

(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2015-534573

(P2015-534573A)

(43) 公表日 平成27年12月3日 (2015. 12. 3)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/43 (2006. 01)	A 6 1 K 37/465	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/22 (2006. 01)	A 6 1 K 47/22	4 C 0 8 4
A 6 1 K 9/08 (2006. 01)	A 6 1 K 9/08	4 H 0 4 5
A 6 1 P 7/04 (2006. 01)	A 6 1 P 7/04	
C 0 7 K 14/745 (2006. 01)	C 0 7 K 14/745 Z N A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁)		
(21) 出願番号	特願2015-536136 (P2015-536136)	(71) 出願人 511031755
(86) (22) 出願日	平成25年10月10日 (2013. 10. 10)	ノヴォ・ノルディスク・ヘルス・ケア・ア ーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月14日 (2015. 4. 14)	スイス・CH-8050・チューリッヒ・ サーガウアーシュトラッセ・36/38
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/071225	
(87) 国際公開番号	W02014/057069	(74) 代理人 100108453
(87) 国際公開日	平成26年4月17日 (2014. 4. 17)	弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	61/712, 187	(74) 代理人 100110364
(32) 優先日	平成24年10月10日 (2012. 10. 10)	弁理士 実広 信哉
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人 100133400
(31) 優先権主張番号	61/790, 957	弁理士 阿部 達彦
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013. 3. 15)	(72) 発明者
(33) 優先権主張国	米国 (US)	ブラフル・エス・ガンディ
(31) 優先権主張番号	13159833. 6	デンマーク・DK-2880・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／エス
(32) 優先日	平成25年3月18日 (2013. 3. 18)	最終頁に続く
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	

(54) 【発明の名称】 第VII因子ポリペプチドの液体医薬組成物

(57) 【要約】

本発明は、第VIIa因子ポリペプチドと、pHを約5.5～約8.5の範囲に保持するのに適した緩衝剤と；(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩；(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩；および(S)形と(R)形の混合物または薬学的に許容されるその塩の群から選択される活性部位安定化剤とを含む液体水性医薬組成物に関する。本発明はさらに、第VII因子応答性出血性障害を治療するための前記組成物；液体組成物を調製し、第VIIa因子を液体水性組成物中で安定化させるための方法；液体水性医薬組成物および任意選択で不活性ガスを含む気密容器；ならびに患者における第VII因子応答性出血性障害を治療する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第VIIa因子ポリペプチドと、
pHを約5.5～約8.5の範囲に保持するのに適した緩衝剤と、
(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式I)または薬学的に許容されるその塩、
(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式II)または薬学的に許容されるその塩、および
(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩と(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩の混合物の群から選択される活性部位安定化剤とを含む液体医薬組成物。

10

【請求項 2】

前記活性部位安定化剤が、
(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩である、請求項1に記載の組成物。

20

【請求項 3】

前記活性部位安定化剤が、第VIIa因子の濃度に対して5.5～100 μ M、5.5～50 μ M、5.5～30 μ M、5.5～10 μ M、6～50 μ M、6～30 μ Mまたは6～10 μ M過剰に存在する、または前記活性部位安定化剤が、第VIIa因子の濃度に対して20 μ M以上、30 μ M以上、40 μ M以上または50 μ M以上過剰に存在する、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項 4】

前記活性部位安定化剤とFVIIaポリペプチドのモル比([活性部位安定化剤]:[FVIIa])が、1.25～1.75、1.5または1.75の範囲である、請求項1から3のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 5】

前記第VII因子ポリペプチドが、約0.3～200mg/mL、約0.3～120mg/mL、約0.5～100mg/mL、約0.5～20mg/mL、約1～10mg/mL、約1～5.5mg/mL、約2～20mg/mL、約2～15mg/mL、約2～10mg/mLもしくは約2～5.5mg/mLまたは約2mg/mLもしくは約5mg/mLの濃度で存在する、請求項1から4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

6.0～8.5、6.0～7.5、6.5～7.5、7.0～7.5、6.5～7.0または6.7～6.9のpH値を有する、請求項1から5のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

製剤が、酸化防止剤、等張性調節剤、界面活性剤の1つまたは複数を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 8】

前記第VII因子ポリペプチドが、ヒト第VIIa因子、組み換え型ヒト第VIIa因子または無血清組み換え型ヒトFVIIaである、請求項1から7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記第VII因子ポリペプチドが、第VII因子配列変形体または第VII因子誘導体である、請求項1から7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

そうした治療を必要とする患者における第VII因子応答性出血性障害を治療する方法であって、前記患者に治療有効量の請求項1から9のいずれか一項に記載の液体医薬組成物お

50

よび薬学的に許容される担体を投与する工程を含む方法。

【請求項 1 1】

第VII因子応答性出血性障害の治療のための、請求項1から9に記載の液体医薬組成物。

【請求項 1 2】

請求項1から9に記載の液体医薬組成物を調製する方法であって、
pHを約5.5～約8.5の範囲に保持するのに適した緩衝剤および2-[2-[5-(5-カルバムイミド
イル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニ
ル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩である活性部位安
定化剤を含む溶液中に、第VIIa因子ポリペプチドを供給する工程を含む方法。

【請求項 1 3】

液体水性組成物中の第VIIa因子を安定化させる方法であって、
pHを約5.5～約8.5の範囲に保持するのに適した緩衝剤および2-[2-[5-(5-カルバムイミド
イル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニ
ル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩である活性部位安
定化剤を含む溶液中に、第VIIa因子ポリペプチドを供給する工程を含む方法。

【請求項 1 4】

請求項1から9に記載の液体水性医薬組成物および任意選択で不活性ガスを含む気密容器
。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、第VII(a)因子ポリペプチドを含む液体水性医薬組成物；そうした組成物を調
製し使用する方法；そうした組成物を含む容器および第VII(a)因子応答性障害の治療のた
めのそうした組成物の使用に関する。より特別には、本発明は、タンパク質分解性の化学
的および/または物理的分解に対して安定化された液体組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

血液凝固第VIIa因子(FVIIa)は、血友病A、血友病B、グランツマン血小板無力症およびF
VII(a)欠乏症などの、血液凝固障害の治療のための重要な治療剤であることが証明されて
いる。

【0003】

現在市販されている組み換え型第VIIa因子製剤NovoSevenRT(登録商標)(Novo Nordisk A
/S社、Denmark)は、組み換え型ヒト第VIIa因子、NaCl、CaCl₂(2H₂O)、GlyGly、ポリソル
ベート80、スクロースおよびマンニトールのフリーズドライケーキを含むバイアルとして
提供されている。この製品は、使用直前にヒスチジン緩衝剤でpH6.0に再構成され、それ
によって得られる溶液中に1.0mg/mLのFVIIa濃度がもたらされる。

【0004】

製造されたタンパク薬物を液体中に保持するか、またはそれをフリーズドライするかど
うかの決定は、通常、そうした2つの形態でのタンパク質の安定性をもとにしてなされる
。タンパク質安定性は、イオン強度、pH、温度、凍結および融解の繰り返しサイクル、せん
断力への曝露ならびにそのタンパク質自体の特性などの因子によって影響され得る。活
性タンパク質の一部は、変性および凝集(可溶性凝集体形成と不溶性凝集体形成の両方)を
もたらす物理的不安定性、ならびに、ほんの少し挙げると、例えば加水分解、脱アミドお
よび酸化をもたらす化学的不安定性の結果として、失われる可能性がある。

【0005】

タンパク質の不安定性の発生は広く理解されているが、特定のタンパク質の具体的な不
安定性関連の問題を解決するため何が有効な方法であるかを予測することはほぼ不可能で
ある。不安定性は、より低い活性、高い毒性および/または高い免疫原性を有するタンパ
ク質の副生成物または誘導体の形成をもたらす可能性がある。さらに、N末端中の特定の
グルタミン酸残基のカルボキシル化または炭水化物側鎖の付加などの翻訳後修飾は、貯

10

20

30

40

50

蔵の間の修飾に関する潜在的部位を提供する。

【0006】

しかし、第VIIa因子ポリペプチドなどのセリンプロテアーゼの液体製剤は、それらが、それら自体の触媒作用のための基質である(生物学的な酵素と基質の両方である)ことによって自己タンパク分解による分解を受けるので、明らかな安定性の懸念を引き起こす。

【0007】

FVIIaポリペプチドは、同じ製剤中の他のFVIIaポリペプチドを容易に切断し、それらを不活性にするので、FVIIaポリペプチドなどのプロテアーゼを製剤化することは、製薬産業にとって大きな課題である。液体製剤では、FVIIaポリペプチドは数時間以内に自己分解する可能性があり、FVIIaポリペプチドの濃度が高い場合、この問題は特に重大である。したがって、FVIIaポリペプチドの液体製剤を創製する場合、自己分解は克服すべき最も大きな障害である。

10

【0008】

任意のタンパク質組成物の安全性および有効性は、その安定性と直接関係している。分子運動の潜在性が非常に高く、したがって分子間相互作用の可能性が高いため、液体中でのタンパク質の安定性を維持することは、その凍結乾燥形態での安定性を維持するのに用いられるアプローチとは異なるアプローチを必要とする。濃厚溶液での安定性を維持することは、高いタンパク質濃度での凝集体形成および大きいタンパク質間相互作用の傾向があるため、別個の課題を構成する。

20

【0009】

液体組成物を開発する場合、多くの因子が考慮される。短期間(6か月未満)の液体安定性を得るには、一般に、変性および凝集などの著しい構造変化を回避することが必要である。これらのプロセスは多くのタンパク質について文献に記載されており、多くの安定化剤の例が存在する。1つのタンパク質を安定化させるのに有効な薬剤が、実際に別のタンパク質を不安定化させるように作用することは良く知られている。タンパク質が、巨視的構造変化に対して安定化されていたら、長期安定性(例えば、6か月超)のための液体組成物の開発は、タンパク質に特異的なタイプの分解に対して、そのタンパク質をさらに安定化させることに依存する。より特異的なタイプの分解には、例えばジスルフィド結合スクランブル化、特定の残基の酸化、脱アミドおよび環化が含まれる。個々の分解種を正確に指摘することが必ずしも可能であるとは限らないが、着目したタンパク質を独自に安定化させる特定の添加剤の能力をモニターするために、繊細な変化をモニターするアッセイが開発されている。

30

【0010】

液体組成物のpHならびにイオン強度は、注射/注入に生理学的に適した範囲にあることが追加的に必要である。

【0011】

第VIIa因子は、いくつかの分解経路、特に自己タンパク質分解性切断(ペプチド骨格のクリッピングまたは「重鎖分解」、凝集(二量体、オリゴマーおよび多量体形態の形成)および酸化を受ける。さらに、沈澱および脱アミドが起こる可能性がある。これらの反応の多くは、タンパク質から水を除去することによって大幅に遅延させることができる。

40

【0012】

しかし、注射する直前に適切な液体(例えば、WFIまたは緩衝液)で再構成されるフリーズドライケーキより、保持された液体製剤の使用に伴ういくつかの利点がある。最も顕著には、保持された液体は、フリーズドライした製品よりずっと好都合である。第VIIa因子ポリペプチドの液体組成物の開発は、再構成の誤差を排除し、したがって投薬精度を向上させる可能性があり;また、その製品の使用を臨床的に簡略化し、それによって患者の薬剤服用順守を増進させる可能性がある。一般に、より高度に濃縮された溶液は、より小さい体積での投与を可能にする。これは、静脈内以外の方経口投与の機会を提供する可能性がある。したがって、液体組成物は、投与および使用のしやすさに関して、フリーズドライ製品より優れた多くの利点を有することができる。

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】WO2005016365(Novo Nordisk Health Care AG社)

【特許文献2】欧州特許第1299354号(Aventis社)

【特許文献3】WO2004050637(Pharmacyclics社)

【特許文献4】WO01/83725

【特許文献5】WO02/22776

【特許文献6】WO02/077218

【特許文献7】WO03/027147

10

【特許文献8】WO03/037932

【特許文献9】WO04/029090

【特許文献10】WO05/024006

【特許文献11】欧州特許第05108713.8号

【特許文献12】米国特許出願公開第7173000B2号

【特許文献13】日本国特許4451514B2号

【特許文献14】WO03/031464

【特許文献15】WO04/099231

【特許文献16】米国特許第6903069号

【特許文献17】欧州特許第0200421号(ZymoGenetics、Inc.社)

20

【特許文献18】Thomas、米国特許第4,456,591号

【特許文献19】米国特許第7,479,502B2号(2004年6月17日にWO2004/050637として公開)、第111段、8～15行、実施例17(第109～113段)

【特許文献20】WO2005/118554(2005年12月15日公開)、36～54頁の実施例、実施例1および2(48～54頁)

【特許文献21】米国特許出願公開第2008/0275250A1号、16～23頁

【特許文献22】米国特許出願公開第2008/0275250号

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986年;83:2412～2416頁

30

【非特許文献2】Perssonら、J. Biol. Chem. 272:19919～19924頁、1997年

【非特許文献3】Persson、FEBS Letts. 413:359～363頁、1997年

【非特許文献4】Hagenら、Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83:2412～2416頁、1986年

【非特許文献5】Broze and Majerus、J.Biol.Chem. 255(4):1242～1247頁、1980年

【非特許文献6】Hedner and Kisiel、J.Clin.Invest. 71:1836～1841頁、1983年

【非特許文献7】Bjoernら(Research Disclosure、269、1986年9月、564～565頁)

【非特許文献8】Cunningham and Wells、1989年、Science 244:1081～1085頁

【非特許文献9】de Vosら、1992年、Science 255: 306～312頁

【非特許文献10】Smithら、1992年、Journal of Molecular Biology 224:899～904頁

【非特許文献11】Wlodaverら、1992年、FEBS Letters 309:59～64頁

40

【非特許文献12】Wakabayashiら、J. Biol. Chem. 261:11097頁、1986年

【非特許文献13】Thimら、Biochem. 27:7785頁、1988年

【非特許文献14】Scopes, Protein Purification、Springer-Verlag、New York、1982年

【非特許文献15】Protein Purification、J.C. Janson and Lars Ryden、editors、VCH Publishers、New York、1989年

【非特許文献16】Osterudら、Biochem. 11:2853頁(1972)

【非特許文献17】Hednerら、J. Clin. Invest. 71:1836頁(1983)

【非特許文献18】Bi L、Sarkar R、Naas T、Lawler AM、Pain J、Shumaker SLら、Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RN

50

A and protein studies. Blood 1996年;88:3446 ~

【非特許文献 1 9】Elm T; Karpf DM; Ovlisen K; Pelzer H; Ezban M; Kjalke M; Tranholm M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new recombinant FVIII (N8) in haemophilia A mice. Haemophilia、2012年;18 (1)、139 ~ 145頁

【非特許文献 2 0】Leslie and Powell、NATO Science Series、245、41 ~ 51頁(2007)

【非特許文献 2 1】Pottertonら、Acta Crystallogr. D59、1131 ~ 1137頁(2003)

【非特許文献 2 2】Vagin and Teplyakov、J. Appl. Cryst. 30、1022 ~ 1025頁(1997)

【非特許文献 2 3】Bannerら(Nature 380、41 ~ 46頁(1996)

【非特許文献 2 4】Murshudovら、Acta Crystallogr. D53、240 ~ 255頁(1997)

【非特許文献 2 5】Emsleyら、Acta Crystallogr. D66、486 ~ 501頁(2010)

【非特許文献 2 6】Cruickshank、Acta Crystallogr. D55、583 ~ 601頁(1999)

【非特許文献 2 7】Engh and Huber、Acta Crystallogr. A47、392 ~ 400頁(1991)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

現在、液体製剤化FVIIa製品は市販されていない。本発明の目的は、貯蔵と送達の両方に適しており、化学的および/または物理的分解生成物の量が生理学的に許容される液体第VIIa因子ポリペプチド医薬組成物を提供することである。

【0016】

WO2005016365(Novo Nordisk Health Care AG社)は、第VIIa因子ポリペプチドと、pHを4 ~ 9の範囲に保持するのに適した緩衝剤と、-C(=NZ1R1)(-NZ2R2)モチーフを含む少なくとも1つの安定化剤と、を含む液体水性医薬組成物に関するものである。

【0017】

欧州特許第1299354号(Aventis社)は、例えば循環器疾患の治療における血液凝固または炎症反応を阻止するまたは低減させるための第VIIa因子の阻害剤として有用であるとされている尿素およびチオ尿素誘導体を記載している。

【0018】

WO2004050637(Pharmacoclics社)は、血栓塞栓性障害、癌または関節リウマチを治療または防止するための第VIIa因子を含むセリンプロテアーゼの阻害剤として有用であるとされているベンゾイミダゾール-5-カルボキサミジン誘導体を記載している。

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明者らは、改善された安定性を示す第VII(a)因子ポリペプチドの液体医薬組成物を作り出した。これらの組成物では、第VIIa因子ポリペプチドを：

(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸;(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸;および(S)形と(R)形の混合物の群から選択される活性部位安定化剤で製剤化する。

【0020】

したがって、本発明の1つの態様は、第VIIa因子ポリペプチドと、pHを約5.5 ~ 約8.5の範囲に保持するのに適した緩衝剤と;

2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩である活性部位安定化剤と、を含む液体水性医薬組成物に関する。

【0021】

他の態様では、本発明は、第VII因子応答性出血性障害の治療のための、第VIIa因子ポリペプチドと、pHを約5.5 ~ 約8.5の範囲に保持するのに適した緩衝剤と;

2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容され

10

20

30

40

50

るその塩である活性部位安定化剤と、を含む液体医薬組成物に関する。

【0022】

他の態様では、本発明は、液体組成物を調製するための方法であって、pHを約5.5～約8.5の範囲に保持するのに適した緩衝剤および2-[2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩である活性部位安定化剤を含む溶液中に、第VIIa因子ポリペプチドを供給する工程を含む方法に関する。

【0023】

他の態様では、本発明は、液体水性組成物中の第VIIa因子を安定化させる方法であって、pHを約5.5～約8.5の範囲に保持するのに適した緩衝剤および2-[2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩である活性部位安定化剤を含む溶液中に、第VIIa因子ポリペプチドを供給する工程を含む方法に関する。

【0024】

他の態様では、本発明は、本発明の液体水性医薬組成物および任意選択で不活性ガスを含む気密容器に関する。

【0025】

他の態様では、本発明は、そうした治療を必要とする患者における第VII因子応答性出血性障害を治療する方法であって、その患者に治療有効量の上記の液体医薬組成物および薬学的に許容される担体を投与する工程を含む方法に関する。

【発明を実施するための形態】

【0026】

第VIIa因子は、自己タンパク質分解特性を有するセリンプロテアーゼである。すなわち自己分解によって分解を受ける。特に、アミノ酸残基315と316の間および290と291の間のペプチド結合は、溶液中での貯蔵の間に容易に切断される(番号付けはヒト野生型FVIIaの配列、配列番号1を参照する)。この切断は「重鎖分解」と称される。第VIIa因子はpH7.5でその酵素的最適条件を有し、5.5未満のpHで低い活性を有する。

【0027】

自己分解切断の他に、第VIIa因子は、いくつかの全般的分解経路、特に凝集(二量体、オリゴマーおよび多量体形態の形成)、脱アミドおよび酸化を受ける。

【0028】

液体組成物中でのFVIIaの製剤化は、特に自己タンパク質分解特性のため困難である。しかし、溶液でFVIIaを貯蔵する場合、追加的でより全般的な分解経路も考慮に入れるべきである。例えば、酸化は、酸化防止剤を含有させる、あるいは窒素または不活性ガスのオーバーレイにより酸素分圧を低下させることによって対処する必要がある。

【0029】

液体組成物中におけるFVIIaの自己タンパク質分解性切断を防止する1つの方法は、FVIIaを含む溶液に、FVIIa阻害剤の形態の活性部位安定化剤を導入することによる活性部位の非共有結合性阻害によるものである。しかし、そうした活性部位安定化剤が注射後にFVIIa分子から放出され、それによって活性FVIIaが血流中に放出されなければならない。さらに、活性部位安定化剤は望ましい安全性プロファイルを有する濃度で存在すべきであり、好ましくは投与レジメンで投与された濃度で本質的に生物学的影響がないようにすべきである(添加剤のための特徴として)。

【0030】

(i)FVIIa分子の安定性を維持する(自己タンパク質分解および全般的なタンパク質分解を最少化する)、および
(ii)FVIIa分子の生物活性を維持する(結合した活性部位安定化剤をもたないFVIIaと同様のPK値を含む生物活性を保持する)、および
(iii)活性部位安定化剤の適切な安全性プロファイルを確実にする(この薬剤はそれ自体生物学的に活性な分子であるということを留意する)

10

20

30

40

50

という所望の液体組成物概念を満たすFVIIa活性部位安定化剤を特定し導入することが非常に望ましい。

【0031】

したがって、3つのすべての「因子」をバランスさせる、すなわち活性部位安定化剤のFVIIa安定性、FVIIa生物活性および安全性を同時に最適化する活性部位安定化剤を特定することに大きな課題がある。

【0032】

したがって、以下の条件、すなわち：

- a) (活性部位安定化剤の)非毒性濃度で、十分に小さい解離定数でFVIIaと結合して(「強い結合」、FVIIa組成物をバイアル中で貯蔵した場合に、遊離FVIIa形と結合FVIIa形(FVIIa+活性部位安定化剤 FVIIa: 活性部位安定化剤)との間の平衡を、完全な複合体を形成させる方へシフトさせ、
- b) インビボで注射した場合、同じ所与の濃度および解離定数でFVIIaを放出する、すなわち平衡を遊離形態のFVIIaと活性部位安定化剤の方へシフトさせる、
- という条件を満たす活性部位安定化剤(すなわち、FVIIa酵素活性の阻害剤)を特定し導入することが非常に望ましい。

10

【0033】

生化学および薬理学において、解離定数(K_d)は、非共有結合性の力で一緒に結合している2つの分子がその成分分子に分裂する場合のように、より大きい種がより小さい成分に可逆的に分離する(解離する)傾向を測る特殊なタイプの平衡定数である。解離定数は、会合定数(結合定数)の逆数である。

20

【0034】

解離定数はタンパク質-阻害剤複合体の解離定数 $K_i=[P][I]/[C]$ であり、ここで[P]、[I]および[C]はそれぞれタンパク質、阻害剤および複合体のモル濃度を表す。 K_i は、リガンド(L)とタンパク質(P)の間の親和性、すなわち、あるリガンドが特定のタンパク質といかに固く結合しているかを説明するのに通常用いられる。リガンドとタンパク質の親和性は、水素結合、静電相互作用、疎水性力およびファン・デル・ワールス力など、2つの分子間の非共有結合性分子間相互作用によって影響を受ける。これらは、高濃度の他の高分子によっても影響を受ける可能性がある。

【0035】

30

リガンド-タンパク質複合体(C)の形成は、2状態プロセス $C \rightleftharpoons P+L$ で説明することができる。対応する解離定数は $K_d=[P][L]/[C]$ と定義される。ここで、[P]、[L]および[C]は、それぞれタンパク質、リガンドおよび複合体のモル濃度を表す。解離定数はモル単位(M)を有する。 K_d は、そこでタンパク質分子の半分がリガンドと結合しているリガンドの濃度、例えば、結合したリガンドをもつタンパク質の濃度[C]が、結合したリガンドをもたないタンパク質の濃度[P]と等しいリガンドの濃度に相当する。解離定数が小さければ小さいほど、リガンドはより固く結合している、または、リガンドとタンパク質の間の親和性はより高い。例えば、ナノモル(nM)の解離定数を有するリガンドは、マイクロモル(M)の解離定数を有するリガンドより、特定のタンパク質と固く結合している。

【0036】

40

さらに、投与されるFVIIaの濃度は、例えば成人におけるi.v.注射のために、1~20mL、好ましくは1~5mL、また、さらには2~3mLの体積など、所与の投与経路に望ましい体積での血友病のための有効用量の投与を可能にする濃度でなければならない。

【0037】

そのまま使用できる製剤の貯蔵温度は、2~45 °Cの間で変動してよい。特に、例えば20 °C以上の貯蔵温度で、安定な液体製剤をいかに作製するかという問題がさらに高まる。

【0038】

本発明は、第VIIa因子ポリペプチドを含む新規な安定した液体水性医薬組成物の開発にある。より具体的には、その液体水性医薬組成物は：

(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキ

50

シ-5'-スルファモイル-ビフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸;(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ビフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸;(S)形と(R)形の混合物;および薬学的に許容されるその塩の群から選択される活性部位安定化剤を含む。

【0039】

これらの活性部位安定化剤は、20℃以上の貯蔵温度でも1ヵ月以上、FVIIaの液体製剤のための非共有結合性安定化剤についての上記の要件を満たす。

【0040】

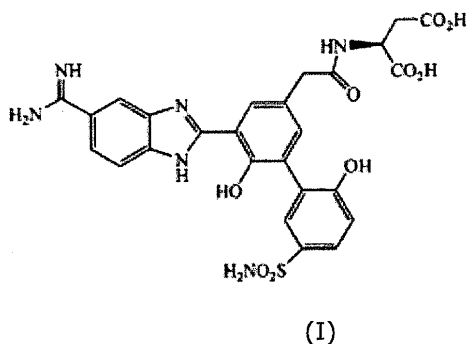
活性部位安定化剤

本発明の一実施形態では、活性部位安定化剤は、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ビフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式I)または薬学的に許容されるその塩である。

10

【0041】

【化1】



20

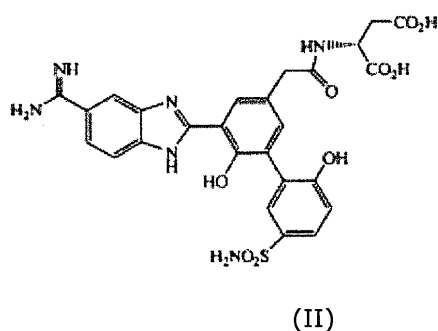
【0042】

他の実施形態では、活性部位安定化剤は(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ビフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式II)または薬学的に許容されるその塩である。

【0043】

30

【化2】



40

【0044】

さらに他の実施形態では、活性部位安定化剤は、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ビフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩と(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ビフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩の混合物である。

【0045】

薬学的に許容される塩には、存在する酸性または塩基性の基の塩が含まれる。薬学的に

50

許容される酸付加塩には、これらに限定されないが、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、過リン酸塩、酢酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、パントテン酸塩、重酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、サッカラート、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩およびp-トルエンスルホン酸塩が含まれる。

【0046】

適切な塩基の塩には、これらに限定されないが、カルシウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウムおよびマンガンの塩が含まれる。

【0047】

活性部位安定化剤の濃度は、組成物中の第VIIa因子の所望濃度([FVIIa])に依存する。活性部位安定化剤は、好ましくは、第VIIa因子に対してわずかに過剰に存在すべきである。安定化剤の望ましくない副次的な悪影響を回避するために、限られた過剰度の活性部位安定化剤が望ましい。したがって、活性部位安定化剤は、第VIIa因子濃度に対して5 μ M超過剰に組成物中に存在すべきである。すなわち、

[活性部位安定化剤] [FVIIa]+5 μ M

である。

【0048】

活性部位安定化剤の濃度は、好ましくは、存在するFVIIaの濃度の2.5倍を超えるべきではない。

【0049】

異なる実施形態では、活性部位安定化剤は、第VIIa因子の濃度に対して、5.5~100 μ M、6~100 μ M、6~75 μ M、6~50 μ M、6~30 μ M、6~10 μ M、10~100 μ M、10~75 μ M、10~50 μ M、10~30 μ M、30~50 μ Mまたは20~40 μ M過剰に存在する、または、活性部位安定化剤は、第VIIa因子の濃度に対して、6 μ M以上、7 μ M以上、10 μ M以上、20 μ M以上、30 μ M以上、40 μ M以上または50 μ M以上過剰に存在する。一連の実施形態では、第VIIa因子はrh FVIIaまたはSF-rhFVIIaであり、活性部位安定化剤は、第VIIa因子の濃度に対して5.5~50 μ M、5.5~40 μ M、5.5~30 μ M、5.5~10 μ M、6~50 μ M、6~40 μ M、6~30 μ Mまたは6~10 μ M過剰に存在する。

【0050】

第VIIa因子に対する活性部位安定化剤の濃度は、活性部位安定化剤とFVIIaの濃度(μ M)の比で与えることもできる。ただし、活性部位安定化剤の濃度は、FVIIaの濃度より5 μ M超過剰であるものとする。

【0051】

したがって、種々の実施形態では、活性部位安定化剤とFVIIaポリペプチドのモル比([活性部位安定化剤]:[FVIIa])は: 1.1、1.25、1.5もしくは1.75、または1.1~10の範囲、1.25~10の範囲、1.5~10の範囲、1.75~10の範囲、1.1~5の範囲、1.25~5の範囲、1.5~5の範囲、1.25~2の範囲もしくは1.75~5の範囲、または約1.25、約1.5、約1.75、約2もしくは約2.5である。特定の実施形態では、活性部位安定化剤とFVIIaポリペプチドのモル比([活性部位安定化剤]:[FVIIa])は 1.5または 1.75である。

【0052】

一実施形態では、本発明の組成物は、40 μ Mの濃度のFVIIaおよび60 μ Mの濃度の活性部位安定化剤(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩を含む。

【0053】

他の実施形態では、本発明の組成物は、40 μ Mの濃度のFVIIaおよび60 μ Mの濃度の活性部位安定化剤(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩を含む。

10

20

30

40

50

【0054】

他の実施形態では、本発明の組成物は、40 μ Mの濃度のFVIIaおよび75 μ Mの濃度の活性部位安定化剤(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩を含む。

【0055】

他の実施形態では、本発明の組成物は、40 μ Mの濃度のFVIIaおよび75 μ Mの濃度の活性部位安定化剤(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩を含む。

10

【0056】

他の実施形態では、本発明の組成物は、40 μ Mの濃度のFVIIa、および混合物の濃度がそれぞれ60 μ Mまたは75 μ Mである(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩と(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩の混合物を含む。

【0057】

他の実施形態では、本発明の組成物は、40 μ Mの濃度のFVIIaおよび70 μ Mの濃度の活性部位安定化剤(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩を含む。

20

【0058】

他の実施形態では、本発明の組成物は、40 μ Mの濃度のFVIIaおよび70 μ Mの濃度の活性部位安定化剤(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩を含む。

【0059】

他の実施形態では、本発明の組成物は、40 μ Mの濃度のFVIIa、および混合物の濃度がそれぞれ60 μ Mまたは70 μ Mである(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩と(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩の混合物を含む。

30

【0060】

他の実施形態では、本発明の組成物は、100 μ Mの濃度のFVIIaおよび150 μ Mの濃度の活性部位安定化剤(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩を含む。

【0061】

他の実施形態では、本発明の組成物は、100 μ Mの濃度のFVIIaおよび150 μ Mの濃度の活性部位安定化剤(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩を含む。

40

【0062】

他の実施形態では、本発明の組成物は、100 μ Mの濃度のFVIIa、および混合物の濃度が150 μ Mである(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩と(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}

50

-コハク酸または薬学的に許容されるその塩の混合物を含む。

【0063】

他の実施形態では、本発明の組成物は、200 μ Mの濃度のFVIIaおよび210 ~ 350 μ Mの濃度の活性部位安定化剤(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩を含む。

【0064】

他の実施形態では、本発明の組成物は、200 μ Mの濃度のFVIIaおよび210 ~ 350 μ Mの濃度の活性部位安定化剤(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩を含む。

10

【0065】

他の実施形態では、本発明の組成物は、200 μ Mの濃度のFVIIa、および混合物の濃度が210 ~ 350 μ Mである(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩と(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩の混合物を含む。

【0066】

第VIIa因子成分および活性部位安定化剤成分に加えて、液体水性医薬組成物は、組成物の調製、製剤化、安定性または投与に有益な追加的成分を含むことができる。

20

【0067】

二価金属イオン

一実施形態では、本発明の組成物は、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} および Mn^{2+} の群から選択される二価金属イオンも含む。金属イオンは、例えば：塩化カルシウム、酢酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、レブリン酸カルシウム、塩化マンガン(II)、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム、グルコン酸マグネシウム、レブリン酸マグネシウムおよび強酸のマグネシウム塩の群から選択される塩の形態で提供することができる。

【0068】

異なる実施形態では、二価金属イオンは、2mM以上、5mM以上もしくは10mM以上、または2 ~ 100mMの範囲、2 ~ 50mMの範囲、2 ~ 20mMの範囲、5 ~ 15mMの範囲もしくは6 ~ 10mMの範囲の濃度で存在する。

30

【0069】

一実施形態では、二価金属イオンは Ca^{2+} である。種々の他の実施形態では、液体組成物中のカルシウムイオンの濃度は：2mM以上、5mM以上もしくは10mM以上、または2 ~ 100mMの範囲、2 ~ 50mMの範囲、10 ~ 50mMの範囲、2 ~ 20mMの範囲、5 ~ 10mMの範囲もしくは5 ~ 15mMの範囲である。

【0070】

種々の実施形態では、液体組成物のpHは、5.5 ~ 8.5、6.0 ~ 8.5、6.0 ~ 7.5、6.5 ~ 7.5、6.5 ~ 7.0、6.7 ~ 7.0または7.0 ~ 7.5の範囲である。

40

第VII因子ポリペプチド

【0071】

第VII因子(FVII)は、主に肝臓内で産生される糖タンパク質である。成熟タンパク質は406個のアミノ酸残基からなり、相同性によって定義される4つのドメインからなる。2つの上皮成長因子(EGF)様ドメインおよびC末端セリンプロテアーゼドメインが後に続く、N末端Glaドメインが存在する。FVIIは、一本鎖分子として血漿中を循環する。活性化FVII(FVIIa)への活性化によって、分子は残基Arg152とIle153との間で切断され、ジスルフィド結合と一緒に保持された2重鎖タンパク質がもたらされる。軽鎖がGlaおよびEGF様ドメインを含むのに対して、重鎖はプロテアーゼドメインである。FVIIaは、その細胞表面共同因子組織因子と結合して生物学的に活性になる必要がある。

50

【 0 0 7 2 】

「第VII(a)因子」という用語は、切断されていないチモーゲン、第VIIa因子を含み、また切断されており、したがって活性化されているプロテアーゼ、第VIIa因子を含む。「第VII(a)因子」は、存在する可能性があり、1つの個体から他の個体へ起こり得るFVII(a)の天然の対立遺伝子多型を含む。野生型ヒト第VIIa因子配列は、配列番号1ならびにProc. Natl. Acad. Sci. USA 1986年;83:2412~2416頁において提供される。

【 0 0 7 3 】

第VII(a)因子は、周知の産生および精製方法を使用する、血漿誘導されたものであっても組み換え的に産生されたものであってもよい。グリコシル化、カルボキシル化および他の翻訳後修飾の度合いおよび位置は、選択される宿主細胞およびその成長条件に応じて変えることができる。

10

【 0 0 7 4 】

本明細書では「第VII(a)因子ポリペプチド」という用語は、野生型第VIIa因子分子ならびにFVII(a)変形体、FVII(a)誘導体およびFVII(a)コンジュゲートを指す。そうした変形体、誘導体およびコンジュゲートは、野生型ヒト第VIIa因子に対して実質的に同じかまたは改善された生物学的活性を示すことができる。

【 0 0 7 5 】

本明細書で用いる「FVII(a)変形体」という用語は、親タンパク質の1つまたは複数のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されている、および/または、親タンパク質の1つまたは複数のアミノ酸が取り除かれている、および/または、1つまたは複数のアミノ酸が親タンパク質中に挿入されている、および/または、1つまたは複数のアミノ酸が親タンパク質に付加されている配列番号1の配列を有する第VII因子を表すものとする。そうした付加は、親タンパク質のN末端もしくはC末端またはその両方で起こってよい。本定義内の「類似体」または「類似体類」は、その活性化された形態でなおFVII活性を有する。一実施形態では、変形体は、配列番号1の配列と少なくとも90%同一である。他の実施形態では、変形体は配列番号1の配列と少なくとも95%同一である。本明細書で用いるように、特定の位置への任意の参照は、配列番号1における対応する位置を指す。

20

【 0 0 7 6 】

組み換え型野生型ヒト第VII(a)因子と比較して実質的に同じかまたは増大したタンパク質分解性活性を有するFVII(a)変形体の非限定的な例には、WO01/83725、WO02/22776、WO02/077218、WO03/027147、WO03/037932、WO04/029090、WO05/024006ならびに欧州特許第05108713.8号、米国特許出願公開第7173000B2号および日本国特許4451514B2号に開示されているものが含まれる。

30

【 0 0 7 7 】

本明細書で用いる「第VII(a)因子誘導体」という用語は、その中で親ペプチドのアミノ酸の1つもしくは複数がアルキル化、グリコシル化、ペグ化、アシル化、エステル形成、ジスルフィド結合形成、またはアミド形成などによって、遺伝子的に、化学的におよび/または酵素的に改変されている、野生型第VIIa因子に対して実質的に同じかまたは増大した生物学的活性を示すFVIIポリペプチドを表すものとする。

【 0 0 7 8 】

「ペグ化ヒト第VII(a)因子」という用語は、それにPEG分子がコンジュゲート化されているヒト第VII(a)因子ポリペプチドを指す。そうしたPEG分子は、第VIIa因子ポリペプチドの任意のアミノ酸残基または炭水化物部分を含む第VIIa因子ポリペプチドの任意の部分と結合してよい。これには、これらに限定されないが、ペグ化ヒト第VIIa因子、システイン-ペグ化ヒト第VIIa因子およびその変形体が含まれる。第VII因子誘導体の非限定的な例には、WO03/031464、WO04/099231およびWO02/077218に開示されているような糖ペグ化FVII(a)誘導体が含まれる。

40

【 0 0 7 9 】

「システイン-ペグ化ヒト第VII(a)因子」という用語は、PEG分子が、前記ヒト第VIIa因子に導入されているシステインのスルフヒドリル基とコンジュゲートした第VII(a)因子が

50

リペプチドを指す。

【0080】

「改善された生物学的活性」という用語は、i)組織因子存在下および/または非存在下で、組み換え型野生型ヒト第VIIa因子と比較して実質的に同じかまたは増大したタンパク質分解性活性を示すFVII(a)ポリペプチド、あるいはii)組み換え型野生型ヒト第VIIa因子と比較して実質的に同じかまたは増大したTF親和性を有するFVII(a)ポリペプチド、あるいはiii)組み換え型野生型ヒト第VIIa因子と比較して実質的に同じかまたは増大した血漿における半減期を有するFVII(a)ポリペプチド、あるいはiv)活性化された血小板に対して実質的に同じかまたは増大した親和性を有するFVII(a)ポリペプチドを指す。

【0081】

血液凝固における第VIIa因子の生物学的活性は、(i)組織因子(TF)と結合し、(ii)第IX因子または第X因子のタンパク質分解性切断を触媒作用して活性化された第IX因子または第X因子(それぞれ第IXa因子または第Xa因子)を産生する、その能力によってもたらされる。

【0082】

本発明のためには、第VII因子ポリペプチドの生物学的活性(「第VII因子生物学的活性」)は、調製物が血液凝固を促進する能力を測定することによって定量化することができる。本明細書で説明されるアッセイを参照されたい。あるいは、第VIIa因子生物学的活性は、(i)脂質膜中に組み込まれたTFおよび第X因子を含む系において、第VIIa因子または第VII因子関連ポリペプチドが、活性化された第X因子(第X因子a)を産生する能力を測定する(Perssonら、J. Biol. Chem. 272:19919~19924頁、1997年);あるいは、(ii)表面プラズモン共鳴を用いた機器を用いて、第VIIa因子または第VII因子関連ポリペプチドのTFへの物理的結合を測定する(Persson、FEBS Letts. 413:359~363頁、1997年)ことによって定量化することができる。

【0083】

配列番号1:野生型ヒト凝固第VII因子

anafl lrpqsl r ck qcsf ar ifkda rtklfwisysdgdqccasspcqnggsckdqlqsyic
fc l pafegrnecethkddql icv nenggcceqycsdhtgtkrscrchegyslladgvsctptveyqpcgkipilekrnaskpq
grivggkvcpkgecpwqvl l vngaq l cgg t l i n t i w v v s a a h c f d k i k n w r n l i a v l g e h d l s e h d g d e q s r r v a q v i i
p s t y v p g t t n h d i a l l r l h q p v v l t d h v p l c l p e r t f s e r t l a f v r f s l v s g w g q l l d r g a t a l e l m v l n v p r l m t q d c
l q q s r k v g d s p n i t e y m f c a g y s d g s k d s c k g d s g g p h a t h y r g t w y l t g i v s w g g q c a t v g h f g v y t r v s q y i e w l q k l
m r s e p r p g v l l r a p f p

(は カルボキシグルタミン酸(Gla)を表す)

【0084】

種々の実施形態では、第VIIa因子ポリペプチドは:ヒト第VIIa因子(hFVIIa)、組み換え的に作製されたヒト第VIIa因子(rhFVIIa)、組み換え的に作製された無血清第VIIa因子(sf-rFVIIa)、組み換え的に作製された無血清ヒト第VIIa因子(sf-rhFVIIa)(「無血清」は:無血清培養条件下で組み換え的に作製されること)である。

【0085】

いくつかの実施形態では、第VIIa因子は、適切な任意の製造プロセスで作製される。一実施形態では、第VII因子ポリペプチドは、米国特許第6903069号(その全体において、参照により本明細書に組み込む)による無血清製造プロセスで作製される。

【0086】

いくつかの実施形態では、第VIIa因子ポリペプチドは第VIIa因子配列変形体、第VIIa因子誘導体である。

【0087】

野生型第VIIa因子の異なる実施形態では、ポリペプチドは:ヒト第VIIa因子(hFVIIa)、組み換え的に作製されたヒト第VIIa因子(rhFVIIa)、組み換え的に作製された無血清第VIIa因子(sf-rFVIIa)、組み換え的に作製された無血清ヒト第VIIa因子(sf-rhFVIIa)(「無血清」は:無血清培養条件下で組み換え的に作製されること)である。

10

20

30

40

50

【0088】

異なる実施形態では、第VIIa因子ポリペプチドは：約0.3～200mg/mL、約0.3～120mg/mL、約0.5～100mg/mL、約0.5～20mg/mL、約1～10mg/mL、約1～5.5mg/mL、約2～20mg/mL、約2～15mg/mL、約2～10mg/mL、約2～5.5mg/mLもしくは約5～15mg/mLまたは約2mg/mL、約5mg/mLもしくは約10mg/mLの濃度で液体組成物中に存在する。

【0089】

第VIIa因子濃度は、mg/mLまたはIU/mLで好都合に表される。1mgは通常43,000～56,000IUまたはそれ以上を表す。第VIIa因子は約52kDaの分子量を有する。したがって、1mg/mLの濃度のFVIIaは約20 μ Mのモル濃度のFVIIaに相当する。

【0090】

医薬組成物の生物学的効果は主に第VIIa因子ポリペプチドの存在に帰するが、他の活性構成要素を第VIIa因子ポリペプチドと組み合わせて含めることができる。

【0091】

緩衝剤

ヒトなどの哺乳動物へ直接非経口投与するのに有用な液体水性医薬組成物を提供するために、通常、組成物のpH値を特定の限度内、例えば約5.5～8.5に保持する必要がある。

【0092】

所与の条件下で適切なpH値を確実にするために、医薬組成物は、pHを約5.5～8.5の範囲に保持するのに適した緩衝剤も含む。

【0093】

「緩衝剤」という用語は、溶液のpHを約5.5～8.5の範囲に保持するそうした薬剤または薬剤の組合せを含む。

【0094】

一実施形態では、緩衝剤は、MES、PIPES、ACES、BES、TES、HEPES、TRIS、ヒスチジン(例えば、L-ヒスチジン)、イミダゾール、グリシン、グリシルグリシン、グリシンアミド、リン酸(例えば、リン酸のナトリウムまたはカリウム塩)、酢酸(例えば、酢酸のアンモニウム、ナトリウムまたはカルシウム塩)、乳酸、グルタル酸、クエン酸(例えば、クエン酸のナトリウムまたはカリウム塩)、酒石酸、リンゴ酸、マレイン酸およびコハク酸の酸および塩からなる群から選択される少なくとも1つの成分である。緩衝剤は、その混合物が指定された範囲内のpH値を提供し維持できる2つ以上の成分の混合物を含むことができることを理解すべきである。

【0095】

緩衝剤の濃度は、溶液の好ましいpHが維持されるように選択される。種々の実施形態では、緩衝剤の濃度は1～100mM; 1～50mM; 1～25mMまたは2～20mMである。

【0096】

異なる実施形態では、組成物のpHは、5.5～8.5、6.0～8.5、6.0～7.5、6.5～7.5、7.0～7.5、6.5～7.0または6.7～6.9に保持される。

【0097】

異なる実施形態では、緩衝剤はヒスチジンおよび/またはグリシルグリシンを含む。

【0098】

本発明の関連で用いられるように、「約」と指定されたpH値は ± 0.1 であると理解すべきであり、例えば約pH8.0はpH8.0 ± 0.1 を含む。

【0099】

界面活性剤

医薬組成物はノニオン性界面活性剤も含むことができる。界面活性剤(洗剤としても知られている)は一般に、タンパク質を、空気/溶液界面誘導応力および溶液/表面誘導応力(例えば、タンパク質凝集をもたらす)から保護する薬剤を含む。

【0100】

典型的な種類のノニオン性界面活性剤は、ポリソルベート、ポロキサマー、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリエチレン/ポリプロピレンブロックコポリマー、ポリエ

10

20

30

40

50

チレングリコール(PEG)、ポリオキシエチレンステアレートおよびポリオキシエチレンヒマシ油である。

【0101】

ノニオン性界面活性剤の実例はTween(登録商標)、ポリソルベート20、ポリソルベート80、Brij-35(ポリオキシエチレンドデシルエーテル)、ボロクサマー188、ボロクサマー407、PEG8000、Pluronic(登録商標)ポリオール、ポリオキシ-23-ラウリルエーテル、Myrj49およびCremophor Aである。

【0102】

一実施形態では、ノニオン性界面活性剤は0.005~2.0質量%の量で存在する。一実施形態では、ノニオン性界面活性剤はポリソルベートまたはボロクサマーである。他の実施形態では、界面活性剤はポリソルベート80である。他の実施形態では、界面活性剤はボロクサマー188である。

10

【0103】

等張性調節剤

また、組成物は等張性調節剤をさらに含むことができる。本明細書で用いる「等張性調節剤」という用語は、溶液の浸透圧に寄与する薬剤を含む。等張性調節剤には、中性塩、アミノ酸、2~5個のアミノ酸残基のペプチド、単糖類、二糖類、オリゴ糖および多糖類および糖アルコールからなる群から選択される少なくとも1つの薬剤が含まれる。いくつかの実施形態では、その組成物は、そうした薬剤の2つ以上を組み合わせる。

20

【0104】

「中性塩」は、水溶液に溶解された場合、酸でも塩基でもない塩を意味する。中性塩の非限定的な例には、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩およびマグネシウム塩、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、酢酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、レブリン酸カルシウム、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム、グルコン酸マグネシウムおよびレブリン酸マグネシウムなどが含まれる。

【0105】

等張性調節剤として使用できる糖類の非限定的な例は:スクロース、マンニトール、グルコース(デキストロース)およびシクロデキストリンである。

【0106】

異なる実施形態では、等張性調節剤は:塩化ナトリウム、塩化カルシウム、スクロース、グルコース、マンニトール、シクロデキストリンおよびこれらの2つ以上の組合せからなる群から選択される。

30

【0107】

一実施形態では、等張性調節剤は、塩化ナトリウム、または塩化ナトリウムと塩化カルシウム、スクロース、グルコース、マンニトールおよびシクロデキストリンの群から選択される1つもしくは複数の、追加の薬剤の組合せである。

【0108】

異なる実施形態では、等張性調節剤は、少なくとも5mM、少なくとも10mM、少なくとも20mM、少なくとも50mMもしくは少なくとも100mM、または10~200mM、10~150mM、30~150mMもしくは50~140mMの範囲の濃度で存在する。

40

【0109】

一実施形態では、等張性調節剤は50~140mMの塩化ナトリウムである。他の実施形態では、等張性調節剤は、20~40mMの濃度のスクロースおよび/またはマンニトールである。

【0110】

一実施形態では、組成物は、等張性であり、他では高張性である。

【0111】

「等張性」という用語は、「血清と等張性である」(すなわち、約 300 ± 50 ミリオスモル/kg)ことを意味する。等張性は、投与する前の溶液の浸透圧の尺度であることを意味する。「高張性」という用語は、血清の生理学的レベルを超える浸透圧のレベル、例えば 300 ± 50 ミリオスモル/kg超のレベルを表すことを意味する。

50

【0112】

酸化防止剤

式IおよびIIを有する活性部位安定化剤は、これらの化合物が酸化を受け得るので、それら自体、抗酸化作用を示す。したがって、結果として、使用された活性部位安定化剤は、第VIIa因子分子を酸化から保護することができる。しかし、本発明の他の実施形態では、その組成物は酸化防止剤をさらに含む。異なる実施形態では、酸化防止剤は:L-メチオニン、D-メチオニン、メチオニン類似体、メチオニン含有ペプチド、メチオニン相同体、システイン、ホモシステイン、グルタチオン、チロシン、シスチンおよびシスタチオニンからなる群から選択される。異なる実施形態では、酸化防止剤はL-メチオニン、グルタチオン、チロシンまたはこれらの2つ以上の混合物である。

10

【0113】

酸化防止剤の濃度は一般に、0.1~5.0mg/mL、例えば0.1~4.0mg/mL、0.1~3.0mg/mL、0.1~2.0mg/mLまたは0.5~2.0mg/mLである。

【0114】

酸素が分解反応に加わる生成物に関しては、酸化防止作用は、生成物との接触から酸素(空気)を排除することによって実現することができる。特定の実施形態では、組成物は酸化防止剤を含まず;その代わりに、酸化に対する第VII因子ポリペプチドの感受性を、大気の排除によって、または生成物との接触から酸素(空気)を排除することによって制御する。これは、例えば、その液体を窒素かまたはアルゴンで飽和させ、生成物上の空気をそのガスで置き換えた後、最終容器を密封することによって実現することができる。

20

【0115】

酸化防止剤の使用は、もちろん、大気の排除と組み合わせることもできる。さらに、組成物を光から保護することができ;前記保護は、もちろん、大気の排除および酸化防止剤の使用のいずれかまたはその両方と一緒にすることができる。

【0116】

したがって、本発明はまた、本明細書で説明するような液体水性医薬組成物および任意選択で不活性ガスを含む気密容器(例えば、バイアルまたはカートリッジ(ペンアプリケーション用のカートリッジなど))も提供する。不活性ガスは、窒素またはアルゴンからなる群から選択することができる。容器(例えば、バイアル、カートリッジまたはシリンジ)は、一般に、医薬組成物の完全性を維持しながら、浸透を可能にするゴム隔膜または他の密閉手段によって任意選択で封じられているガラスまたはプラスチック、特にガラスでできている。他の実施形態では、容器は、密封バッグ、例えば密封プラスチックバッグ、例えば積層化されたもの(例えば、金属(アルミニウムなど)積層プラスチックバッグ)の中に封入されたバイアルまたはカートリッジである。

30

【0117】

可溶化剤

本発明の組成物は、安定化剤の溶解を容易にするために、可溶化剤を含むことができる。例えば、より高い濃度の第VIIa因子およびそれに続くより高い濃度の安定化剤において、そうした薬剤の含有は有益であることがわかるであろう。特に、6.5より低いpHを有する組成物は、可溶化剤の含有により利益を得ることができる。

40

【0118】

可溶化剤の非限定的な例は:シクロデキストリン、ジメチルスルホキシド(DMSO)、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン(HP-β-CD)である。

【0119】

シクロデキストリンは、セルロースの細菌消化の際に形成される構造的に関連する天然産物の群である。これらの環状オリゴ糖は(1,4)-結合-D-グルコピラノース単位からなり、若干親油性の中心腔および親水性の外表面を含む。天然のα-、β-およびγ-シクロデキストリン(α-CD、β-CDおよびγ-CD)は、それぞれ6個、7個および8個のグルコピラノース単位からなる。商業的に興味のある水溶性シクロデキストリン誘導体には、α-CDおよびβ-CDのヒドロキシプロピル誘導体、ランダムにメチル化されたγ-シクロデキストリン(

50

RM-CD)およびスルホブチルエーテル-β-シクロデキストリンナトリウム塩(SBE-CD)が含まれる。

【0120】

シクロデキストリンの非限定的な例には：β-シクロデキストリン(β-CD)、γ-シクロデキストリン(γ-CD)、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン(HP-β-CD)、スルホブチルエーテル-β-シクロデキストリンナトリウム塩(SBE-β-CD)、ランダムにメチル化されたβ-シクロデキストリン(RM-β-CD)および2-ヒドロキシプロピル-γ-シクロデキストリン(HP-γ-CD)が含まれる。一実施形態では、シクロデキストリンはHP-β-CDおよび/またはHP-γ-CDである。

【0121】

一実施形態では、可溶化剤は、5%(重量/体積)の濃度で存在する。

【0122】

防腐剤

微生物増殖を遅延させそれによって第VIIa因子ポリペプチドの「多重使用」パッケージングを可能にするために、防腐剤を組成物中に含めることができる。防腐剤の例には、フェノール、ベンジルアルコール、orto-クレゾール、meta-クレゾール、para-クレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、塩化ベンザルコニウムおよび塩化ベンゼトニウムが含まれる。防腐剤は通常、防腐剤のpH範囲および種類に応じて、0.1~20mg/mLの濃度で含まれる。

【0123】

本発明による組成物は、第VII因子ポリペプチドの安定で、好ましくはそのまま使用できる組成物として有用である。これらの組成物は一般に、2~8℃の範囲の温度で貯蔵した場合、少なくとも6カ月間、好ましくは最大で36カ月間安定である。一実施形態では、組成物は、2~8℃の範囲の温度で貯蔵した場合、24カ月間安定である。他の実施形態では、組成物は、2~8℃の範囲の温度で貯蔵した場合24カ月間安定であり、25~30℃の範囲の温度で貯蔵した場合、少なくとも追加的に4週間安定である。これらの組成物は、2~8℃で少なくとも6カ月間貯蔵した場合、化学的および/または物理的に安定であり、特に化学的に安定である。

【0124】

「安定である(stable)」という用語は、(i)2~8℃で6カ月間貯蔵または20℃もしくはそれ以上で2週間貯蔵した後、本明細書のアッセイ1に基本的に説明されている一段クロットアッセイで測定して、組成物がその初期生物学的活性の少なくとも50%を保持すること、あるいは、(ii)2~8℃で6カ月間貯蔵した後、重鎖分解生成物の含量が第VIIa因子ポリペプチドの初期含量の多くて40重量%しか増大しないことを表すものとする。

【0125】

「初期含量」という用語は、組成物の調製の際にその組成物に加えられた第VIIa因子ポリペプチドの量に関する。

【0126】

「組成物」という用語と「製剤」という用語は、本特許出願を通して互換的に使用される。

【0127】

一実施形態では、安定組成物は、2~8℃で6カ月間貯蔵した後、その初期生物学的活性の少なくとも70%、例えば少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%を保持する。

【0128】

本発明の異なる実施形態では、安定組成物は、少なくとも30日間、例えば60日間または90日間貯蔵した後、本明細書のアッセイ1に基本的に説明されている一段クロットアッセイで測定して、その初期生物学的活性の少なくとも50%をさらに保持する。

【0129】

種々の実施形態では、安定組成物における重鎖分解生成物の含量の増大は、第VIIa因子

10

20

30

40

50

ポリペプチドの初期含量のせいぜい約10%、せいぜい約8%、せいぜい約5%またはせいぜい約3%である。重鎖分解生成物の含量は、以下のアッセイ2で記載するようにして測定される。

【0130】

第VII因子ポリペプチドの「物理的安定性」という用語は、第VII因子ポリペプチドの二量体、オリゴマーおよび多量体形態の不溶性および/または可溶性凝集体の形成、ならびに、分子の任意の構造的な変形および変性に関する。物理的に安定な組成物は、視覚的にきれいに保持されている組成物を包含する。組成物の物理的安定性は、しばしば、異なる温度で様々な期間その組成物を貯蔵した後の目視検査および濁りによって評価される。組成物の目視検査は、暗い背景のもと、鋭く絞り込まれた光線下で実施される。目視で濁りが示される場合、組成物は物理的に不安定であると分類される。

10

【0131】

「化学的安定性」という用語は、加速された条件で、溶液中で貯蔵した際の第VII因子ポリペプチドにおける任意の化学的变化の発生に関するものとする。その例は、第VII因子ポリペプチドの断片の形成をもたらす加水分解、脱アミドおよび酸化ならびに酵素的分解である。特に、硫黄含有アミノ酸は酸化されて対応するスルホキシドを形成する傾向がある。

【0132】

「化学的に安定である」という用語は、2 ~ 8 で6カ月間貯蔵した後、一段クロットアッセイ(アッセイ1)で測定して、その初期生物学的活性の少なくとも50%を保持することを表すものとする。

20

【0133】

種々の実施形態では、安定組成物中の酸化/分解生成物の含量の増大は、第VIIa因子ポリペプチドの初期含量のせいぜい約10重量%、せいぜい約8重量%、せいぜい約5重量%またはせいぜい約3%である。酸化/分解生成物の含量は、以下のアッセイ2で記載するようにして測定される。

【0134】

様々な実施形態

一実施形態では、FVIIa組成物は、pH6.5~7.0で、2~5mg/mlのFVIIa、FVIIaに対して10~100 μ M過剰の安定化剤、5~20mMの Ca^{2+} 、メチオニン0.1~2.0mg/mLを含む。一実施形態では、組成物は、貯蔵の間、大気中の酸素から保護され、および/または光から保護される。酸素からの保護は、例えば、バイアルを酸素密閉性シール(oxygen-tight seal)で密封すること、または密封する前にバイアルを窒素もしくは不活性ガスで満たすこと、あるいはその両方によって行うことができる。他の実施形態では、組成物はポリソルベートまたはポロキサマーをさらに含む。

30

【0135】

一連の実施形態では、本発明の液体組成物は:

存在する第VIIa因子の1 μ M当たり1.1 μ M~2.5 μ Mの比の1~10mg/mLの第VIIa因子、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式I)または薬学的に許容されるその塩;6~50mMの Ca^{2+} 、0.1~2.0mg/mLのメチオニン、pH6.5~7.5;

40

存在する第VIIa因子の1 μ M当たり1.1 μ M~2.5 μ Mの比の1~10mg/mLの第VIIa因子、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式I)または薬学的に許容されるその塩;6~50mMの Ca^{2+} 、0.25~5mg/mLのメチオニン、pH6.5~7.5;

存在する第VIIa因子の1 μ M当たり1.1 μ M~2.5 μ Mの比の1~10mg/mLの第VIIa因子、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式I)または薬学的に許容されるその塩;6~50mMの Ca^{2+} 、0.5~1.50mg/mLのメチオニン、pH6.5~7.5;

存在する第VIIa因子の1 μ M当たり1.1 μ M~2.5 μ Mの比の2~5mg/mLの第VIIa因子、(S)-2

50

-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式I)または薬学的に許容されるその塩;6~50mMの Ca^{2+} 、0.1~2.0mg/mLのメチオニン、pH6.5~7.5;

存在する第VIIa因子の1 μM 当たり1.1 μM ~2.5 μM の比の2~5mg/mLの第VIIa因子、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式I)または薬学的に許容されるその塩;6~50mMの Ca^{2+} 、0.25~5mg/mLのメチオニン、pH6.5~7.5;

存在する第VIIa因子の1 μM 当たり1.1 μM ~2.5 μM の比の2~5mg/mLの第VIIa因子、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式I)または薬学的に許容されるその塩;6~50mMの Ca^{2+} 、0.5~1.50mg/mLのメチオニン、pH6.5~7.5;

存在する第VIIa因子の1 μM 当たり1.75 μM の比の1~10mg/mLの第VIIa因子、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式I)または薬学的に許容されるその塩;6~50mMの Ca^{2+} 、0.1~2.0mg/mLのメチオニン、pH6.5~7.5;

存在する第VIIa因子の1 μM 当たり1.75 μM の比の1~10mg/mLの第VIIa因子、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式I)または薬学的に許容されるその塩;6~50mMの Ca^{2+} 、0.25~5mg/mLのメチオニン、pH6.5~7.5;

存在する第VIIa因子の1 μM 当たり1.75 μM の比の1~10mg/mLの第VIIa因子、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式I)または薬学的に許容されるその塩;6~50mMの Ca^{2+} 、0.5~1.50mg/mLのメチオニン、pH6.5~7.5;

存在する第VIIa因子の1 μM 当たり1.75 μM の比の2~5mg/mLの第VIIa因子、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式I)または薬学的に許容されるその塩;6~50mMの Ca^{2+} 、0.1~2.0mg/mLのメチオニン、pH6.5~7.5;

存在する第VIIa因子の1 μM 当たり1.75 μM の比の2~5mg/mLの第VIIa因子、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式I)または薬学的に許容されるその塩;6~50mMの Ca^{2+} 、0.25~5mg/mLのメチオニン、pH6.5~7.5;

存在する第VIIa因子の1 μM 当たり1.75 μM の比の2~5mg/mLの第VIIa因子、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸(式I)または薬学的に許容されるその塩;6~50mMの Ca^{2+} 、0.5~1.50mg/mLのメチオニン、pH6.5~7.5;

1.0~5.0mg/mLの第VIIa因子、30 μM ~160 μM の式Iを有する活性部位安定化剤、1.47mg/mLの $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、7.50mg/mLのNaCl、0.5mg/mLメチオニン、0.07mg/mLポリソルベート、1.55mg/mLヒスチジン、1.32mg/mLグリシルグリシン、pH6.5~7.5;

1.0~5.0mg/mLの第VIIa因子、30 μM ~160 μM の式IIを有する活性部位安定化剤、1.47mg/mLの $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、7.50mg/mLのNaCl、0.5mg/mLメチオニン、0.07mg/mLポリソルベート、1.55mg/mLヒスチジン、1.32mg/mLグリシルグリシン、pH6.5~7.5;

2.0mg/mLの第VIIa因子、70 μM (0.04179mg/mL;MW=596.57)の式I(MW=596.57g/mol)を有する活性部位安定化剤、1.47mg/mLの $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、7.50mg/mLのNaCl、0.5mg/mLメチオニン、0.07mg/mLポリソルベート、1.55mg/mLヒスチジン、1.32mg/mLグリシルグリシン、pH6.5~7.5;

2.0mg/mLの第VIIa因子、70 μM (0.04179mg/mL;MW=596.57)の式Iを有する活性部位安定化剤、1.47mg/mLの $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、7.50mg/mLのNaCl、0.5mg/mLメチオニン、0.07mg/mLポリソルベート、1.55mg/mLヒスチジン、1.32mg/mLグリシルグリシン、pH6.8;

を含む。

【0136】

10

20

30

40

50

上記の特定の実施形態では、列挙した例示組成物は、ポリソルベートまたはポロクサマーおよび任意選択のシクロデキストリンをさらに含む。これに関する他の特定の実施形態では、第VIIa因子は、ヒト組み換え型FVIIa(rhFVIIa)または無血清ヒト組み換え型FVIIa(sf-rhFVIIa)である。

【0137】

他の特定の実施形態では、列挙した例示組成物は、貯蔵の間、大気中の酸素から保護され、および/または光から保護される。酸素からの保護は、例えば、バイアルを酸素密閉性シールで密封すること、または密封する前にバイアルを窒素もしくは不活性ガスで満たすこと、あるいはその両方によって行うことができる。

【0138】

組成物の調製方法

他の態様では、本発明はまた、第VII因子ポリペプチドの液体水性医薬組成物を調製する方法であって、pHを約5.5～約8.5の範囲に保持するのに適した緩衝剤、および2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩である活性部位安定化剤を含む溶液中に、第VIIa因子ポリペプチドを供給する工程を含む方法も提供する。

【0139】

使用方法

理解されるように、本明細書で定義する液体水性医薬組成物は、医学分野で 사용할ことができる。したがって、本発明は特に、医薬品として使用するため、より具体的には、第VII因子応答性障害を治療する医薬品として使用するための本明細書で定義する液体水性医薬組成物を提供する。

【0140】

したがって、本発明はまた、第VII因子応答性障害を治療する医薬品の調製のための本明細書で定義されるような液体水性医薬組成物の使用、ならびに第VII因子応答性障害を治療する方法であって、それを必要とする対象に、有効量の本明細書で定義されるような液体水性医薬組成物を投与する工程を含む方法も提供する。

【0141】

本発明の調製物は、凝固因子欠乏症(例えば、血友病A、血友病B、凝固第XI因子欠乏症、凝固第VII因子欠乏症)によって;血小板減少症もしくはフォン・ヴィルブランド病によって、または凝固因子阻害剤(例えば、凝固第VIII因子または凝固第IX因子に対する阻害剤)によって引き起こされるもの、および大脳内出血または任意の原因による過度の出血を含む出血性障害などの任意の第VII因子応答性障害を治療するのに使用することができる。これらの調製物は、外科処置もしくは他の外傷と合わせて患者に投与するか、または抗凝固治療を受けている患者に投与することもできる。本発明の調製物は、凝固因子欠乏症(例えば、血友病A、血友病B、凝固第XI因子欠乏症、凝固第VII因子欠乏症);血小板減少症、フォン・ヴィルブランド病、グランツマン血小板無力症、または凝固因子阻害剤(例えば、凝固第VIII因子または凝固第IX因子に対する抗体)と関係するまたはそれらによって引き起こされる出血の治療のために使用することができる。

【0142】

「有効量」という用語は、所望の患者の応答を達成するために投薬量を調節することができる資格のある医師によって決定される有効用量である。用量を考慮するための因子は、効力、生物学的利用能、所望の薬物動態学的/薬力学的プロファイル、治療の状態、患者関連因子(例えば、体重、健康状態、年齢等)、共投与医薬品の存在(例えば、抗凝血剤)、投与の時間または医師に公知の他の因子を含むことになる。

【0143】

「治療」という用語は、疾患、または疾患、状態もしくは障害の症状を防止する、緩和するまたは治癒させるための対象、例えば哺乳動物、特にヒトの管理およびケアと定義される。これは、症状もしくは合併症の発現を防止する、または前記症状もしくは合併症を

10

20

30

40

50

緩和する、または疾患、状態もしくは障害を排除するための第VII因子ポリペプチドの投与を含む。第VII因子ポリペプチドを含む本発明による医薬組成物は、そうした治療を必要とする対象に非経口で投与することができる。そうした非経口投与の非排他的な例は、任意選択で、ペン型(penlike)デバイス、例えば事前充填シリンジの形態のシリンジまたは注入ポンプによる、皮下、筋肉内、皮内または静脈内注射である。

【0144】

実施形態のリスト:

1. 第VIIa因子ポリペプチドと;

pHを約5.5~約8.5の範囲に保持するのに適した緩衝剤と;

2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩である活性部位安定化剤とを含む液体医薬組成物。 10

【0145】

2. その活性部位安定化剤が、

(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩である、実施形態1に記載の組成物。

【0146】

3. その活性部位安定化剤が、 20

(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩である、実施形態1に記載の組成物。

【0147】

4. その活性部位安定化剤が、

(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩と、

(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩の混合物である、実施形態1に記載の組成物。 30

【0148】

5. 上記活性部位安定化剤の濃度が、FVIIaポリペプチドの濃度(μM)より $>5\mu\text{M}$ 過剰である、実施形態1から4のいずれか一つに記載の組成物。

【0149】

6. 上記活性部位安定化剤の濃度が、FVIIaポリペプチドの濃度(μM)より $>5\mu\text{M}$ 過剰から、存在するFVIIaポリペプチドの濃度(μM)の2.5倍までである、実施形態1から5のいずれか一つに記載の組成物。

【0150】

7. 上記活性部位安定化剤が、第VIIa因子の濃度に対して $5.5\sim 100\mu\text{M}$ 、 $5.5\sim 50\mu\text{M}$ 、 $5.5\sim 30\mu\text{M}$ 、 $5.5\sim 10\mu\text{M}$ 、 $6\sim 50\mu\text{M}$ 、 $6\sim 30\mu\text{M}$ または $6\sim 10\mu\text{M}$ 過剰に存在する;または上記活性部位安定化剤が、第VIIa因子の濃度に対して $20\mu\text{M}$ 以上、 $30\mu\text{M}$ 以上、 $40\mu\text{M}$ 以上または $50\mu\text{M}$ 以上過剰に存在する、実施形態1から6のいずれか一つに記載の組成物。 40

【0151】

8. 上記活性部位安定化剤とFVIIaポリペプチドのモル比([活性部位安定化剤]:[FVIIa])が: 1.1、1.25もしくは1.5、または1.1~10の範囲、1.25~10の範囲、1.5~10の範囲、1.1~5の範囲、1.25~5の範囲もしくは1.5~5の範囲または約1.25、約1.5、約2もしくは約2.5である、実施形態1から4のいずれか一つに記載の組成物。

【0152】

9. 上記活性部位安定化剤とFVIIaポリペプチドのモル比([活性部位安定化剤]:[FVIIa]) 50

が 1.25または1.5である、実施形態1から5のいずれか一つに記載の組成物。

【0153】

10. 上記第VII因子ポリペプチドが: 約0.3~200mg/mL、約0.3~120mg/mL、約0.5~100mg/mL、約0.5~20mg/mL、約1~10mg/mL、約1~5.5mg/mL、約2~20mg/mL、約2~15mg/mL、約2~10mg/mLもしくは約2~5.5mg/mLまたは約2mg/mLもしくは約5mg/mLの濃度で存在する、実施形態1から9のいずれか一つに記載の組成物。

【0154】

11. 6.0~8.5、6.0~7.5、6.5~7.5、7.0~7.5または6.5~7.0のpH値を有する、実施形態1から10のいずれか一つに記載の組成物。

【0155】

12. 上記緩衝剤が、MES、PIPES、ACES、BES、TES、HEPES、TRIS、ヒスチジン、イミダゾール、グリシン、グリシルグリシン、グリシンアミド、リン酸、酢酸、乳酸、グルタル酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、マレイン酸およびコハク酸の酸および塩からなる群から選択される少なくとも1つの成分を含む、実施形態1から11のいずれか一つに記載の組成物。

【0156】

13. 上記製剤が: Ca^{2+} 、 Mg^{2+} および/または Mn^{2+} の群から選択される二価金属カチオンを含む、実施形態1から12のいずれか一つに記載の組成物。

【0157】

14. 上記二価金属カチオンが Ca^{2+} である、実施形態13に記載の組成物。

【0158】

15. 上記製剤が酸化防止剤を含む、実施形態1から14のいずれか一つに記載の組成物。

【0159】

16. 上記酸化防止剤がメチオニンである、実施形態15に記載の組成物。

【0160】

17. 上記製剤が等張性調節剤を含む、実施形態1から16のいずれか一つに記載の組成物。

【0161】

18. 上記等張性調節剤が: NaCl、マンニトール、スクロースまたはこれらの2つ以上の混合物の群から選択される、実施形態17に記載の組成物。

【0162】

19. 上記製剤が界面活性剤を含む、実施形態1から18のいずれか一つに記載の組成物。

【0163】

20. 上記界面活性剤が: ポリソルベートまたはポロクサマーから選択される、実施形態19に記載の組成物。

【0164】

21. 上記製剤が可溶化剤を含む、実施形態1から20のいずれか一つに記載の組成物。

【0165】

22. 上記可溶化剤がシクロデキストリンである、実施形態21に記載の組成物。

【0166】

23. 上記第VII因子ポリペプチドが、ヒト第VIIa因子、組み換え型ヒト第VIIa因子または無血清組み換え型ヒトFVIIaである、実施形態1から22のいずれか一つに記載の組成物。

【0167】

24. 上記第VII因子ポリペプチドが第VII因子配列変形体または第VII因子誘導体である、実施形態1から23のいずれか一つに記載の組成物。

【0168】

25. そうした治療を必要とする患者における第VII因子応答性出血性障害を治療する方法であって、その患者に治療有効量の実施形態1から26のいずれか一つに記載の液体医薬組成物および薬学的に許容される担体を投与する工程を含む方法。

【0169】

26. 第VII因子応答性出血性障害の治療のための、実施形態1から24に記載の液体医薬組

10

20

30

40

50

成物。

【0170】

27. 前記出血性障害が：血友病A、血友病B、凝固第XI因子欠乏症、凝固第VII因子欠乏症、血小板減少症およびフォン・ヴィルブランド病のリストから選択される、実施形態26に記載の液体医薬組成物。

【0171】

28. 実施形態1から24に記載の液体医薬組成物を調製する方法であって、pHを約5.5～約8.5の範囲に保持するのに適した緩衝剤および2-[2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ビフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩である活性部位安定化剤を含む溶液中に、第VIIa因子ポリペプチドを供給する工程を含む方法。

10

【0172】

29. 液体水性組成物中の第VIIa因子を安定化させる方法であって、pHを約5.5～約8.5の範囲に保持するのに適した緩衝剤および2-[2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ビフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸または薬学的に許容されるその塩である活性部位安定化剤を含む溶液中に、第VIIa因子ポリペプチドを供給する工程を含む方法。

【0173】

30. 実施形態1から24に規定の液体水性医薬組成物および任意選択で不活性ガスを含む気密容器。

20

【0174】

31. 窒素およびアルゴンからなる群から選択される不活性ガスを含む、実施形態30に記載の気密容器。

【0175】

材料および方法

略語

FVII=血液凝固第VII因子

FVIIa=その活性化された2重鎖(切断されている)形態の血液凝固第VII因子

rFVIIa=組み換え型の活性化された第VII因子

rhFVIIa=活性化された形態の組み換え型ヒト第VII因子

30

PEG=ポリエチレングリコール

sf-rFVIIa(SF-rFVIIa)=活性化された形態の無血清組み換え型第VII因子

sf-rhFVIIa(SF-rhFVIIa)=活性化された形態の無血清組み換え型ヒト第VII因子

wt-FVII=野生型第VII因子

HPLC=高速液体クロマトグラフィー

RP=逆相

SE=サイズ排除

【0176】

第VII因子ポリペプチドの調製および精製

本発明において使用するのに適したヒト精製第VIIa因子は、好ましくは、例えばHagenら、Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83:2412～2416頁、1986年に記載されている、または欧州特許第0200421号(ZymoGenetics、Inc. 社)に記載されているようなDNA組み換え型技術により作製される。いくつかの実施形態では、第VIIa因子は、適切な任意の製造プロセスにより作製される。一実施形態では、第VII因子ポリペプチドは、米国特許第6,903,069号(その全体において、参照により本明細書に組み込む)による無血清製造プロセスで作製される。

40

【0177】

第VII因子はまた、Broze and Majerus、J.Biol.Chem. 255(4):1242～1247頁、1980年およびHedner and Kisiel、J.Clin.Invest. 71:1836～1841頁、1983年に記載されている方法によっても生産される。これらの方法は、検出可能な量の他の血液凝固因子を含むこと

50

なく第VII因子をもたらす。さらに他の精製第VII因子調製物を、最終精製工程として追加的なゲルろ過を含めることによって得ることができる。次いで第VII因子を、公知の手段、例えば第XI因子Ia、IXまたはXaなどのいくつかの異なる血漿タンパク質によって、活性化された第VIIa因子へ転換させる。あるいは、Bjoernら(Research Disclosure、269、1986年9月、564～565頁)によって記載されているようにして、第VII因子を、例えばMono Q(登録商標)(Pharmacia fine Chemicals社)などのイオン交換クロマトグラフィーカラムに通すか、または溶液中での自己活性化によって活性化させることができる。

【0178】

第VII因子変形体は、野生型第VII因子の改変または組み換え型技術によって生産することができる。野生型第VII因子と比較して変更されたアミノ酸配列を有する第VII因子変形体は、アミノ酸コドンを変えるか、または公知の手段、例えば部位特異的な変異誘発によって天然第VII因子をコードする核酸中のアミノ酸コドンの一部を除去することにより、野生型第VII因子をコードする核酸配列を改変することによって生産することができる。

10

【0179】

置換を、第VIIa因子分子の機能に極めて重要な領域の外で行い、それでも活性なポリペプチドをもたらすことができることは当業者に明らかであろう。第VII因子ポリペプチドの活性に必須である、したがって、好ましくは置換を受けないアミノ酸残基は、部位特異的な変異誘発法またはアラニンスキャニング変異誘発法(例えば、Cunningham and Wells、1989年、Science 244:1081～1085頁を参照されたい)などの当業界で公知の手順によって特定することができる。後者の技術においては、変異は、分子中のプラスに帯電した残基毎に導入され、分子の活性に極めて重要なアミノ酸残基を特定するために、得られる変異体分子を血液凝固剤のそれぞれ交差結合する活性についてテストする。基質-酵素相互作用の部位は、核磁気共鳴分析法、結晶学的方法または光親和性ラベリング法などの技術(例えば、de Vosら、1992年、Science 255: 306～312頁;Smithら、1992年、Journal of Molecular Biology 224:899～904頁;Wlodaverら、1992年、FEBS Letters 309:59～64頁を参照されたい)で決定されるような三次元構造の解析によって決定することもできる。

20

【0180】

1つのヌクレオチドを別のヌクレオチドと交換するための核酸配列中への変異の導入は、当業界で公知の方法のいずれかを用いた部位特異的な変異誘発によって実現することができる。特に有用なものは、着目するインサートを有する高次コイル二本鎖のDNAベクターおよび所望の変異を含む2つの合成プライマーを利用する手順である。ベクターの逆ストランドに対してそれぞれ相補的であるオリゴヌクレオチドプライマーは、Pfu DNAポリメラーゼによって温度サイクルの間に伸長する。プライマーが取り込まれると、ねじれ型ニックを含む変異プラスミドが生み出される。温度サイクルに続いて、その産生物を、メチル化およびヘミメチル化DNAに対して特異的であるDpnIで処理して親DNA鋳型を消化させ、変異を含む合成DNAについて選択する。変形体を創製し、特定し単離するための当業界で公知の他の手順、例えば遺伝子シャフリングまたはファージディスプレイ技術なども用いることができる。

30

【0181】

それらの元の細胞からのポリペプチドの分離は、これらに限定されないが、付着細胞培養物からの所望産生物を含む細胞培地の取り出し;非付着細胞を取り出すための遠心分離またはろ過などを含む当業界で公知の任意の方法で実現することができる。

40

【0182】

任意選択で、第VII因子ポリペプチドをさらに精製することができる。精製は、これらに限定されないが、例えば抗第VII因子抗体カラムなどによる親和性クロマトグラフィー(例えば、Wakabayashiら、J. Biol. Chem. 261:11097頁、1986年;およびThimら、Biochem. 27:7785頁、1988年を参照されたい);疎水性相互作用クロマトグラフィー;イオン交換クロマトグラフィー;サイズ排除クロマトグラフィー;電気泳動手法(例えば、分取等電点電気泳動法(IEF)、溶解度差法(例えば、硫酸アンモニウムの沈澱)または抽出法などを含む当業界で公知の任意の方法を用いて実現することができる。一般的には、Scopes, Protei

50

n Purification, Springer-Verlag, New York, 1982年;およびProtein Purification, J. C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989年を参照されたい。精製の後、その調製物は、宿主細胞から誘導された非第VII因子ポリペプチドを10質量%未満、より好ましくは5%未満、最も好ましくは1%未満しか含まないことが好ましい。

【0183】

第VII因子ポリペプチドは、第XI因子Ia、または例えば第IX因子a、カリクレイン、第X因子およびトロンビンなどのトリプシン様の特異性を有する他のプロテアーゼを用いて、タンパク質分解性切断によって活性化させることができる。例えば、Osterudら、Biochem. 11:2853頁(1972);Thomas、米国特許第4,456,591号;およびHednerら、J. Clin. Invest. 71:1836頁(1983)を参照されたい。あるいは、第VII因子ポリペプチドは、それを、例えばMono Q(登録商標)(Pharmacia社)などのイオン交換クロマトグラフィーカラムに通すことによって、または溶液中での自己活性化によって活性化させることができる。次いで、本出願で記載したようにして、得られた活性化された第VII因子ポリペプチドを製剤化し投与することができる。

10

【0184】

グリコペグ化FVIIaなどの第VII因子誘導体は、例えば、W003/031464、W004/099231およびW002/077218などに開示されているようにして、ペプチドのリモデリングおよびグリココンジュゲーションによって作製することができる。

【0185】

第VII因子ポリペプチドの生物学的活性を判定するのに適したアッセイ

20

本発明において有用な第VII因子ポリペプチドは、インビトロでの簡単な予備的テストとして実行できる適切なアッセイによって選択することができる。

【0186】

一段凝固アッセイ(クロットアッセイ)(アッセイ1)

クロットアッセイは、第VIIa因子ポリペプチドが血餅を作る能力を評価するために用いられる。このために、テストするサンプルを、50mMのPIPES緩衝剤、pH7.2、1%BSA、または同様の特性を有する他の関連する緩衝剤中に希釈し、40 μ lを、40 μ lの第VII因子欠失または枯渇血漿ならびに10mMのCa²⁺および合成リン脂質を含む80 μ lのヒト組み換え型組織因子でインキュベートする。凝固時間(クロッティング時間)を測定し、並行ラインアッセイで参照基準を用いて標準曲線と比較する。

30

【0187】

第VII因子ポリペプチドの分解を測定するのに適したアッセイ

rFVIIa断片化および酸化生成物の測定(アッセイ2)

rFVIIaの重鎖断片化および酸化生成物を逆相HPLCによって測定した。RP-HPLCは、5 μ mの粒径および300 \AA の細孔サイズを有する、独占所有物である(proprietary)4.5x250mmブチル結合シリカカラムで実行した。カラム温度:70 $^{\circ}$ C。A-緩衝剤:0.1体積%トリフルオロ酢酸。B-緩衝剤:0.09体積%トリフルオロ酢酸、80体積%アセトニトリル。カラムを、30分間でXから(X+13)%Bへの勾配溶離で溶出させた。FVIIaがおよそ26分の保持時間で溶出するように、Xを調節した。流量:1.0mL/min。検出:214nm。ロード:20~25 μ gのFVIIa。

40

【0188】

rFVIIa凝集生成物の測定(アッセイ3)

凝集したrFVIIa種(二量体、オリゴマー)の含量を決定するために、rFVIIaサンプルをSE-HPLC分析にかけた。SE-HPLC分析は、Waters Protein Pack 300 SW(80013)(7.5mm x 300mm)カラムを用いて実施した。カラム温度:23~25 $^{\circ}$ C。移動相は、0.2M硫酸アンモニウム、5体積%-プロパノール緩衝剤で、0.5mL/minの流量であった。カラムロード:10 μ g~25 μ gのSF-FVIIaであった。UV検出は215nmであった。

【0189】

rFVIIa脱アミド生成物の測定(アッセイ4)

以下の実施例における脱アミド化rFVIIa生成物の含量は、ペプチドマッピングによって記述した。この方法が不純物を正確に定量化ところまでには達していないので、報告した

50

絶対値は指標的な概略推定値としてだけ使えるものである。

【0190】

トリプシン消化を天然タンパク質で実施し、得られたペプチドを、消化後RP-HPLCで分析した。最初に、サンプルを脱塩して、NAP5カラム(GE Healthcare社)を用いて、2M尿素、50mMトリス、2mMのCaCl₂および8mMメチルアミン(pH7.8)を含む消化緩衝液に入れた。緩衝剤交換したrFVIIaを、消化緩衝液を用いて0.15mg/mLに希釈した。再懸濁緩衝液(Promega社)中に可溶化されたトリプシンを、1:10(重量/重量)のトリプシンとrFVIIaの比でrFVIIa消化のために使用した。サンプルを40℃で6時間インキュベートした。インキュベーションした後、サンプルに、トリフルオロ酢酸を加えて2体積%の最終濃度にした。サンプルを直ちに凍結させて酵素反応を停止させるか、またはRP-HPLCで直接分析した。

10

【0191】

RP-HPLCのために、トリプシン消化によって生成したペプチドを、Jupiter C18(3μm、2×150mm、Phenomenex社)カラムを用いて分離した。カラム温度は45℃であり、流量は0.25mL/minであり、ペプチドを215nmで検出した。18μLの体積サンプルを注入した。溶媒は:A-緩衝剤:0.06%トリフルオロ酢酸水溶液およびB-緩衝剤:90%アセトニトリル中の0.055%トリフルオロ酢酸であった。分離を、82minにわたって2.0~29.0%のB緩衝剤、14minにわたって29.0~43.0%のB緩衝剤、35minにわたって43.0~78.0%のB緩衝剤、続いて100%のB緩衝剤で5minの直線勾配を用いて実施した。

【0192】

安定化剤の合成

20

本発明による安定化剤として作用する化合物を作製するための、適切な出発原料を含む方法は、米国特許第7,479,502B2号(2004年6月17日にWO2004/050637として公開)に記載されている;特に、第111段、8~15行の化合物を具体的に参照している実施例17(第109~113段)を見られたい。さらに、WO2005/118554(2005年12月15日公開)はこれらの化合物の作製方法を記載している。36~54頁の実施例、特に実施例1および2(48~54頁)を参照されたい。

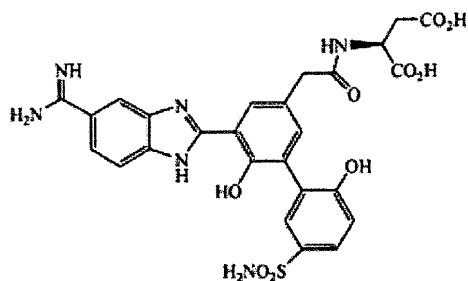
【0193】

化合物(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ビフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸は式Iを有する。

30

【0194】

【化3】



(I)

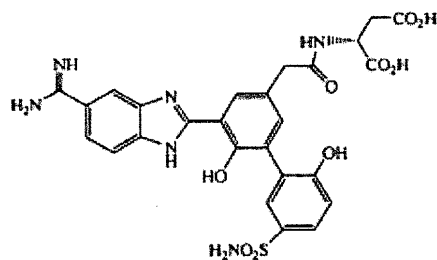
40

【0195】

化合物(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ビフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸は式IIを有する。

【0196】

【化 4】



(II)

10

【実施例】

【 0 1 9 7 】

(実施例1)

(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンズイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイルピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}コハク酸(18)の合成

(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンズイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイルピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}コハク酸(18)の全合成は、米国特許出願公開第2008/0275250A1号の16~23頁に記載され、スキーム1に示されているようにして実行した。

20

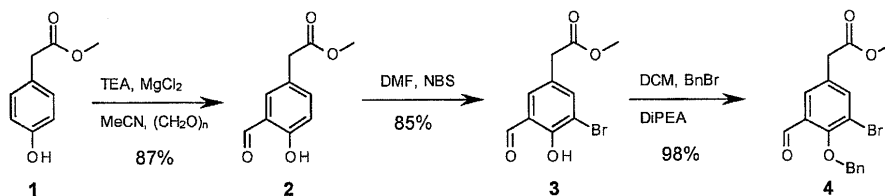
【 0 1 9 8 】

スキーム1。

参照F(4)

【 0 1 9 9 】

【化 5】



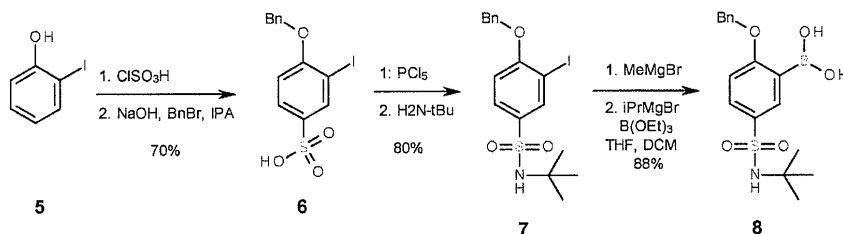
30

【 0 2 0 0 】

参照E(8)(方法A)

【 0 2 0 1 】

【化 6】



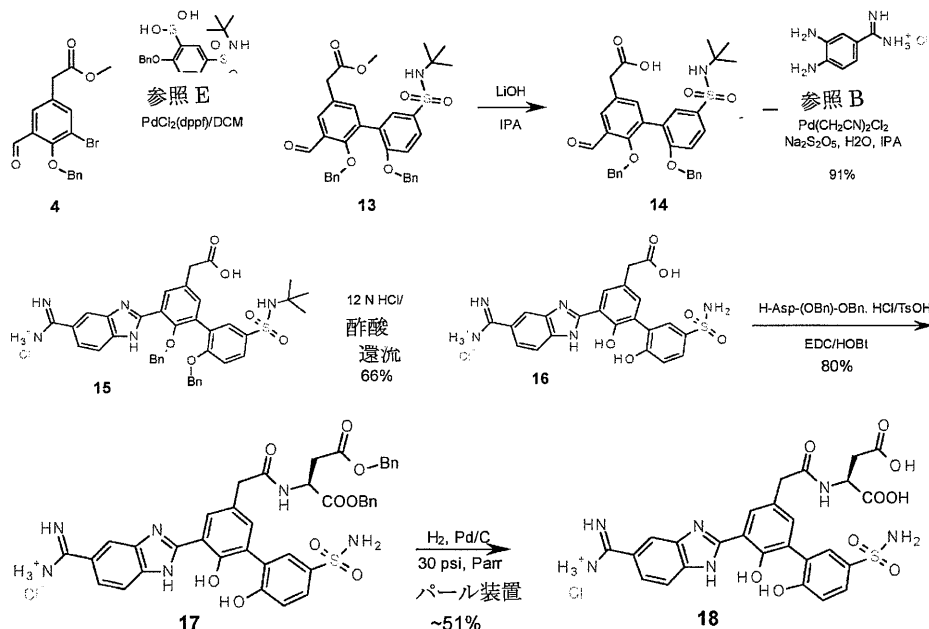
40

【 0 2 0 2 】

米国特許出願公開第2008/0275250号からの実施例1

【 0 2 0 3 】

【化 7】



10

【0204】

(実施例2)

(R)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンズイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイルピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}コハク酸(20)の合成

R-鏡像異性体(20)を、化合物(16)から出発し、(L)-H-Asp-(OBn)-OBn.TsOHを対応する(D)-H-Asp-(OBn)-OBn.TsOH(Bachem社)で交換してスキーム2に示されているようにして、しかし、化合物(17)の合成で使用したのと同様の反応条件を適用して合成した。

【0205】

化合物(19)の合成:

化合物(16)(65.2g)をDMF(650g)に溶解し、溶液を-5℃に冷却した。(D)-Asp(OBn)₂*p-TsOH(64.1g、1.05eq.)およびN-メチル-モルホリン(51.1g、4.0eq.)を加えた。懸濁液を-5℃で溶液が得られるまで攪拌し、HATU(50.0g、1.05eq.)を加えた。反応混合物を-5℃で1時間攪拌し、MeCN(425g)、2-プロパノール(628g)および脱塩水(3117g)の45℃での混合液に移した。澄明溶液に種晶を加え(seeded)、35~40℃で3hr攪拌し、10℃に冷却した。懸濁液を10℃で終夜攪拌し、ろ過した。ろ過ケーキを脱塩水(355g)で洗浄し、真空下、25℃で乾燥して72.1gの化合物(19)をR-異性体として得た。

収率:73.8%

純度(HPLC@230nm):89.3%

【0206】

化合物(20)の合成:

化合物(19)(69.9g)を酢酸(1417g)および脱塩水(720g)の中に懸濁させた。懸濁液を45℃に加熱し、触媒(1.97g、20%Pd(OH)₂)を加え、混合物を1150~1200mbarで1時間水素化して澄明溶液を形成させた。触媒をろ別し、ろ液を乾燥するまで濃縮させた。粗生成物を酢酸(1084g)および水(824g)の中に懸濁し、80℃に加熱して溶液を形成させた。脱塩水(3275g)を徐々に加えた。1.0Lを加えた後、混合物に種晶を加え(T=62℃)、温度を55℃で保持しながら、残りの水を加えた。懸濁液を6hrかけて0℃に冷却し、0℃で終夜攪拌した。生成物をろ過により単離し、ろ過ケーキを脱塩水(314g)で洗浄し、真空下25℃で乾燥して39.3gの化合物(20)(R-異性体)を、黄色結晶性固体として得た。

収率:73.1%

純度(HPLC@230nm):97.7%

【0207】

スキーム2.

20

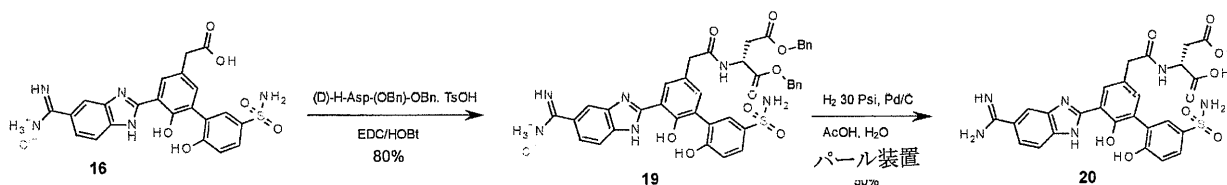
30

40

50

【 0 2 0 8 】

【 化 8 】



【 0 2 0 9 】

(実施例3)

FVIIaの分解

活性部位安定化剤を含む異なる液体製剤のリアルタイムの安定性を、周囲湿度で暗所において5、25および30で貯蔵したカートリッジ中でテストした。リアルタイムの安定性試験は、5で貯蔵し、25または30で短時間貯蔵した場合、安定な液体rFVIIaまたは液体rFVIIa類似体生成物を得ることができることを示している。重鎖断片化は、活性部位安定化剤によって効果的に阻害されている。5で重鎖断片の増大は観察されず、25または30で2カ月間の期間で非常にわずかな増大が観察される。十分な量の酸化防止剤をこの製剤に添加した場合、5で酸化は観察されず、25または30で限定的な酸化が観察される。rFVIIaの脱アミドが観察され、pHおよび温度が増大するとともにそれが増大するのが観察される。安定性試験は、脱アミド化形態のレベルの増大によって、その効力は影響を受けないことを示している。

【 0 2 1 0 】

以下の7つの組成物を作製した：

A: 1mg/mL (=20 μM) rFVIIa、30 μM活性部位安定化剤、128.3mMのNaCl、8mMのCaCl₂·2H₂O、10mMヒスチジン、3.4mMメチオニン、10mMグリシルグリシン、0.07mg/mLのTween80、pH6.7。

B: 4.5mg/mL (=20 μM) rFVIIa、30 μM活性部位安定化剤、128.3mMのNaCl、8.7mMのCaCl₂·2H₂O、10mMヒスチジン、3.4mMメチオニン、10mMグリシルグリシン、0.07mg/mLのTween80、pH6.7。

C: 1mg/mL (=20 μM) rFVIIa、40 μM活性部位安定化剤、128.3mMのNaCl、8mMのCaCl₂·2H₂O、10mMヒスチジン、6.8mMメチオニン、10mMグリシルグリシン、0.5mg/mLボロクサマー188、pH6.7。

D: 1mg/mL (=20 μM) SF-rFVIIa、30 μM活性部位安定化剤、128.3mMのNaCl、8mMのCaCl₂·2H₂O、10mMヒスチジン、3.4mMメチオニン、10mMグリシルグリシン、0.07mg/mLのTween80、pH6.7。

E: 1mg/mL (=20 μM) SF-rFVIIa、128.3mMのNaCl、10mMのCaCl₂·2H₂O、10mMヒスチジン、3.4mMメチオニン、10mMグリシルグリシン、0.07mg/mLのTween80、pH6.5。

F: 1mg/mL (=20 μM) rFVIIa類似体(V158D/E296V/M298Q-FVIIa)、25 μM活性部位安定化剤、128.3mMのNaCl、10mMのCaCl₂·2H₂O、10mMヒスチジン、3.4mMメチオニン、10mMグリシルグリシン、0.07mg/mLのTween80、pH6.5。

G: 1mg/mL (=20 μM) rFVIIa類似体(V158D/E296V/M298Q-FVIIa)、50 μM活性部位安定化剤、128.3mMのNaCl、10mMのCaCl₂·2H₂O、10mMヒスチジン、3.4mMメチオニン、10mMグリシルグリシン、0.07mg/mLのTween80、pH6.5。

【 0 2 1 1 】

組成物を5、25および30で貯蔵した。選択された間隔で、貯蔵からサンプルを取り出し、アッセイ2に記載したようにして重鎖断片化(「HC断片」と表示)および酸化形態物について、アッセイ3に記載したようにして凝集体(「二量体/オリゴマー」と表示)について、アッセイ4に記載したようにして脱アミド化形態物についてテストした。

【 0 2 1 2 】

10

20

30

40

【表 1】

Table 1

製剤	重鎖断片[%]										
	5℃での貯蔵時間(月数)				25℃での貯蔵時間(月数)				30℃での貯蔵時間(月数)		
	0	1	3	6	0.5	1	2	3	0.5	1	2
A	10.3	10.4	10.4	10.0	10.5	10.4	10.8	10.9	-	-	-
B	11.9	12.2	12.3	11.6	12.4	12.2	12.6	12.8	-	-	-
C	6.9	6.8	6.9	6.6	6.9	6.9	6.9	7.2	-	7.1	7.2
D	5.2	5.3	5.5	5.5	5.7	5.9	8.2	10.5	-	-	-
E	6.7	19.6	-	-	19.8	34.8	-	-	-	-	-
F	3.5	-	3.5	-	3.5	4	-	4.8	3.7	4.5	-
G	3.6	-	3.4	-	3.3	3.6	3.4	3.5	3.3	3.6	3.5

10

【 0 2 1 3 】

【表 2】

Table 2

製剤	酸化形態物[%]										
	5℃での貯蔵時間(月数)				25℃での貯蔵時間(月数)				30℃での貯蔵時間(月数)		
	0	1	3	6	0.5	1	2	3	0.5	1	2
A	1.1	1.3	1.6	1.4	1.4	1.5	2.2	2.8	-	-	-
B	1.1	1.4	1.7	1.6	1.8	1.7	2.3	2.9	-	-	-
C	1.9	1.8	2.0	1.9	2.2	2.1	2.6	2.8	-	2.5	3.2
D	1.1	1.3	1.6	1.5	1.6	1.5	2.1	2.8	-	-	-
E	1.3	1.1	-	-	2.1	2.5	-	-	-	-	-
F	2.5	-	2.4	-	2.5	3.1	-	3.7	2.8	3.7	-
G	2.6	-	2.4	-	2.6	3.3	3.2	3.8	2.7	3.6	4.1

20

【 0 2 1 4 】

30

【表 3】

Table 3

製剤	二量体/オリゴマー[%]										
	5℃での貯蔵時間(月数)				25℃での貯蔵時間(月数)				30℃での貯蔵時間(月数)		
	0	1	3	6	0.5	1	2	3	0.5	1	2
A	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	0.4	0.4	0.5	-	-	-
B	1.2	1.1	1.2	1.0	1.3	0.9	0.9	1.2	-	-	-
C	8.7	8.0	7.7	7.3	0.4	0.4	0.4	0.4	-	0.5	0.5
D	0.4	0.4	0.4	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	-	-	-
E	1.3	1.4	-	-	1.1	1.3	-	-	-	-	-
F	2.2	-	2.2	-	2.0	1.8	-	2.1	1.9	1.8	-
G	2.0	-	2.4	-	2.0	1.9	2.2	2.1	1.9	1.9	2.2

40

【 0 2 1 5 】

【表 4】

Table 4

脱アミド化物[%]				
製剤	5℃での貯蔵時間(月数)		25℃での貯蔵時間(月数)	
	0	3	1	3
A	5	6	11	25
B	5	6	11	26
C	4	6	12	25
D	4	7	10	28
E	4	-	10	-
F	-	-	-	-
G	-	-	-	-

10

【0216】

(実施例4)

FVIIaの効力

実施例3に記載したようにして構成した7つの製剤A、B、C、D、E、FおよびGを、40℃で14日間貯蔵した。毎日、サンプルを貯蔵から取り出し、効力(FVIIa活性)についてテストした。効力をクロットアッセイによって示した(アッセイ番号1に記載したようにして)。

20

【0217】

【表 5】

Table 5

効力[IU/ml]							
製剤	5℃での貯蔵時間(月数)			25℃での貯蔵時間(月数)			30℃での貯蔵時間(月数)
	0	1	3	1	2	3	3
A	46530	-	52600	47300	44000	-	-
B	231806	-	252100	230900	239600	-	-
C	51200	50700	-	50400	-	-	-
D	54585	-	59300	54400	-	-	-
E	60755	-	-	-	-	-	-
F	677819	-	710336	-	-	712988	744392
G	689020	-	-	-	-	-	-

30

【0218】

この実験は、FVIIa活性(効力)が、式Iを有する活性部位安定化剤存在下で維持されることを示している。

【0219】

40

(実施例5)

式II(R-異性体)を有する活性部位安定化剤存在下でのrFVIIaの分解
式II(R-異性体)で示される活性部位安定化剤を含む異なる液体製剤におけるrFVIIaの加速安定性を、それぞれ25℃および40℃でテストした。テストは、周囲湿度および暗所で貯蔵した1mLのHPLCバイアル中で実施した。

【0220】

以下の組成物を作製した：

H. 1mg/mLのSF-rFVIIa、50 μM活性部位安定化剤(R-異性体)、10mMのCaCl₂・2H₂O、128.3mMのNaCl、10mMグリシルグリシン、3.4mMのL-メチオニン、10mMのL-ヒスチジン、0.07mg/mLのtween80、0.5体積%ジメチルスルホキシド、pH6.0

50

1.1mg/mLのSF--FVIIa、150 μM活性部位安定化剤(R-異性体)、10mMのCaCl₂・2H₂O、128.3mMのNaCl、10mMグリシルグリシン、3.4mMのL-メチオニン、10mMのL-ヒスチジン、0.07mg/mLのtween80、0.5体積%ジメチルスルホキシド、pH6.0

【0221】

組成物Hを25 および40 で貯蔵し、組成物Iを40 で貯蔵した。サンプルを選択された間隔(0、1、7および14日目)で貯蔵から取り出し、アッセイ2で記載したようにして重鎖断片化および酸化について、アッセイ3で記載したようにして凝集についてテストした。

【0222】

【表6】

Table 6

重鎖断片[%]								
製剤	25℃での貯蔵時間(月数)				40℃での貯蔵時間(月数)			
	0	1	7	14	0	1	7	14
H	6.3	6.3	6.4	6.4	6.0	6.3	6.0	5.4
I	-	-	-	-	6.3	6.2	6.4	5.1

10

【0223】

【表7】

Table 7

酸化形態物[%]								
製剤	25℃での貯蔵時間(月数)				40℃での貯蔵時間(月数)			
	0	1	7	14	0	1	7	14
H	2.1	1.7	1.7	1.6	1.6	2.0	2.6	3.6
I	-	-	-	-	2.7	2.8	4.4	4.5

20

【0224】

【表8】

Table 8

二量体/オリゴマー[%]								
製剤	25℃での貯蔵時間(月数)				40℃での貯蔵時間(月数)			
	0	1	7	14	0	1	7	14
H	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.3
I	-	-	-	-	0.2	0.2	-	0.2

30

【0225】

この試験は、25 または40 の短期間貯蔵で、活性部位安定化剤である添加剤を用いて安定な液体rFVIIa生成物を得ることができることを示している。25 または40 、14日間で、重鎖断片または凝集の増大は観察されなかった。不適切な量の酸化防止剤が製剤に加えられた場合、25 で酸化は観察されなかったが、40 で酸化が観察された。

40

【0226】

(実施例6)

活性部位安定化剤存在下でのrFVIIaの分解

S-2-[3-(4-カルバムイミドイルフェニル)ウレイド]-N-[1-(3-メトキシフェニル)-エチル]-アセトアミド(式A)(「008」と指定)を含む異なる液体製剤におけるrFVIIaの加速安定性を、それぞれ25 および40 でテストした。テストは、周囲湿度および暗所で貯蔵した1mLのHPLCバイアル中で実施した。

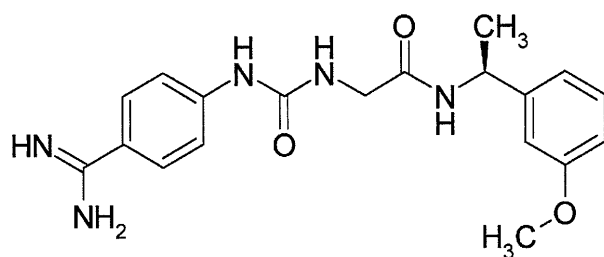
【0227】

50

S-2-[3-(4-カルバムイミドイルフェニル)ウレイド]-N-[1-(3-メトキシフェニル)-エチル]-アセトアミド:

【 0 2 2 8 】

【 化 9 】



(A)

10

【 0 2 2 9 】

以下の組成物を作製した:

J. 1mg/mLのSF-rFVIIa、150 μ MのS-2-[3-(4-カルバムイミドイルフェニル)ウレイド]-N-[1-(3-メトキシフェニル)-エチル]-アセトアミド、10mMのCaCl₂·2H₂O、128.3mMのNaCl、10mMグリシルグリシン、3.4mMのL-メチオニン、10mMのL-ヒスチジン、0.07mg/mLのtween80、0.5体積%ジメチルスルホキシド、pH6.0

20

K. 1mg/mLのSF-rFVIIa、500 μ MのS-2-[3-(4-カルバムイミドイルフェニル)ウレイド]-N-[1-(3-メトキシフェニル)-エチル]-アセトアミド、10mMのCaCl₂·2H₂O、128.3mMのNaCl、10mMグリシルグリシン、3.4mMのL-メチオニン、10mMのL-ヒスチジン、0.07mg/mLのtween80、0.5体積%ジメチルスルホキシド、pH6.0

【 0 2 3 0 】

組成物JおよびKを25 および40 で貯蔵した。サンプルを選択された間隔(0、1、7および14日目)で貯蔵から取り出し、アッセイ2で記載したようにして重鎖断片化および酸化についてテストした。アッセイ2(=RP-HPLC)においてそれまで特定されていなかった分解生成物の出現が、40 で貯蔵するとはっきり見えてきた。凝集を、アッセイ3で記載したようにして分析した。

30

【 0 2 3 1 】

【 表 9 】

Table 9

重鎖断片[%]								
製剤	25℃での貯蔵時間(月数)				40℃での貯蔵時間(月数)			
	0	1	7	14	0	1	7	14
J	6.3	6.5	7.1	8.0	6.4	6.2	7.6	8.5
K	6.1	6.6	6.8	7.6	6.8	6.6	7.4	8.7

40

【 0 2 3 2 】

【 表 1 0 】

Table 10

酸化形態物[%]								
製剤	25℃での貯蔵時間(月数)				40℃での貯蔵時間(月数)			
	0	1	7	14	0	1	7	14
J	1.7	1.5	2.3	1.8	1.5	2.1	3.1	4.2
K	1.7	1.4	1.4	1.9	1.7	2.5	3.4	4.5

50

【 0 2 3 3 】

【 表 1 1 】

Table 11

未確認分解生成物[%]								
製剤	25℃での貯蔵時間(月数)				40℃での貯蔵時間(月数)			
	0	1	7	14	0	1	7	14
J	1.4	1.5	2.0	2.0	1.7	2.2	5.7	8.9
K	1.7	1.5	1.3	1.4	1.2	2.1	5.1	7.0

10

【 0 2 3 4 】

【 表 1 2 】

Table 12

二量体/オリゴマー[%]								
製剤	25℃での貯蔵時間(月数)				40℃での貯蔵時間(月数)			
	0	1	7	14	0	1	7	14
J	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	1.2	3.3	4.3
K	0.4	0.2	0.2	0.3	0.2	0.9	3.7	10.0

20

【 0 2 3 5 】

この試験は、式II(R形)に示した化合物を含む液体rFVIIa生成物は、JおよびKの条件で150 μM ~ 500 μMの範囲の式A添加剤を用いて25 または40 で短期間貯蔵の間、液体rFVIIa生成物と比較して、より良好な安定性を達成したことを示している。rFVIIa重鎖断片、未確認分解生成物、酸化形態および凝集の増大が40 、14日間で観察された。重鎖断片を除くすべての分解生成物の増大は、25 でわずかであった。

【 0 2 3 6 】

(実施例7)

活性部位安定化剤存在下でのrFVIIaの生物活性

1.25;2.5;5;10および12.5mg/kgの用量で、rFVIIaに対して1:1.75のモル比で、式Iを有する活性部位安定化剤と一緒に製剤化された組み換え型第VIIa因子(rFVIIa)のインビボでの生物学的効能および効力を、FVIIIノックアウト(F8-KO)マウスにおける尾部出血で試験した(Bi L、Sarkar R、Naas T、Lawler AM、Pain J、Shumaker SLら、Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies. Blood 1996年;88:3446~)。

30

【 0 2 3 7 】

尾部出血を、イソフルラン麻酔F8-KOマウスにおいてマウスの尾部静脈にivでrFVIIa、rFVIIa:活性部位安定化剤(1:1.75)またはピヒクルを投与5min後に、尾部の先端を4mm切断して開始させた。出血時間および血液損失を、他で記載されているようにして37 生理食塩水中で30分間測定した(Elm T; Karpf DM; Ovlisen K; Pelzer H; Ezban M; Kjalke M; Tranholm M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new recombinant FVIII (N8) in haemophilia A mice. Haemophilia、2012年;18 (1)、139 ~ 145頁)。血液損失ED50は、それぞれ、rFVIIaについて2.12mg/kg(95%CI 1.28 ~ 3.53)と計算され、rFVIIa:活性部位安定化剤(1:1.75)について2.05mg/kg(95%CI 0.92 ~ 4.53)と計算され、p=0.94であった。出血時間対rFVIIaおよびrFVIIa:活性部位安定化剤(1:1.75)の用量は非常に類似した用量応答曲線を示す。

40

【 0 2 3 8 】

結論として、F8-KOマウスでの急性尾部出血において、rFVIIaと、活性部位安定化剤と一緒に製剤化されたrFVIIaの間に用量応答における有意差はなかった。

【 0 2 3 9 】

50

(実施例8)

活性部位安定化剤存在下でのSF-rFVIIaの生物活性

無血清組み換え型FVIIa(SF-rFVIIa)、および式Iに示した活性部位安定化剤と1:2.5のモル比で一緒に製剤化されたSF-rFVIIaのインビボでの効果を、F8-K0マウスにおいて尾部出血モデルでの同じ設計で、1;2.5;5;10および15mg/kgの濃度で試験した。この試験において、血液損失ED₅₀はそれぞれ、SF-rFVIIaについて2.1mg/kgと計算され、SF-rFVIIa:活性部位安定化剤(1:2.5)について2.6mg/kgと計算され、 $p=0.53$ (データは示さず)であった。出血時間対用量および血液損失ならびに出血時間対SF-FVIIaおよびSF-rFVIIa:活性部位安定化剤の曝露は、非常に類似した用量応答曲線を示す。SF-rFVIIaの曝露平均値は、活性部位安定化剤と一緒に製剤化した場合(2元配置(two way)ANOVA $P<0.01$)、ELISAと血餅活性の両方で測定して、SF-rFVIIaへの大幅に増大した曝露を示した。最も高い用量(15mg/kg)の後で、血漿中で測定された抗原濃度は、それぞれ、SF-rFVIIa、および活性部位安定化剤($P=NS$)を含むSF-rFVIIaについて $1168 \pm 50\text{nM}$ および $1365 \pm 152\text{nM}$ であった。同じ用量で、血餅活性は、SF-rFVIIaについて1195nMであり、活性部位安定化剤と一緒に製剤化した場合のSF-rFVIIa($P<0.001$)について1735nMであった。曝露におけるこの増大にもかかわらず、活性部位安定化剤のEC₅₀推定値に対する統計的に有意な影響は確認されなかった。

【0240】

結論として、血友病Aマウスでの尾部出血モデルにおいて、SF-rFVIIa単独か、または活性部位安定化剤(1:2.5)と一緒に製剤化されたSF-rFVIIaについて同等の用量応答関係が実証された。出血の正常化が、15mg/kgのSF-rFVIIa単独、および活性部位安定化剤と一緒に製剤化されたSF-rFVIIaで観察された。SF-rFVIIaを活性部位安定化剤と共投与した場合、SF-rFVIIa(ELISAおよび血餅活性)への曝露の増大が観察された。より高い血漿レベルにもかかわらず、EC₅₀の有意な差は検出されなかった。

【0241】

(実施例9)

活性部位安定化剤存在下でのFVIIa配列変形体、V158D/E296V/M298Q-FVIIaの生物活性

同じF8-K0マウスでの尾部出血モデルにおいて、SF-rFVIIaと一緒に製剤化した場合のS形またはR形の活性部位安定化剤の使用効果、および単独かまたは式Iに示した活性部位安定化剤と併用(1:2.5)して投与されたrFVIIa変形体(V158D/E296V/M298Q-FVIIa)(Vatreptacog Alfa)の効果を試験した(Table13(表13))。

【0242】

Vatreptacog Alfaは、FVIIa配列変形体、V158D/E296V/M298Q-FVII(番号付けはヒト野生型FVIIaの配列、配列番号1を参照する)である。ここでは、野生型ヒト配列の3つのアミノ酸が置き換えられている。

【0243】

血液損失は、正常なC57BLマウスと比較してビヒクル投与F8-K0マウスにおいて有意に長かった($p<0.001$)。10mg/kgのSF-rFVIIa、または1:1もしくは1:2.5の比で式I(S形)に示した活性部位安定化剤と式II(R形)(1:1)を有する活性部位安定化剤を含むSF-rFVIIaの投与は、F8-K0マウスにおいて血液損失は有意に減少していた(F8-K0対照マウスに対して $p<0.001$)。3mg/kgのVatreptacog AlfaまたはVatreptacog Alfa:活性部位安定化剤(1:2.5)の投与は、F8-K0マウスにおいて血液損失は有意に減少していた(F8-K0対照マウスに対して $p<0.001$)。化合物投与群からの血液損失は、ビヒクル処置されたC57BL対照群の血液損失と有意な差はなかった。

【0244】

結論として、SF-FVIIaおよびVatreptacog Alfa単独か、または最大で1:2.5のモル比活性部位安定化剤と一緒に製剤化されたものは、F8-K0マウスにおいて、血液損失を正常化した。活性部位安定化剤のR形とS形の間に有意な差は見られなかった。

【0245】

【表 13】

Table13 F8-KOマウスにおける血液損失(ヘモグロビンnmol)としてのインビボでの尾部出血

群	用量	n	平均	sem
	mg/kg			
F8-KO 対照	0	8	5571	504
C57BL 対照	0	8	833	409
SF-FVIIa 10 mg/kg	10	10	631	158
SF-rFVIIa:式 I(S 形)を有する薬剤 1:1	10	8	535	202
SF-rFVIIa:式 I(S 形)を有する薬剤 1:2.5	10	8	801	236
SF-rFVIIa:式 II(R 形)を有する薬剤 1:1	10	8	1243	511
Vatreptacog Alfa	3	8	1207	500
Vatreptacog Alfa:式 I(S 形)を有する薬剤 1:2.5	3	8	1009	363

10

【0246】

20

尾部の先端を4mmカットして出血を誘発させる5分前に、i.v.注射した。すべての群は、F8-KOマウスと比較して有意に異なっていたが($p<0.0001$)、投与群またはC57BL対照マウスとの間に有意な差は見られなかった(1元配置ANOVA)。

【0247】

結論として、これらの実験は、式IおよびII(S形またはR形の)に示した活性部位安定化剤が、F8-KOマウスでの尾部出血モデルにおいて、rFVIIa、SF-FVIIaまたはVatreptacog Alfaの生物学的活性を損なっていないことを示している。

【0248】

(実施例10)

活性部位安定化剤のrFVIIaポリペプチドとの結合

30

すべてのプロテアーゼを、結合緩衝液:10mMのHEPES pH7.4、150mMのNaCl、0.005体積%界面活性剤P20、5mMのCaCl₂中で十分に透析させた。別段の表示のない限り、すべての結合実験を結合緩衝液中で実施した。式Iに示した活性部位安定化剤を50mMトリスpH8.0に9mMの最終濃度で溶解すると黄色になった。結合パラメーターの決定のための選択方法として等温滴定熱量計(GE healthcare社からのiTC₂₀₀)を選択した。各iTC₂₀₀実験は、セルをプロテアーゼ(およそ200μL)で満たし、シリンジを活性部位安定化剤(およそ40μL)で満たすことを含んだ。温度を所定の通り設定し、プロテアーゼを、所与の実験条件下で(およそ10分間)平衡化させた。典型的には、プロテアーゼを含むセル中への、活性部位安定化剤の17~20回の注射(2または2.5μLの)を実施した。最初の注射は常に0.2μLであり、これは最終データ分析から排除した。攪拌速度は700~1000rpmに設定した。データ収集のための経過期間は、高フィードバックモード設定で5secであった。各滴定は120sec間隔をあけた。生データを処理して、ベースラインを設定し、各ピークを積分して最終的な等温線を得た。活性部位安定化剤のプロテアーゼとの結合の特性評価を完了させるために、この等温線を単一サイトモデルに当てはめてK_d、化学量論(n)、HおよびS値を得た。各結合実験は少なくとも2回繰り返した。Table14(表14)、Table15(表15)およびTable16(表16)に、以下に示すような様々な溶液条件下での、活性部位結合剤のSF-FVIIaおよびVatreptacog alfaへの結合をまとめる。

40

【0249】

【表 1 4】

Table14

活性部位安定化剤の結合、 K_d			
	式A	式II	式I
SF-rFVIIa	1.78 μ M	12nM	20nM

【 0 2 5 0】

Table14(表14): iTC₂₀₀を用いた、異なる活性部位安定化剤のSF-FVIIaへの結合についての解離定数、 K_d のまとめ。測定は結合緩衝液中、20℃で行った。式A添加剤は、1.78 μ Mの親和性でSF-FVIIaと結合した。式II(R形)を有する活性部位安定化剤は12nMの親和性でSF-rFVIIaと結合し、式I(S形)を有する活性部位安定化剤は20nMの親和性でSF-rFVIIaと結合した。

10

【 0 2 5 1】

【表 1 5】

Table15

式I(S形)を有する活性部位安定化剤の結合、 K_d		
温度	20℃	37℃
SF-rFVIIa	20nM	0.334 μ M
rFVIIa	12.9nM	0.296 μ M
V158D/E296V/M298Q-FVIIa	2.18nM	0.046 μ M

20

【 0 2 5 2】

Table15(表15): iTC₂₀₀を用いた、式I(S形)を有する活性部位安定化剤のSF-rFVIIa、rFVIIaおよびV158D/E296V/M298Q-FVIIaとの結合についての解離定数、 K_d のまとめ。測定は、結合緩衝液中で、表に示すように異なる温度(20℃および37℃)で行った。式I(S形)を有する活性部位安定化剤のSF-rFVIIa、rFVIIaおよびVatreptacog alfaとの結合は、高温でより弱いことが観察された。20℃および37℃での結合の倍率差(fold difference)は、SF-FVIIa、rFVIIaおよびV158D/E296V/M298Q-FVIIaについてそれぞれ17倍、23倍および21倍であった。

30

【 0 2 5 3】

【表 1 6】

Table16

20℃での式I(S形)を有する活性部位安定化剤の結合、 K_d				
pH	5.5	6.5	7.4	8.5
SF-rFVIIa	1.56 μ M	43nM	20nM	0.13 μ M
V158D/E296V/M298Q-FVIIa	77nM	9nM	2.18nM	6nM

40

【 0 2 5 4】

Table16(表16): iTC₂₀₀を用いた、式I(S形)を有する活性部位安定化剤のSF-rFVIIaおよびV158D/E296V/M298Q-FVIIaとの結合についての解離定数、 K_d のまとめ。測定は結合緩衝液中でpHを変えながら行った。両方のプロテアーゼは、式I(S形)を有する活性部位安定化剤に対してpH7~7.5で最も高い親和性を示した。SF-rFVIIaと比較して、V158D/E296V/M298Q-FVIIaは、pHについてより低い依存性を示した。

【 0 2 5 5】

(実施例11)

X線結晶学で説明される、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-

50

コハク酸によるFVIIaの活性部位安定化

材料

7mg/mLのタンパク質濃度、および140 μ M超の(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸濃度での10mMの2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-プロパン-1,3-ジオール、100mMのNaCl、15mMのCaCl₂ pH7.4からなる緩衝液中のGla-ドメイン切断形態のヒトFVIIa(配列番号1アミノ酸残基46-406)。

【0256】

方法

タンパク質結晶化

(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸との複合体でのGla-ドメイン切断形態のFVIIaを、15%(重量/体積)ポリエチレングリコール20000、100mMの2-[4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-イル]エタンスルホン酸pH7.0を含むリザーバ溶液に対する、100nLタンパク質溶液および100nLリザーバ溶液からなる液滴の平衡化により、20 でのシッティングドロップ蒸気拡散実験で結晶化させた。2週間後に結晶が現れ、さらに2週間成長し続けた。結晶および結晶化ドロップを1 μ Lの4MトリメチルアミンNオキシドニ水和物で覆い、この結晶を、トリメチルアミンNオキシドニ水和物を通して引きずり、0.06mm直径のlitholoop(Molecular Dimensions Limited社)に取り付け、続いて回折分析用に、結晶を液体窒素中でフラッシュ冷却させた。

【0257】

X線回折データ収集、構造決定および精密化

回折データを、198.15mmの結晶と検出器の間の距離および0.5°のフレーム当たりの振動幅で、1.000 の波長で動作するMaxlab IIシンクロトロンにおいてMXビームラインで収集した。生データ画像を、mosflmプログラム(Leslie and Powell、NATO Science Series、245、41~51頁(2007))およびscalaプログラム(Pottertonら、Acta Crystallogr. D59、1131~1137頁(2003))を用いて指数化、積分およびスケーリングした。結晶の空間群はP2(1)2(1)2(1)であり、単位格子パラメータはa=94.1、b=94.2、c=107.3、 α =90°、 β =90°、 γ =90°であった。データは1.90 の解像度まで収集した。データを、ツインオペレータ(K,H,-L)および0.495のツインフラクションでツイン化した。構造を、Molrepソフトウェアを用いた分子置換法(Vagin and Teplyakov、J. Appl. Cryst. 30、1022~1025頁(1997))により、CCP4iプログラムパッケージソフト(suite)(Pottertonら、Crystallogr. D59、1131~1137頁(2003))で実行して解いた。検索モデルは、Bannerら(Nature 380、41~46頁(1996))によって記載されているヒトFVIIaの構造であった。Gla-ドメイン切断FVIIaの2つのコピーを、非対称ユニットで配置した。構造精密化を、CCP4iプログラムパッケージソフトからRefmac5(Murshudovら、Acta Crystallogr. D53、240~255頁(1997))を用いて実施し、Cootバージョン7(Emsleyら、Acta Crystallogr. D66、486~501頁(2010))を、手作業による構造再構築および検証のために使用した。

【0258】

結果および考察

Gla-ドメイン切断FVIIaと、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸との複合体の結晶構造座標は、非対称ユニットのFVIIa分子の一方のコピーからのアミノ酸残基L89-R144、I153-P406(配列番号1)、および非対称ユニットのFVIIa分子の他方のコピーからのアミノ酸残基L89-K143、I153-K316、P321-P406(配列番号1)を含んでいた。精密化された構造の総括的R因子は18.0%であり、フリーR因子は20.6%であった。全相関係数は0.96であり、回折成分精度指数(diffraction-component precision index)、DPI=0.02 であった(Cruickshank、Acta Crystallogr. D55、583~601頁(1999))。構造中の理想結合距離からの結合距離の標準偏差=0.0044 であり、理想結合角からの標準偏差=1.1246°であった(Engh and Huber、Acta Crystallogr. A47、392~400頁(1991))。Gla-

10

20

30

40

50

ドメイン切断FVIIa分子と(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸の間の4以下の分子間距離を示すアミノ酸残基を、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸相互作用アミノ酸残基(配列番号1)と指定した。分子間距離の分析を、CCP4プログラムパッケージソフトのプログラムコンタクト(Program Contact)を用いて実施し(Pottertonら、Acta Crystallogr. D59、1131~1137頁(2003))、Table17(表17)に挙げたアミノ酸残基が、非対称ユニットでの両方のFVIIa分子において、(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸相互作用アミノ酸残基を含むことを示した。

10

【0259】

【表17】

Table17

(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸相互作用アミノ酸(配列番号1に関する位置)
H193
C194
D196
K197
D338
S339
C340
K341
S344
V362
S363
W364
G365
G367
C368
G375

20

30

【0260】

原子レベルで、FVIIaの活性部位と(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸の間の相互作用は、Table18(表18)に挙げた原子に関係している。

40

【0261】

【表 18 A】

Table18

非対称ユニット複合体1					
(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸原子数	原子タイプ	FVIIa アミノ酸残基の数および鎖	アミノ酸残基タイプ	原子名	原子間距離(Å)
C35	C	341 H	Lys	NZ	3.8
C17	C	341 H	Lys	NZ	3.6
O19	O	341 H	Lys	CD	3.6
		341 H	Lys	CE	3.1
		341 H	Lys	NZ	2.5
C14	C	341 H	Lys	CG	3.9
C21	C	193 H	His	NE2	4.0
C24	C	193 H	His	NE2	3.8
		193 H	His	CD2	3.7
C30	C	193 H	His	CD2	3.7
C28	C	193 H	His	O	3.5
S29	S	193 H	His	O	3.5
		197 H	Lys	NZ	3.9
O33	O	197 H	Lys	CD	3.4
		197 H	Lys	CE	3.4
		197 H	Lys	NZ	2.9
O34	O	193 H	His	O	3.8
		196 H	Asp	CB	4.0
		197 H	Lys	N	3.8
		197 H	Lys	CB	3.7
		197 H	Lys	CG	3.5
		197 H	Lys	CD	3.5
N32	N	193 H	His	C	3.8
		193 H	His	O	2.6
		196 H	Asp	CB	3.4
		196 H	Asp	CG	3.4
		196 H	Asp	OD2	3.1
C27	C	193 H	His	O	3.7
		194 H	Cys	O	4.0
C25	C	193 H	His	NE2	3.9
		193 H	His	CD2	4.0
O31	O	341 H	Lys	O	3.6
C22	C	193 H	His	NE2	3.5

【表 18B】

O23	O	341 H	Lys	O	3.6
		344 H	Ser	CB	3.7
		344 H	Ser	OG	2.8
		193 H	His	CE1	3.6
		193 H	His	NE2	2.7
		193 H	His	CD2	3.6
C13	C	341 H	Lys	CG	3.6
C12	C	341 H	Lys	CA	3.7
		341 H	Lys	CG	3.7
N10	N	363 H	Ser	O	3.6
		341 H	Lys	CA	3.5
		344 H	Ser	OG	2.9
C4	C	363 H	Ser	O	3.6
		364 H	Trp	CA	3.8
		340 H	Cys	C	4.0
		341 H	Lys	N	3.8
		341 H	Lys	CA	3.9
		344 H	Ser	OG	3.5
C3	C	362 H	Val	CG1	3.7
		363 H	Ser	C	3.6
		363 H	Ser	O	3.5
		364 H	Trp	N	3.7
		364 H	Trp	CA	3.7
		340 H	Cys	C	3.9
		340 H	Cys	O	3.7
		344 H	Ser	OG	3.5
C2	C	362 H	Val	CG1	3.8
		339 H	Ser	OG	4.0
		364 H	Trp	N	3.8
		364 H	Trp	CA	3.8
		364 H	Trp	C	3.8
		364 H	Trp	O	3.8
		339 H	Ser	O	3.9
N11	N	341 H	Lys	CG	3.9
		364 H	Trp	CA	3.9
C5	C	365 H	Gly	N	3.9
		341 H	Lys	N	4.0
C6	C	364 H	Trp	C	3.6
		365 H	Gly	N	3.4
		365 H	Gly	CA	3.9
		367 H	Gly	O	3.2
		365 H	Gly	O	3.8

10

20

30

40

【表 18 C】

C1	C	364 H	Trp	CA	3.9
		364 H	Trp	C	3.5
		364 H	Trp	O	3.5
		365 H	Gly	N	3.7
		339 H	Ser	O	3.5
C7	C	338 H	Asp	OD1	3.7
		338 H	Asp	CG	3.9
		338 H	Asp	OD2	3.5
		364 H	Trp	C	3.8
		364 H	Trp	O	3.5
		365 H	Gly	N	4.0
		365 H	GLy	CA	3.9
		339 H	Ser	O	3.0
		367 H	Gly	O	4.0
N9	N	338 H	Asp	OD1	2.9
		339 H	Ser	OG	3.3
		375 H	Gly	CA	3.2
		338 H	Asp	CG	3.5
		338 H	Asp	OD2	3.4
		364 H	Trp	O	3.6
		339 H	Ser	C	3.9
		339 H	Ser	O	3.1
N8	N	338 H	Asp	OD1	3.8
		338 H	Asp	CG	3.6
		338 H	Asp	OD2	2.8
		365 H	Gly	CA	3.6
		339 H	Ser	O	3.4
		367 H	Gly	O	3.0
		368 H	Cys	CA	3.9
		368 H	Cys	CA	3.9
非対称ユニット複合体2					
O45	O	341 M	Lys	NZ	3.9
C36	C	341 M	Lys	CE	3.8
		341 M	Lys	NZ	3.9
C35	C	341 M	Lys	CE	3.9
N18	N	341 M	Lys	CE	3.7
C17	C	341 M	Lys	CE	3.7
O19	O	341 M	Lys	CD	3.9
		341 M	Lys	CE	3.9
C15	C	341 M	Lys	CE	3.5
C14	C	341 M	Lys	CE	3.6
C20	C	341 M	Lys	CE	3.6
C21	C	193 M	His	NE2	4.0
		341 M	Lys	CE	3.7
C24	C	193 M	His	NE2	3.9
		193 M	His	CD2	3.7

【表 18D】

C30	C	193 M	His	CD2	3.9
C28	C	193 M	His	O	3.8
S29	S	193 M	His	O	3.8
O33	O	197 M	Lys	CG	3.8
		197 M	Lys	CD	3.5
		197 M	Lys	CE	3.9
O34	O	197 M	Lys	CG	3.9
		197 M	Lys	N	3.5
		197 M	Lys	CB	3.9
		193 M	His	O	3.3
		196 M	Asp	CB	3.6
		194 M	Cys	O	4.0
		196 M	Asp	N	3.7
		196 M	Asp	CA	4.0
N32	N	193 M	His	O	3.7
		196 M	Asp	CB	3.6
C27	C	193 M	His	O	4.0
C25	C	193 M	His	NE2	3.9
		193 M	His	CD2	4.0
O31	O	193 M	His	NE2	3.9
		341 M	Lys	O	3.5
		344 M	Ser	OG	4.0
C22	C	193 M	His	NE2	3.5
		193 M	His	CD2	4.0
		341 M	Lys	CE	3.8
O23	O	193 M	His	CE1	3.6
		193 M	His	NE2	2.6
		193 M	His	CD2	3.5
		341 M	Lys	O	3.7
		344 M	Ser	CB	3.7
		344 M	Ser	OG	2.9
C13	C	341 M	Lys	CG	3.7
		341 M	Lys	CE	3.8
C12	C	341 M	Lys	CG	3.6
		341 M	Lys	CA	3.9
N10	N	363 M	Ser	O	3.5
		341 M	Lys	CA	3.6
		344 M	Ser	OG	2.9
C4	C	363 M	Ser	O	3.5
		364 M	Trp	CA	3.8
		340 M	Cys	O	4.0
		341 M	Lys	N	3.9
		341 M	Lys	CA	3.8
		344 M	Ser	OG	3.5

10

20

30

40

【表 1 8 E】

C3	C	363 M	Ser	C	3.7
		363 M	Ser	O	3.5
		364 M	Trp	N	3.8
		364 M	Trp	CA	3.8
		340 M	Cys	C	3.9
		340 M	Cys	O	3.5
		344 M	Ser	OG	3.5
		362 M	Val	CG1	3.8
C2	C	364 M	Trp	C	3.9
		364 M	Trp	O	3.9
		364 M	Trp	N	4.0
		364 M	Trp	CA	3.9
		340 M	Cys	C	4.0
		340 M	Cys	O	3.8
		339 M	Ser	OG	3.9
		362 M	Val	CG1	3.8
N11	N	341 M	Lys	CG	3.7
C5	C	365 M	Gly	N	3.8
		364 M	Trp	C	4.0
		364 M	Trp	CA	3.8
C6	C	365 M	Gly	N	3.3
		364 M	Trp	C	3.6
		365 M	Gly	CA	3.8
		364 M	Trp	CA	4.0
		367 M	Gly	O	3.3
C1	C	365 M	Gly	N	3.7
		364 M	Trp	C	3.5
		364 M	Trp	O	3.7
		364 M	Trp	CA	4.0
		339 M	Ser	O	3.7
C7	C	364 M	Trp	C	3.9
		364 M	Trp	O	3.7
		365 M	Gly	CA	4.0
		339 M	Ser	O	3.1
		367 M	Gly	O	3.8
		338 M	Asp	CG	3.9
		338 M	Asp	OD1	3.7
		338 M	Asp	OD2	3.5
		339 M	Ser	C	4.0

10

20

30

40

【表 18 F】

N9	N	364 M	Trp	O	3.7
		339 M	Ser	O	3.2
		338 M	Asp	CG	3.6
		338 M	Asp	OD1	2.9
		338 M	Asp	OD2	3.5
		339 M	Ser	OG	3.1
		375 M	Gly	CA	3.3
		339 M	Ser	C	3.9
N8	N	365 M	Gly	CA	3.8
		339 M	Ser	O	3.3
		367 M	Gly	C	3.8
		367 M	Gly	O	2.8
		368 M	Cys	CA	3.8
		338 M	Asp	CG	3.5
		338 M	Asp	OD1	3.7
		338 M	Asp	OD2	2.7

10

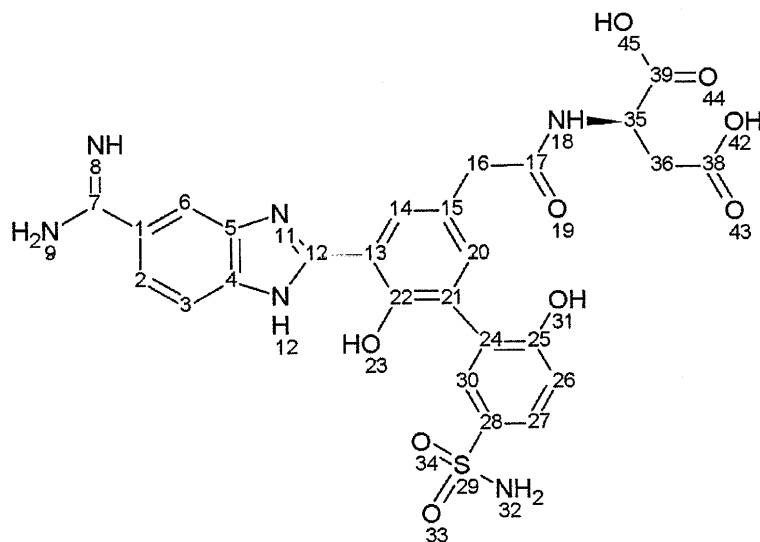
【0267】

20

以下の式(I-NO)は、化合物(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸についてTable18(表18)で用いた原子番号付けを示す：

【0268】

【化10】



30

(I-NO)

40

【0269】

この実施例は、触媒的アミノ酸残基His193およびSer344(配列番号1)を含むFVIIa活性部位と隣接する活性部位ポケットとの相互作用によって(S)-2-{2-[5-(5-カルバムイミドイル-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-6,2'-ジヒドロキシ-5'-スルファモイル-ピフェニル-3-イル]アセチルアミノ}-コハク酸は、FVIIa因子を安定化させることを実証している。

【0270】

上記実施例は本発明の実践を例示するものである。これらの実施例は、例示のためだけ

50

に含められており、特許請求される本発明の範囲を限定しようとするものではない。

【 0 2 7 1 】

本発明の具体的な特徴を本明細書で例示し説明してきたが、多くの改変形態、置換形態、変更形態および均等物が、ここで当業者に想起されよう。したがって、添付の特許請求の範囲は、そうしたすべての改変形態および変更形態を、本発明の真の趣旨に含まれるものとして包含するものとすることを理解すべきである。

【配列表】

2015534573000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/071225

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/37 A61K31/4184 A61P7/04
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 A61P

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 practicable, 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.
A	WO 2005/016365 A2 (NOVO NORDISK HEALTHCARE AG [CH]; JENSEN MICHAEL BECH [DK]; PETERSEN AN) 24 February 2005 (2005-02-24) cited in the application abstract page 3, line 11 - page 4, line 28 page 8, line 35 page 15, line 13 - page 16, line 3 page 17, lines 17-19 page 19, lines 25-35 page 22, lines 22-28 -----	1-14
A	WO 2006/089954 A2 (NOVO NORDISK HEALTHCARE AG [CH]; PETERSEN ANDERS KLARSKOV [DK]; BOWLER) 31 August 2006 (2006-08-31) abstract pages 2,19-21 table 1 ----- -/--	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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 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

21 November 2013

Date of mailing of the international search report

16/12/2013

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

Weisser, Dagmar

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/071225

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 03/006670 A2 (AXYS PHARM INC [US]; HU HUIYONG [US]; KOLESNIKOV ALEKSANDR [US]; SPERA) 23 January 2003 (2003-01-23) abstract page 2, line 19 page 3, lines 17-19 page 6, lines 3-9 page 9, lines 17,18 page 19, lines 1-7</p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>US 2011/269806 A1 (KOLESNIKOV ALEKSANDR [US] ET AL) 3 November 2011 (2011-11-03) abstract paragraphs [0112], [0187], [0214], [0324] - [0333] claims 11,13,14</p> <p>-----</p>	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/071225

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005016365 A2	24-02-2005	AU 2004264282 A1	24-02-2005
		BR P10413518 A	10-10-2006
		CA 2534028 A1	24-02-2005
		CN 1845753 A	11-10-2006
		CN 102872451 A	16-01-2013
		EP 1656158 A2	17-05-2006
		JP 2007502252 A	08-02-2007
		JP 2012051893 A	15-03-2012
		KR 20060061829 A	08-06-2006
		KR 20120104619 A	21-09-2012
		MX PA06001698 A	19-05-2006
		US 2006205648 A1	14-09-2006
		US 2010056453 A1	04-03-2010
		US 2012003206 A1	05-01-2012
		US 2013084274 A1	04-04-2013
		WO 2005016365 A2	24-02-2005
		ZA 200601250 A	25-04-2007
WO 2006089954 A2	31-08-2006	EP 1855722 A2	21-11-2007
		JP 2008531525 A	14-08-2008
		US 2009041747 A1	12-02-2009
		WO 2006089954 A2	31-08-2006
WO 03006670 A2	23-01-2003	AU 2002313655 A1	29-01-2003
		CA 2452391 A1	23-01-2003
		EP 1408963 A1	21-04-2004
		US 2003114457 A1	19-06-2003
		US 2005176797 A1	11-08-2005
		WO 030066011 A1	23-01-2003
		WO 03006670 A2	23-01-2003
US 2011269806 A1	03-11-2011	AU 2003302238 A1	23-06-2004
		CA 2507707 A1	17-06-2004
		CN 1745070 A	08-03-2006
		EP 1569912 A2	07-09-2005
		JP 4744149 B2	10-08-2011
		JP 2006515839 A	08-06-2006
		JP 2011157362 A	18-08-2011
		US 2006205942 A1	14-09-2006
		US 2009054432 A1	26-02-2009
		US 2011269806 A1	03-11-2011
		US 2013157298 A1	20-06-2013
		WO 2004050637 A2	17-06-2004

フロントページの続き

(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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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, HR, 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

(72)発明者 アネテ・ヘンリクセン

デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)・ノヴォ・ノルディ
スク・アーノエス

(72)発明者 シャルロテ・シー・ロスマイル

デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)・ノヴォ・ノルディ
スク・アーノエス

(72)発明者 ハンネ・ベネディクテ・ラスムセン

デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)・ノヴォ・ノルディ
スク・アーノエス

(72)発明者 ヘンリク・スネ・アンデルセン

デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)・ノヴォ・ノルディ
スク・アーノエス

(72)発明者 セーレン・イー・ピョルン

デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスヴェア・ノヴォ・アレー・(番地なし)・ノヴォ・ノルディ
スク・アーノエス

Fターム(参考) 4C076 AA12 BB11 CC14 DD60Q FF63 FF65

4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA22 BA44 DC14 MA05 MA17 MA66

NA03 ZA532

4H045 BA10 CA40 DA65 EA20