囲で、18mM～30mMの範囲で、20mM～28mMの範囲で、12mM～28mMの範囲で、12mM～26mMの範囲で、12mM～24mMの範囲で、12mM～22mMの範囲で、14mM～22mMの範囲で、または18mM～22mMの範囲で含んでいてもよく、または、約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30mMのMOPSを含んでいてもよい。この配合物は、rFVIIを約100IU/ml～約1000IU/ml、約100IU/ml～約500IU/ml、約100IU/ml～約2000IU/ml、約100IU/ml～約3000IU/ml、約500IU/ml～約3000IU/ml、約500IU/ml～約2000IU/ml、約500IU/ml～約1200IU/ml、約500IU/ml～約2500IU/ml、約500IU/ml～約1200IU/ml、約500IU/ml～約1000IU/ml、約500IU/ml～約1500IU/ml、約1000IU/ml～約2000IU/ml、約1000IU/ml～約2500IU/ml、約1000IU/ml～約3000IU/ml、約1000IU/ml～約2500IU/ml、約1000IU/ml～約6000IU/ml、または約1000IU/ml～約5000IU/mlの範囲で含んでいてもよく、または約100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3500、3800、4000、4200、4500、4800、5000、5500、6000IU/mlのrFVIIを含んでいてもよい。本発明を、6000IU/mlより高い活性を有するrFVII配合物と共に用いてもよいことも

可能である。

【0061】

実施形態2の一態様では、*rFVII*I配合物は、組み換えによって作られた*FVII*Iまたは*BDD*を含む。実施形態2の別の態様では、配合物は、組み換えによって作られた全長*FVII*I、例えば、配列番号1のアミノ酸配列を含む*FVII*I、またはその対立遺伝子改変体を含む。実施形態2の別の態様では、配合物は、*BDD*の変異体または*FL*-*FVII*Iの変異体を含む。

【0062】

この配合物は、糖または糖アルコール(例えば、スクロース)も、0.5重量%～10重量%の範囲で、0.6重量%～10重量%の範囲で、0.7重量%～10重量%の範囲で、0.8重量%～10重量%の範囲で、0.9重量%～10重量%の範囲で、1.0重量%～10重量%の範囲で、0.6重量%～5重量%の範囲で、0.6重量%～2.5重量%の範囲で、0.6重量%～2.0重量%の範囲で、0.6重量%～1.5重量%の範囲で、0.6重量%～1.2重量%の範囲で、0.8重量%～1.2重量%の範囲で、0.9重量%～1.2重量%の範囲で、または0.9重量%～1.1重量%の範囲で、または約0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、または2.0重量%の量で含んでいてもよい。この配合物は、二価のカチオン(例えば、カルシウム塩、例えば、塩化カルシウム)を0.5mM～20mMの範囲で、1mM～10mMの範囲で、1mM～5mMの範囲で、1.5mM～5mMの範囲で、2mM～5mMの範囲で、2.5mM～5mMの範囲で、3mM～5mMの範囲で、3.5mM～5mMの範囲で、4mM～5mMの範囲で、1.5mM～4.5mMの範囲で、1.5mM～4mMの範囲で、1.5mM～3.5mMの範囲で、1.5mM～3mMの範囲で、1.5mM～2.5mMの範囲で、2mM～3mMの範囲で、2.2mM～2.8mMの範囲で、または2.4mM～2.6mMの範囲で含んでいてもよい。この配合物は、塩化ナトリウムまたは塩化カリウムも、10mM～100mMの範囲で、10mM～70mMの範囲で、10mM～50mMの範囲で、15mM～50mMの範囲で、20mM～50mMの範囲で、25mM～50mMの範囲で、30mM～50mMの範囲で、15mM～45mMの範囲で、15mM～40mMの範囲で、15mM～35mMの範囲で、20mM～45mMの範囲で、20mM～40mMの範囲で、25mM～40mMの範囲で、25mM～35mMの範囲で、25mM～30mMの範囲で、または30mM～35mMの範囲で含んでいてもよい。この配合物は、非イオン性界面活性剤、例えば、ポリソルベート20またはポリソルベート80を、50～150ppmの範囲で、60ppm～150ppmの範囲で、70ppm～150ppmの範囲で、80ppm～150ppmの範囲で、60ppm～140ppmの範囲で、60ppm～130ppmの範囲で、60ppm～120ppmの範囲で、60ppm～110ppmの範囲で、60ppm～100ppmの範囲で、60ppm～90ppmの範囲で、70ppm～90ppmの範囲で、70ppm～80ppmの範囲で、80ppm～90ppmの範囲で含んでいてもよい。この組成物は、溶液状態の*rFVII*Iに許容される安定性を与え、アミン残基で活性であるように官能基化されたポリマーを用い、*FVII*Iに対するポリマーの共有結合の間、反応バッファーとして使用することができる。

【0063】

実施形態2の一態様では、本発明は、

(a) 12mM～28mMの範囲、12mM～22mMの範囲、または18mM～22mMの範囲のMOPS；

(b) 100IU/ml～3000IU/mlの範囲、または1000～1500IU/mlの範囲の*FVII*I；

(c) 0.5%～5%の範囲、0.6%～2.5%の範囲、または0.9%～1.1%の範囲のスクロース；

(d) 10mM～50mMの範囲、15mM～35mMの範囲、または25mM～35mMの範囲の塩化ナトリウムまたは塩化カリウム；

10

20

30

40

50

(e) 1 mM ~ 5 mM の範囲、1.5 mM ~ 3.5 mM の範囲、または 2.4 mM ~ 2.6 mM の範囲の二価のカルシウム塩、例えば、塩化カルシウム；および

(f) 60 ppm ~ 100 ppm の範囲、または約 70 ppm ~ 90 ppm の範囲の非イオン性界面活性剤、例えば、ポリソルベート 20 またはポリソルベート 80 を含み、r F V I I I 配合物が、一級アミン基または二級アミン基を含む成分を 10 % 未満、5 % 未満、1 % 未満、0.5 % 未満、または痕跡量未満含むか、または本質的に含まない、r F V I I I 配合物に関する。

【0064】

本発明は、実施形態 2 の r F V I I I 配合物に F V I I I を懸濁または溶解させ、アミン - 反応性ポリマーを加え、得られた混合物を、接合が起こる時間条件および温度条件でインキュベートすることを含む、F V I I I に対し、アミン - 反応性生体適合性ポリマー（例えば、アミン - 反応性 PEG）を接合する方法にも関する。このような状態は、好ましくは、ほぼ周囲温度である。ポリマーを、F V I I I に対して過剰モル量で（1 ~ 100 倍過剰で）加えてよい。ポリマーおよび F V I I I を、回転または攪拌しつつ、一緒に数時間インキュベートすることによって接合してもよい。

【0065】

上の実施形態 2 の配合物は、アミン反応性官能基が関与する重付加中、反応バッファーとして有用であることが示されたが、この配合物が、このような反応からはずれた他の内容で有用であることも推定され、従って、この配合物を、安定な F V I I I 配合物が必要な場合に使用してもよい。

【0066】

（実施形態 3）

実施形態 3 では、r F V I I I 配合物は、NaCl、MOPS、二価のカルシウムイオン、または別の二価のカチオンを含み、非イオン性界面活性剤および / または糖または糖アルコールを含んでいてもよい。実施形態 3 の配合物は、特に、生体適合性ポリマーに接合していない F V I I I 分子、例えば、PEG に共有結合しておらず、野生型 F V I I I 中に存在するグリカン以外の任意のポリマーに共有結合していない F V I I I の凝集が起こらない保存を与えることが示される。実施形態 3 の配合物は、PEG 化されていない BDD に特に適している。本明細書で使用される場合、「接合していない F V I I I 」は、F V I I I が産生する宿主細胞から得られるネイティブ哺乳動物グリコシル化パターンと関係があるグリカン以外のポリマーに接合していない F V I I I を指す。例えば、「接合していない F V I I I 」は、宿主細胞（例えば、BHK 細胞または CHO 細胞、例えば、上市されている KOGENATE（登録商標）および RECOMBINATE（登録商標）F V I I I ）中で組み換えによって作られた野生型ヒト F V I I I を含む。

【0067】

本明細書に記載される組成物の実施形態 3 の一態様は、F V I I I に安定性を与え、塩化ナトリウムを、150 mM ~ 300 mM、150 mM ~ 275 mM、150 mM ~ 250 mM、150 mM ~ 225 mM、150 mM ~ 200 mM、150 mM ~ 175 mM、175 mM ~ 300 mM、175 mM ~ 275 mM、175 mM ~ 250 mM、175 mM ~ 225 mM、175 mM ~ 200 mM、175 mM ~ 190 mM、200 mM ~ 300 mM、200 mM ~ 275 mM、200 mM ~ 250 mM、200 mM ~ 225 mM、200 mM ~ 210 mM、250 mM ~ 300 mM の範囲で、または約 150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、または 300 mM の量で含む組成物である。組成物は、MOPS バッファーも、10 mM ~ 100 mM の範囲で、10 mM ~ 60 mM の範囲で、10 mM ~ 50 mM の範囲で、10 mM ~ 40 mM の範囲で、10 mM ~ 30 mM の範囲で、12 mM ~ 30 mM の範囲で、14 mM ~ 30 mM の範囲で、16 mM ~ 30 mM の範囲で、18 mM ~ 30 mM の範囲で、12 mM ~ 28 mM の範囲で、12 mM ~ 26 mM の範囲で、12 mM ~ 24 mM の範囲で、16 mM ~ 24 mM の範囲で、18 mM ~ 24 mM の範囲で、20 mM ~ 24 mM の範囲で、または 18 mM ~ 22 mM の範囲で含む。組成

10

20

30

40

50

物は、二価のカチオン、例えば、塩化カルシウムも、1 mM～20 mMの範囲で、5 mM～10 mMの範囲で、1 mM～30 mMの範囲で、6 mM～30 mMの範囲で、7 mM～30 mMの範囲で、8 mM～30 mMの範囲で、5 mM～20 mMの範囲で、5 mM～25 mMの範囲で、または9 mM～12 mMの範囲で含む。実施形態3の配合物中に存在するrFVIIの量は、実施形態1で与えられる量と同じであってもよい。

【0068】

組成物は、糖または糖アルコール、例えば、スクロースも、0.5%～10%の範囲で、0.6%～10%の範囲で、0.7%～10%の範囲で、0.8%～10%の範囲で、0.9%～10%の範囲で、1.0%～10%の範囲で、0.5%～5%の範囲で、0.6%～5%の範囲で、0.7%～5%の範囲で、0.8%～5%の範囲で、0.9%～5%の範囲で、1.0%～5%の範囲で、0.5%～2.5%の範囲で、0.6%～2.5%の範囲で、0.5%～2.0%の範囲で、0.5%～1.5%の範囲で、0.6%～1.2%の範囲で、0.8%～1.2%の範囲で、0.9%～1.2%の範囲で、または0.9%～1.1%の範囲で含んでいてもよい。¹⁰ 組成物は、非イオン性界面活性剤、例えば、ポリソルベート80も、20 ppm～250 ppmの範囲で、50 ppm～250 ppmの範囲で、50 ppm～150 ppmの範囲で、60 ppm～150 ppmの範囲で、70 ppm～150 ppmの範囲で、80 ppm～150 ppmの範囲で、60 ppm～140 ppmの範囲で、60 ppm～130 ppmの範囲で、60 ppm～120 ppmの範囲で、60 ppm～110 ppmの範囲で、60 ppm～100 ppmの範囲で、70 ppm～110 ppmの範囲で、70 ppm～105 ppmの範囲で、70 ppm～100 ppmの範囲で、80 ppm～100 ppmの範囲で、または90 ppm～110 ppmの範囲で含んでいてもよい。²⁰

【0069】

実施形態3の特定の態様では、FVIII配合物は、ヒスチジンおよび/または(4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸)('HEPES')および/またはアルブミンを含まないか、または0.1重量%未満、0.5重量%未満、0.8重量%未満、1.0重量%未満、または5.0重量%未満のヒスチジン、および/またはHEPES、および/またはアルブミンを含んでいてもよい。³⁰ 実施形態3の一態様は、ヒスチジン、HEPESおよびアルブミンを本質的に含まないFVIII配合物である。

【0070】

(実施形態4)

ポリマーが接合したFVIII、例えば、PEG化されたFVIIIは、対応する接合していないFVIIIよりも親水性が高いだろう。従って、接合したFVIII、例えば、PEG化されたFVIIIのための配合物は、接合していないFVIIIのために特定されたものとは異なる成分を必要とする場合がある。出願人らは、高いレベルのNaCl(200 mM)を含有するバッファー中、PEG化したFVIIIを調製した。このような高いレベルの塩化ナトリウムは、凍結乾燥中に困難さを与えることが観察された。出願人らは、周囲温度で6日間保存したとき、望ましくない高いレベルのNaClを避け、凝集物の生成を避け、FVIIIの効力を実質的に保持する、ポリマーが接合したFVIIIのための本発明の組成物を開発した。本出願は、塩化ナトリウム濃度を200 mMから50 mMまで減らすことができ、周囲温度で保存した後、依然としてrFVUIの有効性を達成するという予想されない結果を提供する。⁴⁰ 実施形態4では、rFVIII配合物は、バッファー、例えば、ヒスチジンまたはMOPS、NaCl、二価のカルシウムイオンまたは別の二価のカチオンを含み、非イオン性界面活性剤および/または糖または糖アルコールを含んでいてもよい。実施形態4の配合物は、特に、生体適合性ポリマー(特に、PEGのような親水性生体適合性ポリマー)に接合していないFVIII分子の凝集が起こらない保存を与えることが示される。本明細書で使用される場合、「接合したFVIII」は、FVIIIが產生する宿主細胞から得られるネイティブ哺乳動物グリコシリ化パターンと関係があるグリカン以外のポリマーに接合したFVIIIを指す。

【0071】

本明細書に記載される実施形態4の一態様は、塩化ナトリウムを25 mM～200 mMの範囲で、25 mM～175 mMの範囲で、25 mM～150 mMの範囲で、25 mM～125 mMの範囲で、25 mM～100 mMの範囲で、25 mM～75 mMの範囲で、25 mM～50 mMの範囲で、40 mM～55 mMの範囲で、25 mM～35 mMの範囲で、25 mM～30 mMの範囲で、30 mM～60 mMの範囲で、50 mM～200 mMの範囲で、50 mM～175 mMの範囲で、50 mM～150 mMの範囲で、50 mM～125 mMの範囲で、50 mM～100 mMの範囲で、または50 mM～75 mMの範囲で含有するrFVIIIA組成物である。配合物を凍結乾燥させる場合、上に提供されたものからの低いレベルのNaClが好ましい。実施形態4の配合物中に存在するrFVIIIAの量は、実施形態1で提供されるのと同じ値であってもよい。

10

【0072】

組成物は、緩衝剤、例えば、ヒスチジンまたはMOPSバッファーも、10 mM～100 mMの範囲で、10 mM～60 mMの範囲で、10 mM～50 mMの範囲で、10 mM～40 mMの範囲で、10 mM～30 mMの範囲で、12 mM～30 mMの範囲で、14 mM～30 mMの範囲で、16 mM～30 mMの範囲で、18 mM～30 mMの範囲で、12 mM～28 mMの範囲で、12 mM～26 mMの範囲で、12 mM～24 mMの範囲で、16 mM～24 mMの範囲で、18 mM～24 mMの範囲で、20 mM～24 mMの範囲で、または18 mM～22 mMの範囲で含む。組成物は、二価のカチオン、例えば、塩化カルシウムも、1 mM～20 mMの範囲で、5 mM～10 mMの範囲で、1 mM～30 mMの範囲で、6 nM～30 mMの範囲で、7 nM～30 mMの範囲で、8 nM～30 mMの範囲で、5 nM～20 mMの範囲で、5 mM～25 mMの範囲で、または9 mM～12 mMの範囲で含む。

20

【0073】

組成物は、糖または糖アルコール、例えば、スクロースまたはトレハロースも、0.5%～10%の範囲で、0.6%～10%の範囲で、0.7%～10%の範囲で、0.8%～10%の範囲で、0.9%～10%の範囲で、1.0%～10%の範囲で、0.5%～5%の範囲で、0.6%～5%の範囲で、0.7%～5%の範囲で、0.8%～5%の範囲で、0.9%～5%の範囲で、1.0%～5%の範囲で、0.5%～2.5%の範囲で、0.6%～2.5%の範囲で、0.5%～2.0%の範囲で、0.5%～1.5%の範囲で、0.6%～1.2%の範囲で、0.8%～1.2%の範囲で、0.9%～1.2%の範囲で、または0.9%～1.1%の範囲で含んでいてもよい。組成物は、非イオン性界面活性剤、例えば、ポリソルベート80も、20 ppm～250 ppmの範囲で、50 ppm～250 ppmの範囲で、50 ppm～150 ppmの範囲で、60 ppm～150 ppmの範囲で、70 ppm～150 ppmの範囲で、80 ppm～150 ppmの範囲で、60 ppm～140 ppmの範囲で、60 ppm～130 ppmの範囲で、60 ppm～120 ppmの範囲で、60 ppm～110 ppmの範囲で、60 ppm～100 ppmの範囲で、70 ppm～110 ppmの範囲で、70 ppm～105 ppmの範囲で、70 ppm～100 ppmの範囲で、80 ppm～100 ppmの範囲で、または90 ppm～110 ppmの範囲で含んでいてもよい。

30

【0074】

実施形態4の特定の態様では、FVIIIA配合物は、ヒスチジンおよび/またはHESおよび/またはアルブミンを含まないか、または0.1%未満、0.5%未満、0.8%未満、1.0%未満、または5.0重量%未満のヒスチジン、および/またはHES、および/またはアルブミンを含有する。実施形態3の一態様は、ヒスチジン、HESおよびアルブミンを本質的に含まないFVIIIA配合物である。

40

【0075】

(実施形態5)

本発明は、凍結乾燥に適したrFVIIIA配合物も含む。この実施形態の特定の態様では、FVIIIA配合物は、接合されたFVIIIII、PEG化されたFV111、PEG化されたBDD、またはPEG化されたBDD変異体の凍結乾燥に特に適している。この実

50

施形態の r F V I I I 配合物は、(1) 塩化ナトリウム、および／またはスクロース、および／またはトレハロース、(2) グリシンおよび／またはスクロースおよび／またはトレハロース；および(3) 二価のカチオン、例えば、塩化カルシウムを含み、(1) 非イオン性界面活性剤、および／または(2) ヒスチジンを含んでいてもよく、NaCl が存在する場合、限定されないが、スクロースおよび／またはトレハロースを含む糖または糖アルコールも含んでいてもよい。

(0 0 7 6)

本発明は、以下のような実施形態5の配合物を含む。rFVIIIA配合物は、

(a) 約 0 mM、または約 1 mM ~ 約 20 mM、約 1 mM ~ 約 50 mM、約 10 mM ~ 約 50 mM、約 10 mM ~ 約 20 mM、約 10 mM ~ 約 30 mM、または約 20 mM ~ 約 50 mM の範囲のヒスチジン：

(b) 0 . 5 % ~ 2 0 % の範囲、 1 . 0 % ~ 2 0 % の範囲、 0 . 6 % ~ 1 0 % の範囲、
0 . 7 % ~ 1 0 % の範囲、 0 . 8 % ~ 1 0 % の範囲、 0 . 9 % ~ 1 0 % の範囲、 1 . 0 %
~ 1 0 % の範囲、 0 . 5 % ~ 5 % の範囲、 0 . 6 % ~ 5 % の範囲、 0 . 7 % ~ 5 % の範囲
、 0 . 8 % ~ 5 % の範囲、 0 . 9 % ~ 5 % の範囲、 1 . 0 % ~ 5 % の範囲、 0 . 5 % ~ 2
. 5 % の範囲、 0 . 6 % ~ 2 . 5 % の範囲、 0 . 5 % ~ 2 . 0 % の範囲、 0 . 5 % ~ 1 .
5 % の範囲、 0 . 6 % ~ 1 . 4 % の範囲、 0 . 8 % ~ 1 . 4 % の範囲、 0 . 9 % ~ 1 . 2
% の範囲、 3 . 0 % ~ 9 . 0 % の範囲、 5 . 0 % ~ 9 . 0 % の範囲、 6 . 0 % ~ 8 . 0 %
の範囲、 7 . 0 % ~ 9 . 0 % の範囲、 または 0 . 9 % ~ 1 . 1 % の範囲、 または 約 1 . 0
% 、 1 . 1 % 、 1 . 2 % 、 1 . 3 % 、 1 . 4 % 、 1 . 5 % 、 1 . 6 % 、 1 . 7 % 、 1 . 8
% 、 1 . 9 % 、 2 . 0 % 、 3 . 0 % 、 4 . 0 % 、 5 . 0 % 、 6 . 0 % 、 7 . 0 % 、 7 . 5
% 、 8 . 0 % 、 8 . 5 % 、 9 . 0 % 、 9 . 5 % 、 1 0 . 0 % 、 1 2 . 0 % 、 または 1 5 .
0 % のスクロース または トレハロース :

(c) 約 1 mM ~ 約 5 mM、約 1 mM ~ 約 3 mM、約 1 . 5 mM ~ 約 3 . 5 mM、または約 1 mM ~ 約 2 . 5 mM の範囲の二価のカチオン、例えば、二価のカルシウム塩（塩化カルシウムを含む）：

(d) 約 0 mM、または約 10 mM ~ 約 50 mM、約 10 mM ~ 約 40 mM、約 10 mM ~ 約 35 mM、約 10 mM ~ 約 30 mM；約 10 mM ~ 約 20 mM、約 20 mM ~ 約 50 mM、約 20 mM ~ 約 40 mM、または約 20 mM ~ 約 80 mM の範囲の塩化ナトリウム：

(e) 約 0 mM、または約 20 ppm ~ 約 50 ppm、約 20 ppm ~ 約 80 ppm、
約 50 ppm ~ 約 80 ppm、約 80 ppm ~ 約 100 ppm、約 80 ppm ~ 約 200
ppm、または約 50 ppm ~ 約 100 ppm の範囲の非イオン性界面活性剤、または約
60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、
120、125、130、135、140、145、150、160、170、180、
190、または 200 ppm の非イオン性界面活性剤；

(f) 約 0 %、または約 1 . 0 % ~ 約 5 . 0 % の範囲、約 1 . 0 % ~ 約 4 . 0 % の範囲、約 1 . 0 % ~ 約 3 . 0 % の範囲、約 1 . 0 % ~ 約 2 . 0 % の範囲、約 1 . 0 % ~ 約 1 . 5 % の範囲、約 1 . 0 % ~ 約 1 . 4 % の範囲、約 0 . 5 % ~ 約 5 . 0 % の範囲、約 0 . 5 % ~ 約 4 . 0 % の範囲、約 0 . 5 % ~ 約 3 . 0 % の範囲、約 0 . 5 % ~ 約 2 . 0 % の範囲、約 0 . 5 % ~ 約 1 . 5 % の範囲のグリシン、または約 1 . 5 %、1 . 8 %、2 . 0 %、2 . 1 %、2 . 2 %、2 . 3 %、2 . 4 %、2 . 5 %、2 . 6 %、2 . 7 %、2 . 8 %、2 . 9 %、3 . 0 %、3 . 3 %、3 . 5 %、または 4 . 0 % のグリシン、および

(g) 約 100 IU / ml ~ 約 5000 IU / ml、約 100 IU / ml ~ 約 2000 IU / ml、約 100 IU / ml ~ 約 3000 IU / ml、約 100 IU / ml ~ 約 4000 IU / ml、約 100 IU / ml ~ 約 1200 IU / ml、約 250 IU / ml ~ 約 5000 IU / ml、約 250 IU / ml ~ 約 1000 IU / ml、約 250 IU / ml ~ 約 2000 IU / ml、約 250 IU / ml ~ 約 3000 IU / ml、約 500 IU / ml ~ 約 1000 IU / ml、約 500 IU / ml ~ 約 3000 IU / ml、約 1000 IU / ml ~ 約 2000 IU / ml、約 1000 IU / ml ~ 約 3000 IU / ml、約 1000 IU / ml ~ 約 3000 IU / ml、約

1000IU/ml～約4000IU/ml、または約1000IU/ml～約5000IU/mlの範囲、または約100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3500、3800、4000、4200、4500、4600、4800、5000、5500、または6000IU/mlのrFVIIIfを含み；

rFVIIIf配合物は、pHが、約pH6.0～約pH6.5、約pH6.0～約pH7.0、約pH6.0～約pH7.5、約pH6.5～約pH7.5、または約pH7.0～約pH7.5の範囲であるか、またはpHが、約pH6.0、6.5、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4または約pH7.5である。

10

【0077】

実施形態5の一態様では、rFVIIIf配合物は、塩化ナトリウムを含み2.0%未満のスクロースを含有するか、または0.5%～2.0%の範囲のスクロースを含有し、1.0%未満、0.5%未満、0.1%未満のトレハロースを含有するか、またはトレハロースを含有しない。この態様では、NaClは、約10mM～約50mM、約10mM～約40mM、約10mM～約35mM、約10mM～約30mM；約10mM～約20mM、約20mM～約50mM、約20mM～約40mM、または約20mM～約80mMの塩化ナトリウムの範囲で存在してもよい。実施形態5のこの態様では、グリシンは、約1.0%～約5.0%の範囲、約1.0%～約4.0%の範囲、約1.0%～約3.0%の範囲、約1.0%～約2.0%の範囲、約1.0%～約1.5%の範囲、約1.0%～約1.4%の範囲、約0.5%～約5.0%の範囲、約0.5%～約4.0%の範囲、約0.5%～約3.0%の範囲、約0.5%～約2.0%の範囲、約0.5%～約1.5%の範囲で存在するか、または、約1.5%、1.8%、2.0%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3.0%、3.3%、3.5%、または4.0%で存在し、スクロースは、0.5%～5%の範囲、0.6%～5%の範囲、0.7%～5%の範囲、0.8%～5%の範囲、0.9%～5%の範囲、1.0%～5%の範囲、0.5%～2.5%の範囲、0.6%～2.5%の範囲、0.5%～2.0%の範囲、0.5%～1.5%の範囲、0.6%～1.4%の範囲、0.8%～1.4%の範囲、0.9%～1.2%の範囲、または0.9%～1.1%の範囲で存在するか、または、約1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、3.0%、4.0%のスクロースが存在する。実施形態5のこの態様では、ヒスチジンは、約1mM～約20mM、約1mM～約50mM、約10mM～約50mM、約10mM～約20mM、約10mM～約30mM、または約20mM～約50mMの範囲で存在し、非イオン性界面活性剤、例えば、ポリソルベート20またはポリソルベート80は、約20ppm～約50ppm、約20ppm～約80ppm、約50ppm～約80ppm、約80ppm～約100ppm、約80ppm～約200ppm、または約50ppm～約100ppmの非イオン性界面活性剤の範囲で存在するか、または、約60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、160、170、180、190、または200ppmで存在する。実施形態5のこの態様では、トレハロースは、1.0重量%未満、0.5重量%未満、0.1重量%未満存在するか、存在しない。

20

【0078】

実施形態5の別の態様では、塩化ナトリウムは、1.0重量%未満、0.5重量%未満、0.1重量%未満存在するか、または存在しない。この態様では、スクロースまたはトレハロースは、0.5%～20%の範囲、1.0%～20%の範囲、0.6%～10%の範囲、0.7%～10%の範囲、0.8%～10%の範囲、0.9%～10%の範囲、1.0%～10%の範囲、3.0%～9.0%の範囲、%、5.0%～9.0%の範囲、6.0%～8.0%の範囲、または7.0%～9.0%の範囲、または約5.0%、6.0%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、10.0%、また

30

40

50

は 12.0 % で存在する。実施形態 5 のこの態様では、グリシンは、1.0 重量 % 未満、0.5 重量 % 未満、0.1 重量 % 存在するか、または存在しない。

【0079】

本開示の態様は、以下の実施例の観点でさらに理解されてもよく、以下の実施例は、本教示の範囲をいかなる様式にも限定すると解釈すべきではない。

【0080】

[実施例]

[実施例 1]

塩化ナトリウム、ポリソルベート 80 およびヒト血清アルブミンが、BDD-rFVII
I タンパク質の溶解度および安定性に与える影響

10

塩化ナトリウムの影響

FVIIの異なるドメイン間の少なくとの 1 つのジスルフィド結合の生成によって FVII の安定化を可能にするシステイン残基が導入された BDD 変異体について、試験を行った。特に、BDD-SQ (配列番号 3) を Tyr664Cys : Thr1826Cys で変異させ、この実施例で使用する C664-BDD 変異体を作成した。調製方法については、米国特許第 7,928,199 号 (Griffinら) を参照。C664-BDD 変異体を、ヒスチジンを含有するバッファー中で配合し、許容されないレベルの沈殿が観察された。

【0081】

試験を行い、C664-BDD 変異体をヒスチジンバッファーに入れたときに観察された沈殿が逆戻りするかどうかを決定した。沈殿が観察されたバッファー溶液は、20 mM のヒスチジン、30 mM の塩化ナトリウム、2.5 mM の塩化カルシウム、29 mM のスクロース、293 mM のグリシンおよび 80 ppm のポリソルベート 80 を含んでいた。C664-BDD 変異体は、145 IU/ml で存在した。この試験の目的は、BDD-rFVII 変異体を安定化させる配合物を開発することであった。変異体の溶解度を高めるか、またはタンパク質の凝集を減らすことによって安定性を高めるために、可溶化剤および安定化剤、例えば、塩化ナトリウム、ポリソルベート 80 およびヒト血清アルブミン (HSA) を試験した。結果を図 2 ~ 6 に示す。図 2 および図 5 の両方に示される実験は、NaCl 濃度の変更を含んでおり、それぞれの場合の結果は、約 120 mM NaCl を含有する溶液と比較した場合、30 mM NaCl を含有する溶液から、顕著な濁度の低下を示した。この試験は、塩化ナトリウム濃度が増加するにつれて、変異体を含む溶液の濁度が低下することを確立し、このことは、塩化ナトリウムが、沈殿プロセスを逆戻りさせることを示唆している。塩化ナトリウム濃度が 176 mM 以上である場合、濁った溶液が透明溶液に変化し、濁度は、0.169 から 0.029 に低下し、A_{340 nm} 測定に基づいて、80 % を超えている (図 2)。これらの結果は、塩化ナトリウムが、BDD-rFVII 変異体の有効な可溶化剤であり、その沈殿を逆戻りさせることができることを示した。まとめると、塩化ナトリウム濃度が大きくなると、BDD-rFVII 変異体の溶解度が向上した。表 2 は、好ましい配合物を示す。表 2 の「BDD-rFVII 変異体」は、Tyr664Cys : Thr1826Cys で変異した BDD-SQ の配合物を指す。表 2 の「全長 rFVII」は、配列番号 2 のアミノ酸 (全長 FVII) を有する FVII の配合物を指す。

20

30

40

【表1】

表2

全長rFVIIIおよびBDD-rFVIII変異体の配合物組成

組成物	BDD-rFVIII変異体	全長rFVIII
塩化ナトリウム(mM)	220	30
スクロース(mM)	29	29
ヒスチジン(mM)	20	20

10

グリシン(mM)	293	293
塩化カルシウム(mM)	2.5	2.5
ポリソルベート80(ppm)	80	80

20

【0082】

[実施例2]

ランダムリジンカップリングによるrFVIIIP EG化のための配合物の開発

ランダムリジンカップリングを用い、PEGポリマーを、配列番号1の全長rFVII_Iに接合した。この種のカップリングでは、反応性基は、主に、タンパク質中のN末端アミンまたはリジンの-アミノ基である。配合物中の他の一級アミン基または二級アミン基が、反応を妨害するだろう。多くの全長およびBDD-rFVII_I配合物は、アミノ酸、例えば、グリシンおよびヒスチジンを含み、これらの分子のPEG化のために新しい配合物が開発された。グリシンを全長rFVII_I配合物中の増量剤として使用し、PEG化中に除外することができたが、ヒスチジンは、バッファー成分として機能し、別のバッファーと置き換えることが必要であった。

【0083】

適切なバッファー系は、以下の基準を満たす。(1)pH6~7でバッファー能を与える;(2)塩化カルシウム(重要なrFVII_I安定化剤)と不溶性複合体またはキレートを生成しない;および(3)一級アミン基または二級アミン基を含まない。

【0084】

rFVII_IのランダムPEG化のために、いくつかの一般的に使用されるバッファーが考慮された。表3に示されるように、わずか2種類のバッファー系であるトリ-エタノールアミン('TEA')およびMOPSを、さらなる観察のために選択した。

30

【表2】

表3

rFVIIIのランダムPEG化のために考慮されるバッファー

pH7でのバッファー	Ca ²⁺ 沈殿	Ca ²⁺ キレート化	アミン基	凍結中の pH変化
クエン酸		X		
リン酸	X			X

10

20

30

pH7でのバッファー	Ca ²⁺ 沈殿	Ca ²⁺ キレート化	アミン基	凍結中の pH変化
ヒスチジン			X	
トリス			X	
カーボネート	X			
トリエタノールアミン (TEA)				
MOPS または MOPSO				
HEPES			X	

40

【0085】

この試験のために、表4に列挙した配合物に対し、全長rFVIIIIを透析した。3種類の配合物中で透析したrFVIIIIを、40(図7)または25(図8)に置き、促進された状態で安定性を確立し、結果を図7および図8に示す。

【表3】

表4

rFVIIIのランダムPEG化のために評価されたバッファー

	<i>NaCl</i> (mM)	<i>CaCl₂</i> (mM)	<i>Tween 80</i> (ppm)	グリシン (mM)	スクロース (mM)	ナトリウム アジド (%)	緩衝剤 (20mM)
1	30	2.5	80	--	29	0.05	TEA
2	30	2.5	80	--	29	0.05	MOPS
3	30	2.5	80	293	29	0.05	ヒスチジン

【0086】

[実施例3]

BDD-rFVIIのためのPEG化

BDD-rFVII配合物は、その凝集傾向のため、問題がある。従って、PEG化されたrFVIIのための配合物を設計することに伴う目的の1つは、溶液中での安定性を確保することであった。PEG化されたBDD-rFVIIのための作業配合物は、200 mMの塩化ナトリウム、20 mMのMOPS、10 mMのCaCl₂、100 ppmのポリソルベート80および29 mMのスクロースを含んでいた。200 mMの塩化ナトリウムは、凍結乾燥中に困難さを付与するだろう。従って、PEG化されたBDD-rFVIIの溶解度および有効性を、50～250 mMの範囲の塩化ナトリウム濃度の関数として評価した。

【0087】

この試験に使用するためのバッファー組成を表5に示し、データを図10および図11にまとめている。この実施例で使用されるPEG化されたBDDは、PEGが付加される遊離システィンを作成するための1つのアミノ酸突然変異を有する配列番号3のアミノ酸配列を含んでいた。このことは、図9にグラフで示されている。PEG化されたBDD-rFVIIは、50～150 mMの塩化ナトリウムを含む配合物中で、23で6日間保存している間、87%を超える有効性を保持していた。PEG化されていないBDD-rFVIIは、23で6日間保存している間、同じ配合物中で70%の有効性を保持していた。両方の分子がこの試験中可溶性のままであり、沈殿または不透明性の目に見える検出はなかった。これらのデータおよび以前のデータは、100 mMの塩化ナトリウムをさらなる配合物研究のために使用することができることを示唆している。

【表4】

表5

塩化ナトリウムの影響を評価するために使用される配合物の組成

MOPS (mM)	NaCl (mM)	CaCl2 (mM)	ポリソルベート 80 (ppm)	スクロース (mM)
20	250	10	100	29
20	200	10	100	29
20	150	10	100	29
20	100	10	100	29
20	50	10	100	29
20	25	10	100	29
20	0	10	100	29

10

20

30

40

50

【0088】

塩化ナトリウムが、PEG化されたBDD-rFVIIIおよびPEG化されていないBDD-rFVIIIの溶解度および凝集に与える影響を観察した。

【0089】

25 mM、55 mM、75 mM、125 mMおよび200 mMの塩化ナトリウムを含むMOPSバッファー中、PEG化されたBDD-rFVIIIのUV吸収は、試験したすべての塩化ナトリウム濃度で、PEG化されたBDD-rFVIIIの散乱を示さず、このことは凝集がないことを示唆している。対照的に、PEG化されていないrFVIIIは、25 mM、55 mMおよび75 mMの塩化ナトリウムでかなりの散乱を示し、おそらくこれは可溶性凝集物の生成に起因するものであろう。塩化ナトリウム濃度を125 mMおよび200 mMまで上げると、散乱は観察されなかった。従って、塩濃度を高くすると、凝集物の生成が妨げられると結論づけられた。

【0090】

[実施例4]

PEG化されたBDD-rFVIIIのための凍結乾燥配合物の開発

PEG化されたBDD-rFVIIIの凍結乾燥のために、4種類の候補配合物をスクリーニングした。この実施例で使用されるPEG化されたBDDは、PEGが付加される遊離システインを作成するための1つのアミノ酸突然変異を有する配列番号3のアミノ酸配列を含んでいた。その目的は、これらの配合物中の凍結乾燥した薬物製品の安定性を評価することと、重要な安定性試験のための配合物を選択することであった。スクリーニングされた配合物は、(1)PEG化されていない全長rFVIIIについて成功した配合物A、(2)配合物Aと比較して、固体含有量が高い配合物B、(3)配合物Aに使用したNaClの代わりにスクロースを含む配合物C、および(4)配合物Aに使用したNaClの代わりにトレハロースを含む配合物Dであった。最後の2つの配合物は、凍結乾燥した薬物製品のためのアモルファスマトリックスをもたらした。

【0091】

3種類の保存温度(5、25および40)で安定性を評価した。表6は、安定性評価に用いられるPEG化されたBDD-rFVIIIの配合物組成を示す。

【0092】

スクロースおよびグリシンの濃度は、配合物Aで29mMから293mMまで増加し、配合物Bで38mMから346mMまで増加した。凍結乾燥したケーキの機械強度を高め、最終的な薬物製品の外観を向上させるために、さらなる固形分を加えた。

【表5】

表6

安定性評価に使用されるPEG化されたBDD-rFVIIIの配合物組成

10

成分	配合物A	配合物B	配合物C	配合物D
塩化カルシウム	2.5 mM	2.5 mM	2.5 mM	2.5 mM
塩化ナトリウム	30 mM	30 mM	X	X
ヒスチジン	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
グリシン	293 mM	346 mM	X	X
ポリソルベート80	80 ppm	80 ppm	80 ppm	80 ppm
スクロース	29 mM	38 mM	234 mM	X
トレハロース	X	X	X	211 mM
PEG化された BDD-rFVIII の濃度 (IU/mL)	100 IU/mL	100 IU/mL	100 IU/mL	100 IU/mL

1：すべての配合物についてpH=6.8

20

30

40

【0093】

配合物CおよびDは、他の2つの配合物と比較して、代替的なマトリックスを与えるように設計された。配合物AおよびBは、凍結乾燥すると、構造安定性および增量剤としての塩化ナトリウムおよびグリシンの存在に起因して、結晶性マトリックスを生成した。スクロースおよびトレハロースの濃度は、それぞれ、塩化ナトリウムおよびグリシンを含む代わりに、234mMおよび211mMまで増加した。これにより、凍結乾燥した薬物製品のためのアモルファスマトリックスを得た。

【0094】

それぞれの4種類の候補配合物のための安定性プログラムは、26週間に設定された。SEC-HPLCによる有効性、含水量、高分子量(HMW)不純物の割合および製品から放出された不純物の合計によって、安定性を評価した。4種類の配合物のための有効性回収データを図12~15にまとめている。

【0095】

4種類の配合物のためのKarl Fischerによる有効性回収度、含水量のデー

50

タ、およびS E C - H P L C による凝集物の割合および生成物に関連する不純物の合計(26週間に試験した)は、この4種類の配合物でr F V I I I が安定であることを示す。

【0096】

配合物AおよびBを用い、PEG化されたB D D - r F V I I I の安定性をさらに評価した(配合物の組成については、表6を参照)。2つの薬物製品のロットを実験室スケールで調製し、安定性について、5、25および40に置いた。色素生成アッセイによる有効性、S E C - H P L C による高分子量不純物の割合および生成物に関連する不純物の合計、K a r l F i s c h e r による水分を薬物製品の安定性評価に使用した。配合物Aに使用される成分の目標濃度および範囲を表7に示す。

10

【表6】

表7:配合物A使用される成分の目標濃度および範囲

成分	配合物Aの目標濃度	低いところから高いところまでの濃度範囲
塩化カルシウム	2.5 mM	1.5 mMから3.5 mM
塩化ナトリウム	30 mM	21 mMから43 mM
ヒスチジン	20 mM	15 mMから27 mM
グリシン	293 mM	240 mMから386 m μ M
ポリソルベート80	80 ppm	57 ppmから103 ppm
スクロース	29 mM	20 mMから41 mM
PEG化された BDD-rFVIIIの 濃度 (IU/mL)	200 IU/mL 400 IU/mL 1200 IU/mL	188 IU/mLから250 IU/mL 376 IU/mLから500 IU/mL 1128 IU/mLから1500 IU/mL

20

30

【0097】

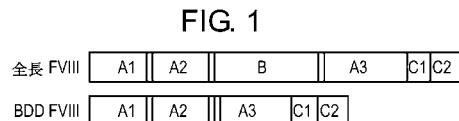
これらのデータは、2つの配合物において匹敵する薬物製品安定性を示した。配合物Aを用いた試験は30ヶ月まで続き、一方、配合物Bを用いた試験は、3ヶ月で終了した(それぞれ、図16および17)。図18および19のr F V I I I 濃度は、400 IU/mLであった。

【0098】

配合物Aをさらなる開発のために選択し、200 IU/mLおよび1200 IU/mLの濃度のPEG化されたr F V I I I を用いて試験した。200 IU/mLおよび1200 IU/mLでの有効性プロフィールを、それぞれ図18および図19に示す。このデータは、配合物Aが、PEG化されたr F V I I I について継続した安定性を与えることを示す。

40

【図1】



【図2】

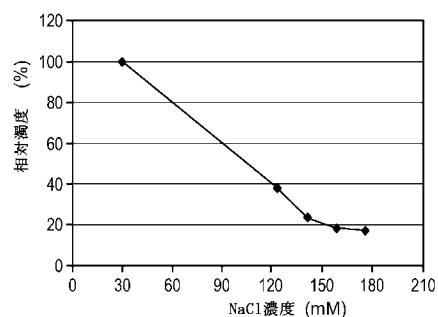


FIG. 2

【図3】

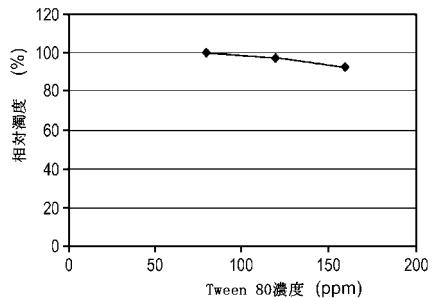


FIG. 3

【図4】

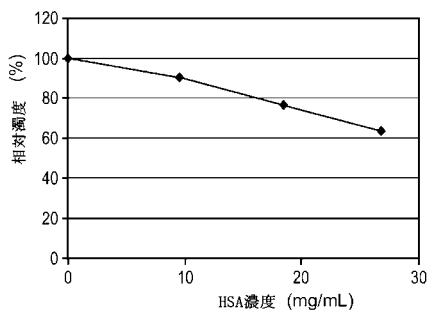


FIG. 4

【図5】

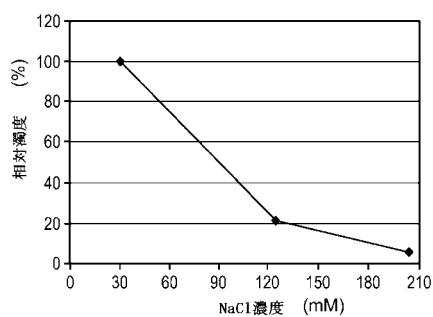


FIG. 5

【図6】

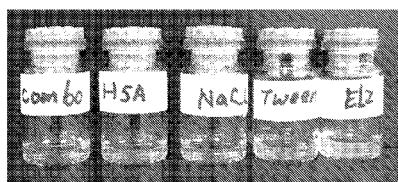


FIG. 6

【図7】

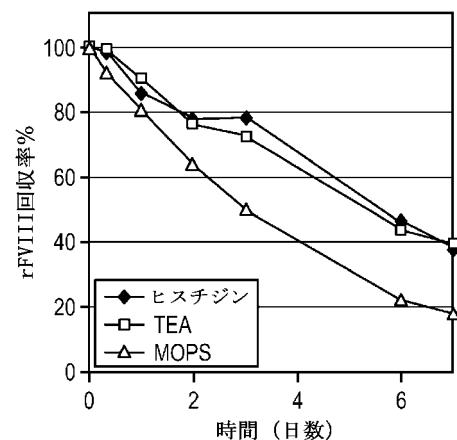


FIG. 7

【図 8】

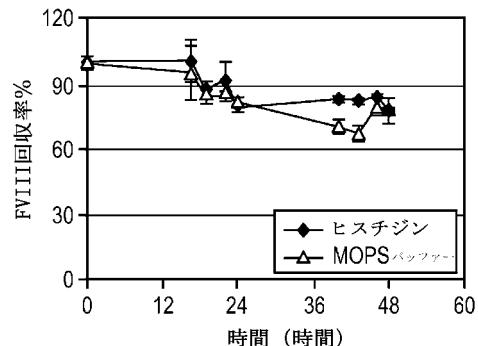


FIG. 8

【図 9】

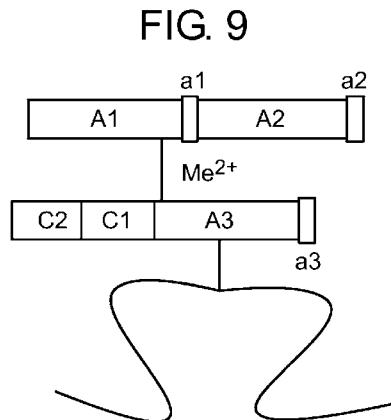


FIG. 9

【図 10】

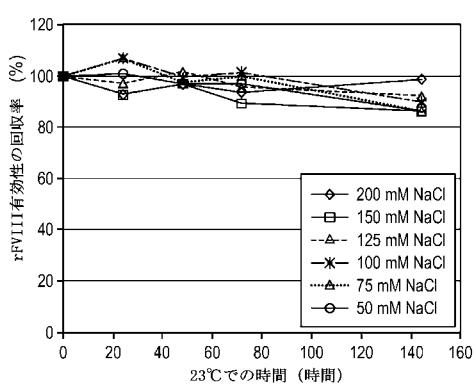


FIG. 10

【図 11】

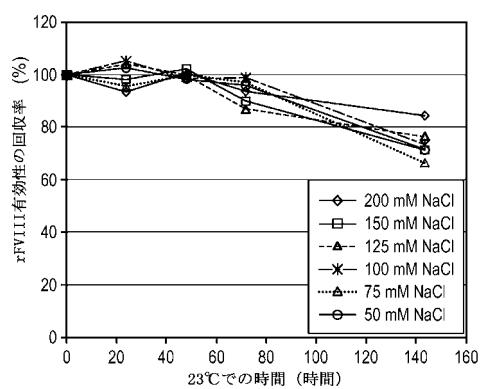


FIG. 11

【図 12】

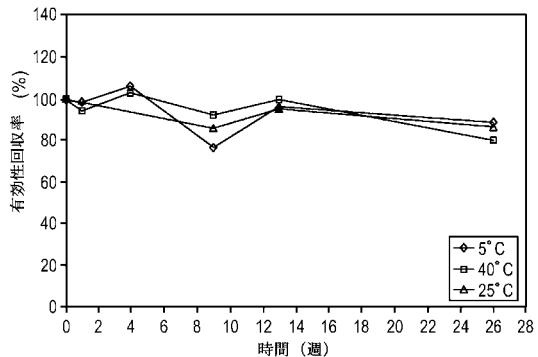


FIG. 12

【図 1 3】

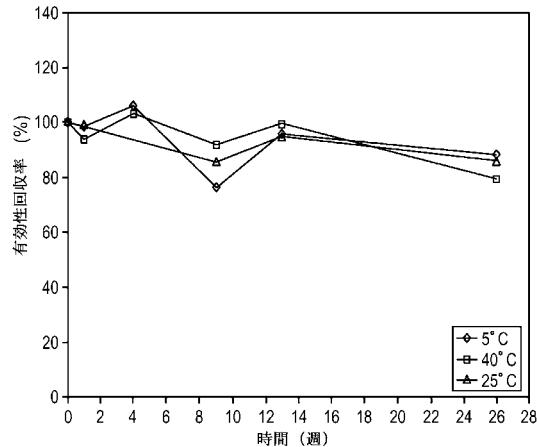


FIG. 13

【図 1 4】

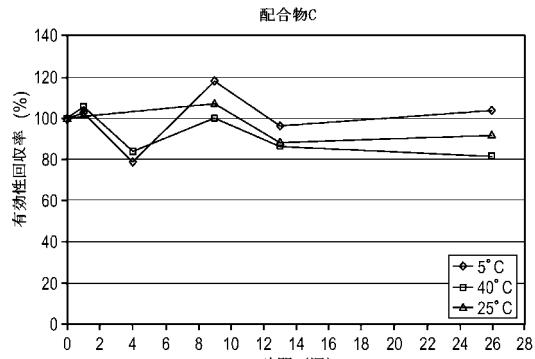


FIG. 14

【図 1 5】

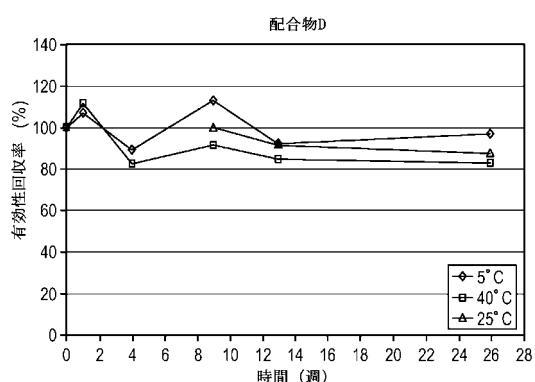


FIG. 15

【図 1 6】

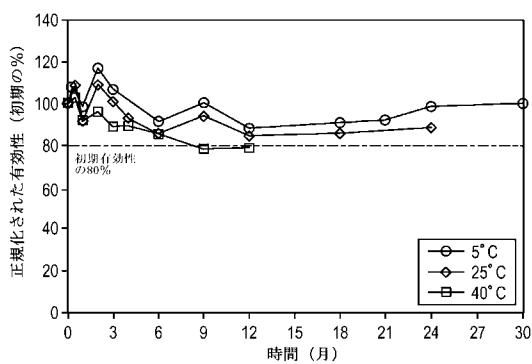


FIG. 16

【図 1 8】

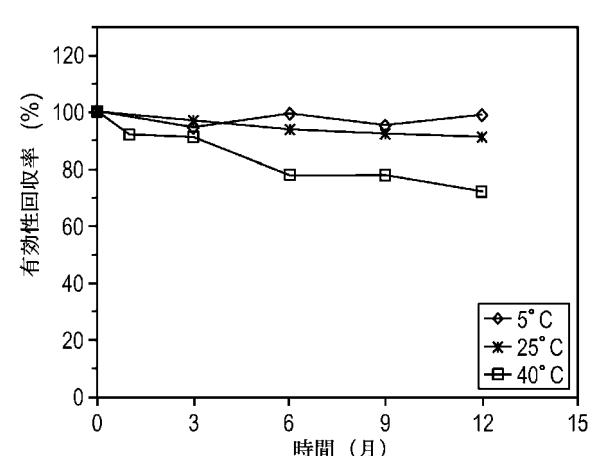


FIG. 18

【図 1 7】

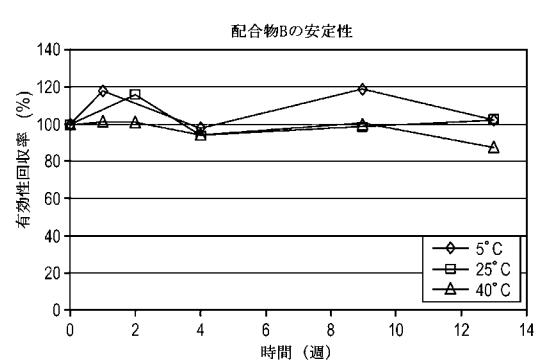


FIG. 17

【 図 1 9 】

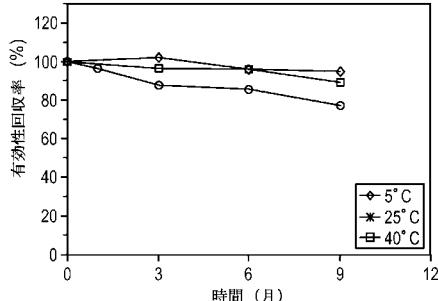


FIG. 19

【 図 20 】

BLX-インが欠損したSQSヒト因子vIII
BLX-アミノ酸配列 須例番号3

1 nqielstcff lcllrrfcfsa trrylgave lswtymqsdsl gelpvdarfp prvkspfpfn
61 tsvykkltf vefthlnri akrrpypng lqptiqavw lswtymqsdsl aspvsphav
1121 grysukaseg aeyddqtsar ekdddkvrg gshlywwav1 kengpmasdp lctlysysh
1181 vdvlkdlnsg ligallvcre gslakektqt lhkrlillfav fdegskwse tksnlsndrd
18301 htvngavms tflatvttm lpgiaghcrk svhyvihmg tppevhvsi1 eightlvnm
rgasleispo tflatvttm dglgoflchc issqhhgdomne evppkvsdope epokmlnne
eedydddtl dsemadvrfd odnsufi1 qii rsvakhkrt wvlyiaae dwyadplvla
1361 pdrsvksey lnngeprigr kykkurfnay tderftkrea iqhesqslgp llygevdotl
1421 llnfklqash yysstvnnner dlasiqsp1 licykesdq rgnomsuksr kvllsfvde
1541 tksdrorlqk rysvlynnner dlasiqsp1 licykesdq rgnomsuksr kvllsfvde
1601 nrswylneni qrlflnpqg qlede fgas nimhsingyy fdslsqslvc1 heaywyls
16661 iqagidt1sv rffsgutfknhk myedt1lf pfaeetvms menglqvlwk chrsdfrrg
1721 malkvssc dkntdyoyed sydisay1 skdysay1 skdysay1 sfsqnpvlk hqreitrtt1
17781 qsdqeuidd otisvskc dfrdydskl qspfrqkrt rhytaavaer lwdglnsspk
1841 hv1rnrasqg svpqfkvvf qeftdgs+tq plrygeleh lgllgpyira evedinimtf
1901 nrasqpf yssllisyedr vrqgeaprk fvknptek fwqfhmnap tkdefdkaw
1961 ayfadvdlek dvhsgip1 lvcnht1np ahqrqvtq falfrt1fde tkswyfenn
erncrapnck qmedptifn yrthaingy1 mdtplylmva qdqrirwyl1 smganenhs
1981 ihfsghvftv rkkeeynkal ynlypgvft vemlpskagi wrveclgeh lhgamsrlf1
1411 ynskctqpf gmasghirdt wapkarihy sgsnawstkh eprsnwkvdi1
1521 tpgarqkts1 ssldkgkwgty rgnstgt1my1 llysofimy
1581 khnirnppli ayrl-lhptw yrsrtlrmne lmgcdnsk3 implmeksti sdaitasssy
16261 ftmifatwsp skarzhlgqr snawrpqnn pkewlqydfq ktmkvgtvt
17321 ykerfls1 qngkvkvfg qgwhdttlf1 qgkxsltsm
17781 qdppfltrv qykerfls1 qngkvkvfg qgwhdttlf1
1841 qdppfltrv ceand1v

FIG. 20

B) ドメインが欠損したSQヒト因子V
アミノ酸配列 配列番号3

【 図 2 1 B 】

111141 qgspkqlys lqeqksyegq nlfseknkvv vqkgerftkdv gllkenvfpss rmfltnldn
111201 hemthnqce kkaqqieekk etliengvvl pahvtgk fmknlflis trvngseye
111261 gayapvlgdf rsndistrt kkhtanfrsk greenstlcwq yactrisptn
111321 sqnfvtqrs krlakqfslp leetalekri ioddstcws kmkhltpt lctidynke
111381 kgatiospls dcltirsplia qanrsplia kussfospri lqylrtrtqf nshlaasy
111441 rkdksgvqes shflqgakk nlslailt mtgdqrevg s lqatsntv ykkvntvp
111501 kdpliptsgk veillqfslp qkdliprtt nspgnhldl egsllqgqk aikwnearnp
111561 gkvpfirvat ssqsktsk1 ldplawdny grtpkewkq fkttkdltts1
111621 nacehnsha ainegnqkne ievtwakqgr vkrkqreast rtllcsanpp vkrkqreast
111681 idyddtisve mkkedfdiy edendspf qkkrtrfyia averlwdyom ssphvlnrn
111741 aqsgspqfk kvrqferfdg stqplryge lnehlglqg yiraavedni mvtfrqasr
111801 pystfysll is veardrgue prknfvpkne tktvfwkvq hmptkrd
111861 dlekdhsgl igipilvchq tlunqfprqy tugeffalpt ifdetksyf tmcnmcra
111921 pcnqmmedpt fkenyrfhai ngymndtlpg lumaqdqrir wylsmgsne
111981 vftvkrekey knialnlyng vfelvetmns kajlwrcel ighlnahms tlvysnkc
112041 qtpmlmasq irdfqjtgq qyngwakla wstqfslp krdlpmi
112101 hqiktogarq kfslsyqf wqyfgrngt tlmvfrgvd sekgknnifn
112161 ppiaryir1 hphysirst lrmeingcdl nsespmgme kalsdaqt assyfntmfa
112221 twpskarhl lqgrsnawp qvnnpkewlq vefqtkmtkt gvttovks1 lrsmykef1
112281 issqdgahn tl-fqngkvk vfgqndqsfv puvsidpp1 ltrylrlnq svwhqdlrm
112341 evqgcaqd1 y

FIG. 21B

図21A
セト因子VIIIアミノ酸配列
配列[番号]

【配列表】2016518321000001.app**【手続補正書】****【提出日】**平成27年2月12日(2015.2.12)**【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】**

r F V I I I 配合物であって、

- (a) 約1 mM～約5 mMの範囲の二価のカチオン；
- (b) 約150 mM～約250 mMの範囲の塩化ナトリウムまたは塩化カリウム；
- (c) 約50 ppm～約200 ppmの範囲の非イオン性界面活性剤；および
- (d) 約100 IU/ml～約5000 IU/mlの範囲のr F V I I I を含み、

少なくとも一対のシステイン残基が野生型F V I I I にはみられないジスルフィド結合を生成するために、r F V I I I は配列番号3のアミノ酸配列中の1つ以上の非システイン残基がシステイン残基と置き換わったアミノ酸配列を含み、

r F V I I I 配合物は、pHが約pH 6.0～約pH 7.5の範囲である、r F V I I I 配合物。

【請求項2】

(a) 約10 mM～約50 mMの範囲のヒスチジン；
(b) 約10 mM～約100 mMの範囲の糖または糖アルコール；および
(c) 約150 mM～約400 mMの範囲のグリシンをさらに含む、請求項1に記載のr F V I I I 配合物。

【請求項3】

r F V I I I 配合物であって、
(a) 10 mM～100 mMの範囲のMOPS；
(b) 0.5重量%～10重量%の糖または糖アルコール；
(c) 0.5 mM～20 mMの範囲の二価のカチオン；
(d) 10 mM～100 mMの範囲の塩化ナトリウムまたは塩化カリウム；
(e) 50～150 ppmの非イオン性界面活性剤；および
(f) 約1000 IU/ml～約1500 IU/mlの範囲のr F V I I I を含み、
r F V I I I 配合物が、r F V I I I 以外の一級アミン基または二級アミン基を有する成分を5.0重量%未満含む、r F V I I I 配合物。

【請求項4】

ヒスチジンおよびグリシンを本質的に含まない、請求項3に記載のr F V I I I 配合物。

【請求項5】

生体適合性ポリマーにr F V I I I を共有結合させるための方法であって、
(a) 請求項3または4に記載のr F V I I I 配合物を得ることと；
(b) r F V I I I 上のアミン基と反応性の化学部分で官能基化されたポリマーを加え、反応混合物を作成することと；
(c) r F V I I I に対するポリマーの共有結合が起こるような時間条件および温度条件で、反応混合物をインキュベートすることとを含む、方法。

【請求項6】

r F V I I I 配合物であって、

- (a) 10 mM～100 mMの範囲のMOPS；

(b) 150 mM ~ 300 mM の範囲の NaCl ;
 (c) 1 mM ~ 20 mM の範囲の二価のカチオン ; および
 (d) 約 100 IU / mL ~ 約 5000 IU / mL の範囲の接合していない rFVII
 I を含む、 rFVII 配合物。

【請求項 7】

(a) 0.5 % ~ 10 % の範囲の糖または糖アルコール ; および
 (b) 20 ppm ~ 250 ppm の範囲の非イオン性界面活性剤をさらに含む、請求項
 6 に記載の rFVII 配合物。

【請求項 8】

rFVII 配合物であって、
 (a) 10 mM ~ 100 mM の範囲の MOPS またはヒスチジン ;
 (b) 25 mM ~ 200 mM の範囲の NaCl ;
 (c) 1 mM ~ 20 mM の範囲の二価のカチオン ; および
 (d) 約 100 IU / mL ~ 約 5000 IU / mL の範囲の接合した rFVII を含
 む、 rFVII 配合物。

【請求項 9】

(a) 0.5 % ~ 10 % の範囲の糖または糖アルコール ; および
 (b) 20 ppm ~ 250 ppm の範囲の非イオン性界面活性剤をさらに含む、請求項
 8 に記載の rFVII 配合物。

【請求項 10】

rFVII 配合物であって、
 (a) 約 0 mM 、または約 1 mM ~ 約 20 mM の範囲のヒスチジン ;
 (b) 0.5 % ~ 20 % の範囲のスクロースまたはトレハロース ;
 (c) 約 1 mM ~ 約 5 mM の範囲の二価のカチオン ;
 (d) 約 0 mM 、または約 10 mM ~ 約 50 mM の範囲の塩化ナトリウム ;
 (e) 約 0 mM 、または約 20 ppm ~ 約 80 ppm の範囲の非イオン性界面活性剤 ;
 (f) 約 0 % 、または約 1.0 % ~ 約 5.0 % の範囲のグリシン、および
 (g) 約 100 IU / mL ~ 約 5000 IU / mL の範囲の接合した rFVII を含
 み ; rFVII 配合物は、 pH が約 pH 6.0 ~ 約 pH 7.5 の範囲である、 rFVII
 配合物。

【請求項 11】

(a) 塩化ナトリウムが、約 10 mM ~ 約 50 mM の範囲で存在し ;
 (b) スクロースが、 0.5 % ~ 2.0 % の範囲で存在し、
 (c) グリシンが、約 1.0 % ~ 約 5.0 % の範囲で存在し、
 (d) ヒスチジンが、約 1 mM ~ 約 20 mM の範囲で存在し、
 (e) 非イオン性界面活性剤が、約 20 ppm ~ 約 80 ppm の範囲で存在する、請求
 項 10 に記載の rFVII 配合物。

【請求項 12】

(a) 塩化ナトリウムが、 1.0 重量 % 未満の量で存在するか、または存在せず ;
 (b) スクロースまたはトレハロースが、 0.5 % ~ 20 % の範囲で存在し、
 (c) グリシンが、 1.0 重量 % 未満の量で存在するか、または存在しない、請求項
 10 に記載の rFVII 配合物。

【請求項 13】

スクロースまたはトレハロースが、 1.0 % ~ 10.0 % の範囲で存在する、請求項
 12 に記載の rFVII 配合物。

【請求項 14】

血友病 A を処置することが必要な患者に、請求項 1、 3、 6、 8 または 10 のいずれか
 一項に記載の治療に有効な量の rFVII 配合物を投与することを含む、血友病 A を処
 置する方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 14/23357
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/755, A61K 38/37, A61P 7/04 (2014.01) USPC - 514/14.1, 530/383 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) USPC - 514/14.1, 530/383 IPC(8) - C07K 14/755, A61K 38/37, A61P 7/04 (2014.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/69.6, 514/13.7		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) ProQuest Dialog; Google Scholar; Google Patents; PatBase; Search terms - Factor VIII or FVIII or rFVIII; recombinant; formulation or pharmaceutical; divalent cation; sodium chloride or NaCl; potassium chloride or KCl; non-ionic surfactant; histidine; sugar or sucrose or trehalose; glycine; MOPS or 3-(N-orpholino) propanesulfonic acid; hemophili		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2012/0121613 A1 (TANG et al.) 17 May 2012 (17.05.2012); para [0026], [0062], [0063], [0028], [0079], [0081], [0057], [0020], [0010], [0069]	1, 14/1 ----- 2, 8-10, 11-13, 14/(8,10)
X Y	US 2012/0083446 A1 (BESMAN ET AL.) 05 April 2012 (05.04.2012); abstract; para [0002], [0014], [0015]; [0022]; [0037], [0048]; [0063], [0064]	6, 7, 14/6 ----- 3-5, 8-10, 11-13, 14/(3,8,10)
Y	US 5,763,401 A (NAYAR) 09 June 1998 (09.06.1998); abstract	2, 11-13
Y	US 2005/0256038 A1 (WHITE et al.) 17 November 2005 (17.11.2005); abstract; para [0039]	3, 4, 5, 14/3
Y	US 2007/0244301 A1 (SEIKMANN ET AL.) 18 October 2007 (18.10.2007); para [0028], [0037]	5
A	LIND et al., Novel forms of B-domain-deleted recombinant factor VIII molecules. Construction and biochemical characterization. Eur. J. Biochem, 15 August 1995, Vol 232, No 1, pp 19-27; FIG 2	1, 14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 application or patent 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 18 May 2014 (18.05.2014)	Date of mailing of the international search report 15 AUG 2014	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10	
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	
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,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,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,H,R,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,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,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

- (74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司
- (74)代理人 100151448
弁理士 青木 孝博
- (74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵
- (74)代理人 100196483
弁理士 川崎 洋祐
- (74)代理人 100185959
弁理士 今藤 敏和
- (74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
- (74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文
- (72)発明者 ワン, デアチエン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94521、コンコード、ウォーター・オーク・コート・4400
- (72)発明者 マー, シンハン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94568、ダブリン、バレンターノ・ドライブ・2511
- (72)発明者 ツヴエトコヴァ, ネリー
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94591、ヴァレーホ、ハップスブルク・クラウン・コート・7305

F ターム(参考) 4C076 AA12 CC14 DD07F DD22 DD23Z DD38 DD51 DD67 EE24Q EE59Q
FF15 FF16 FF43 FF63 GG46
4C084 AA02 AA03 BA01 BA37 BA44 CA53 DC15 MA05 MA17 NA03
NA20 ZA532
4H045 AA30 BA57 CA40 DA66 EA24 FA74