

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4676585号
(P4676585)

(45) 発行日 平成23年4月27日(2011.4.27)

(24) 登録日 平成23年2月4日(2011.2.4)

(51) Int. Cl. F 1
A 6 1 K 38/43 (2006.01) A 6 1 K 37/465
A 6 1 P 7/04 (2006.01) A 6 1 K 37/48
 A 6 1 P 7/04

請求項の数 4 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平11-368122	(73) 特許権者	000173555 一般財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
(22) 出願日	平成11年12月24日(1999.12.24)	(72) 発明者	中富 靖 熊本県熊本市保田窪本町14-25 303
(65) 公開番号	特開2001-181204(P2001-181204A)	(72) 発明者	友清 和彦 熊本県熊本市龍田町上立田130-8
(43) 公開日	平成13年7月3日(2001.7.3)	(72) 発明者	荒木 辰也 熊本県熊本市下硯川町1456 2-A
審査請求日	平成18年12月13日(2006.12.13)	(72) 発明者	手嶋 かおり 熊本県菊池郡西合志町須屋2018-49
前置審査		(72) 発明者	渡辺 朋子 熊本県菊池郡大津町吹田1262-156

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液凝固異常に基づく疾患の治療・予防用医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

活性化血液凝固第V I I因子及び血液凝固第X因子を組み合わせて主たる有効成分とする血液凝固障害に伴う出血症状の予防・治療用医薬組成物。

【請求項2】

血液凝固障害が、血液凝固因子欠損に起因する血液凝固障害である請求項1記載の医薬組成物。

【請求項3】

血液凝固障害が、血液凝固因子に対するインヒビター(抗体)を有することに起因して止血障害を呈する血液凝固障害である請求項1記載の医薬組成物。

【請求項4】

1 μg/ml以上の濃度の活性化血液凝固第V I I因子及び20 μg/ml以上の濃度の血液凝固第X因子を有効成分とする請求項1ないし請求項3のいずれかに記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本願発明は、血液に由来する成分を主たる有効成分とする医薬品に関する。詳細には、血液凝固障害、例えば血液凝固因子異常(欠損も含む)、特に血液凝固因子に対するインヒビターを有することにより止血障害を呈する患者の止血管理に用いられる医薬品に関する。

より詳細には、活性化血液凝固第ⅤⅠⅠ因子(以下、FⅤⅠⅠaと称することがある)及び血液凝固第Ⅹ因子(以下、FⅩと称することがある)を主たる有効成分とする、血液凝固障害に伴う出血症状の予防・治療用医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

止血反応は、極めて重要な生体の防御機構の一つあり、一般的に、血管損傷部位への血小板の粘着・凝集による一次止血と、可溶性のフィブリノーゲンが不溶性のフィブリンへ転換されて血管損傷部位をふさぐ二次止血に大別される。二次止血の過程は各種の血液凝固因子及び補助因子による血液凝固カスケードとして知られる一連の連続的な反応に基づいており、内因系凝固と外因系凝固の二つの経路からなる(図1参照のこと)。従って、この血液凝固カスケード中の因子が欠損または正常に機能しないと、血液凝固が妨げられ、出血症状を呈することがある。その多くは遺伝的素因に基づく場合が多く、先天性凝固因子障害によって引き起こされる代表的な疾患として、第ⅤⅠⅠⅠ因子が欠損した血友病A、第Ⅹ因子が欠損した血友病Bがよく知られている。

10

【0003】

これら血友病患者の治療には、欠損因子の補充を目的として第ⅤⅠⅠⅠ因子あるいは第Ⅹ因子を含む濃縮製剤が開発され、止血管理に使用されており、これを補充療法という。しかし、その結果、第ⅤⅠⅠⅠ因子あるいは第Ⅹ因子に対する抗体(これは、通常インヒビターと呼ばれる)が患者の約2～24%に発生することが知られており(Thromb Haemost 67:600-602(1992), Int J Hematol 62:175-181(1995), Lancet 339(8793):594-598(1992), Blood 83:2428-2435(1994))、これは補充療法における最も深刻な副作用の一つである。インヒビターが発生すると、従来の補充療法は効果がなくなり、患者の止血管理は困難をきわめる。また、血友病のような遺伝的な素因がない場合でも、自然発生的または自己免疫疾患的にインヒビターが発現することが多数報告されている(Thromb Haemost 45:200-203(1981))。

20

【0004】

現在インヒビターを有する患者の治療には主に以下の方法が用いられている。

(a)中和療法:

インヒビターを凌駕するような高投与量の濃縮製剤を投与することでインヒビターを中和し、さらに止血に必要な因子の補充を行なう。

30

(b)バイパス療法:

第ⅤⅠⅠⅠ因子や第Ⅹ因子は共に内因系凝固に関与する因子であるので、内因系を介さない、即ちバイパスする外因系凝固により止血する。外因系凝固能を高めるため、APCCと呼ばれる活性化プロトロンビン複合体濃縮製剤やFⅤⅠⅠa製剤の投与が行なわれている。

(c)免疫寛容療法:

大量の濃縮製剤を連日投与することにより、インヒビター産生能を免疫学的に疲弊させて、抗体の消失を図る。

しかしながら、前記方法は各々幾つかの欠点をかかえている。即ち、(a)中和療法はインヒビター価の低い患者に対しては有効であるが、ハイリスポンダーと呼ばれる高いインヒビター価を有する患者に対しては無効である。(b)バイパス療法におけるAPCCは心筋梗塞(Am J Med 85:245-249(1988))やDIC(Thromb Haemost 48:339-340(1982))の副作用が報告されており安全性に問題がある。一方、その安全性の高さからインヒビター患者の止血管理で最も汎用されているFⅤⅠⅠa製剤は、FⅤⅠⅠaの生体半減期が短いため頻回投与が必要であり(Transfus Med Rev 7:78-83(1993))、経済的な面も含め患者に多大な負担を負わせることになっている。また、その有効性も充分とは言えない。(c)免疫寛容療法は限られた患者においてのみ有効であり、且つ患者の経済的負担が大きい。このように、現状ではインヒビター患者に対する種々の止血管理方法は十分なものとはいえず、より安全で、効果が高く、止血管理が容易な製剤が切望されている。

40

【0005】

50

なお、従来技術として、特開平7-145072～145075により開示されている「血液凝固因子阻害因子処理のための水性組成物」は従来のAPCC製剤における活性化の程度を規定しているだけであり、その本質を極めていない。また、特開平9-110715により示されている「血液凝固疾患を治療するための医薬組成物とその製造法」も、従来のAPCC中のFVIIa含量を増加させることにより治療効果を期待している点に特徴を有するが、単独で治療効果が確認されているFVIIaをAPCCに加えただけであり、同様になお課題を残すものである。

【0006】

【発明の構成】

【課題を解決するための手段】

上記問題点を鑑み、本発明者らは血液凝固障害に伴う出血症状に対する予防・治療剤を開発するべく鋭意研究した結果、驚くべきことに、FVIIaとFXを組み合わせてなる医薬組成物が、血液凝固障害を原因とする止血障害の予防・治療剤として非常に有効であることを初めて見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。特に、本願発明によってもたらされる組成物の優れた点として、1 APCC製剤の副作用を引き起こしている原因物質としての可能性の高いFII、FIIa、FIX、FIXa及びリン脂質等を実質的に含まないため安全性が極めて高い。また、2 FVIIa製剤の欠点であった頻回投与の必要がなくなり、さらにその止血効果もFVIIaよりも優れている。即ち、安全で、効果が高く、止血管理が容易な、待ち望まれていた医薬組成物と言うことができる。また、FII及びFIX等をほとんど含まないという点で従来のAPCC製剤と異なり、FXを含む点でFVIIa製剤とも異なる。

【0007】

本願発明の医薬組成物の主たる成分の前駆体であるFVIIは406残基のアミノ酸からなる分子量約50,000を有するビタミンK依存性凝固因子であり、血漿中には約0.5 μg/ml含まれる。FVIIは分子内のArg152-Ile153結合が加水分解されることにより酵素活性を持つ二本鎖のFVIIaとなる。FVIIaは組織因子とともにカルシウムイオン存在下でFIX及びFXを活性化する。従って、外因系凝固経路において非常に重要な位置を占めている物質とみなすことができる。

【0008】

一方、FXは448残基のアミノ酸からなる分子量約59,000のビタミンK依存性凝固因子であり、血漿中には5～10 μg/ml含まれる。FXは、カルシウムイオン存在下でFVIIa/組織因子複合体により活性化されるか(外因系凝固経路)、あるいは、活性化血液凝固第VII因子、カルシウムイオン及びリン脂質存在下で活性化血液凝固第IX因子により活性化されて(内因系凝固経路)、活性化血液凝固第X因子(以下、FXaと称することがある)となり、酵素活性を発揮するようになる。FXaは活性化血液凝固第V因子、カルシウムイオン及びリン脂質存在下で、プロトロンビンをトロンビンに活性化し、その結果フィブリン形成を引き起こす。

【0009】

本願発明に使用されるFVIIa及びFXを製造する方法は特に限定されることなく、例えばヒト血液より分離する方法あるいは遺伝子組換え技術により作製する方法などによって製造することができる。

血液由来のFVIIaの製法としては、例えば、特開平3-155797、特開平10-059866及び特開平10-059867に示される方法がある。また、新鮮凍結ヒト血漿を冷融解・遠心処理してクリオプレシテートを除いた脱クリオ血漿から、陰イオン交換クロマトグラフィーにより粗精製後、抗FVIIモノクローナル抗体固定化カラムを用いてのアフィニティークロマトグラフィーによってFVIIを精製した後、他の血漿蛋白質、例えば活性化血液凝固第XII因子、FXaなどによりFVIIaに活性化する方法がある。得られるFVIIaは、その安全性を確保するために、FII、FIIa、FIX及びFIXaを可能な限り伴わない方が好ましい。

【0010】

10

20

30

40

50

血液由来のFXの製法としては、例えば、新鮮凍結ヒト血漿を冷融解・遠心処理してクリオプレシテートを除いた脱クリオ血漿から、陰イオン交換クロマトグラフィーにより粗精製後、抗FXモノクローナル抗体固定化カラムを用いてのアフィニティークロマトグラフィーによってFXを精製する方法がある。前記と同様、得られるFXはその安全性を確保するために、FII、FIIa、FIX及びFIXaを可能な限り伴わない方が好ましい。

【0011】

上述の方法で調製されたFVIIaまたはFXの活性を最大限に維持するために、それぞれ好適な安定化剤と共に凍結乾燥して保存することができるし、FVIIa溶液またはFX溶液をそれぞれ凍結し保存することも可能である。さらには、FVIIaまたはFXを好適な安定化剤と共に好適な濃度で混合し、凍結乾燥して保存することができるし、混合溶液を凍結し保存することも可能である。本願発明では、かかる有効成分としてFVIIa、FXを含む組成物と、公知の適当な賦形剤を組み合わせ、公知の方法で血液凝固障害を原因とする止血障害に対する予防・治療用製剤とすることができる。当該製剤の投与対象は、血液凝固障害によって引き起こされる止血障害のある患者であれば特に限定されることはない。

【0012】

FVIIa及びFXの有効投与量は、例えば投与対象者の年齢、症状及び重症度などにより変動するが、 $5\mu\text{g}/\text{体重}(\text{kg})\sim 160\mu\text{g}/\text{体重}(\text{kg})$ のFVIIa及び $50\mu\text{g}/\text{体重}(\text{kg})\sim 16,000\mu\text{g}/\text{体重}(\text{kg})$ のFXで止血効果が期待出来る。投与方法は単回投与(Bolus)あるいは点滴の静脈内投与が最適である。本願発明の予防・治療用製剤は、FVIIa及びFXを組み合わせることを好適な実施態様とするが、FVIIaとFXの投与は間隔が充分短ければ、個別に投与することも可能であり、同様に本願発明の効果を発揮する。

【0013】

以下に、実施例を挙げて本願発明をさらに具体的に説明する。

【0014】

実施例1

(本願発明組成物のAPTT測定による評価)

活性化部分トロンボプラスチン時間(以下、APTTと称することがある)は、APTT試薬を用いて測定される内因系スクリーニング検査法である。具体的には、被検血漿にAPTT試薬とカルシウムイオンを添加しフィブリンが形成されるまでの内因性凝固の酵素反応を総合的に測定するもので、特に、血友病AまたはBに代表される内因系凝固因子の量的ないし質的異常、または内因系凝固因子に対するインヒビターの存在などによりAPTTは延長する。正常値は30~40秒であり、その延長の度合は量的ないし質的異常を示している内因系凝固因子の凝固活性に依存し、一般に重篤な臨床症状を示す血友病(インヒビターも含む)では極度に延長する。齋藤らが報告したFVIIa製剤の臨床評価結果によると(Jpn J Thromb Hemost 5(3):158-172(1994))、インヒビターを有する血友病患者12人のAPTTは 122.0 ± 18.7 秒(平均 \pm SD)に延長していたが、遺伝子組換えFVIIa投与20分後には 82.9 ± 21.6 秒に低下した。また、*in vitro*においてもFVIIaまたはFIX等の各種欠乏血漿にFVIIaを添加すると、APTTが有意に短縮することが報告されている(Thromb Res 56:603-609(1989))。

本実験は上記事実に基づき、血友病患者様血漿として第VII因子欠乏血漿または第IX因子欠乏血漿(いずれも、デイドベーリングマールブルグ社製)を用い、FVIIa、FX及びFIIによるAPTTの短縮効果を評価した。APTT試薬としては、Actin(商品名)(デイドベーリングマールブルグ社製)を使用した。評価したFVIIa等成分の濃度は、FVIIa:終濃度0~4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 血漿、FX:終濃度0~80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 血漿(正常ヒト血漿中の濃度:約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 血漿)、FII:終濃度0~400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 血漿(正常ヒト血漿中の濃度:約100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 血漿)とした。結果を図2~図6に示す。図2~図4は、FVIIa、FX、FIIの各々の各欠乏血漿のAPTTへの濃度依

10

20

30

40

50

存的な影響を表したもので、図5及び図6は、F V I I a及びF Xの組み合わせによる各欠乏血漿のA P T Tへの協同的影響を示したものである。

F V I I aあるいはF Xはともに各欠乏血漿のA P T Tを濃度依存的に短縮させたが、F I Iは各欠乏血漿のA P T Tをほとんど短縮させないことが判明した。また、各欠乏血漿にF V I I a及びF Xを組み合わせ、終濃度それぞれ0 ~ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 血漿及び0 ~ 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 血漿で同時に添加してA P T Tの短縮効果を調べた。F V I I a及びF Xの濃度がより高い方がA P T Tをより短縮させる傾向を示した。また、F V I I aまたはF X単独の効果に比較して、それら成分が組み合わせられて同時に存在した場合、顕著な協同作用を示すことが認められた。

【0015】

10

実施例2

(本願発明組成物のトロンボエラストログラフィーによる評価)

トロンボエラストログラフィー(thrombelastography:以下、TEGと称することがある)は、血液凝固過程における弾性変化を測定するもので、血液凝固障害の種類により特有なパターンを示し、血液としての凝固能力を測定するために使用される。即ち、血友病または内因系凝固因子に対するインヒビター等が存在する状態では、血液凝固が阻害されTEGパターンは異常を示す。数値的には、TEGパラメーターである反応時間(r)及びr + K(K:凝固時間)が変動し、正常ヒト血液の場合rは10 ~ 15分、Kは6 ~ 8分、r + Kは16 ~ 23分であるが、血友病等では正常値を外れ、著明な延長をきたす。吉岡らの報告(Haemostasis 26(suppl 1):143-149(1996))によると、血友病Aインヒビター患者に

20

F V I I a製剤を投与すると、それまで延長していたr(60分以上)及びr + K(80分以上)が正常状態に近づき、生体内におけるF V I I a濃度の低下に応じてr及びr + Kが再び延長する。このことは、TEG測定が血液としての凝固能力を測定するために有用な方法であることを示す。

前記原理に基づき、ヒト血液に抗ヒトF I Xヤギ抗体を添加することにより血友病Bインヒビター様血液を作製したところ、rは120分以上、r + Kは測定不可能な程度まで極度に延長した。この血友病Bインヒビター様血液にF V I I a及びF Xをそれぞれ0.125 ~ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 血液及び2.5 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 血液の濃度で添加した場合、F V I I a及びF Xの濃度依存的にr及びr + Kが短縮し、血友病Bインヒビター様血液として失われていた血液凝固能力がF V I I a及びF Xにより改善されることが示された。結果

30

を図7及び図8に示す。

【0016】

実施例3

(動物モデルを用いた本願発明組成物の評価)

本実験は、抗ヒトF I Xヤギ抗体をカニクイサルに投与して作製される血友病BインヒビターモデルがA P T Tの延長、出血時間の延長、TEGパラメーターであるr(反応時間)とr + K(K:凝固時間)の著明な延長及びm a(最大振幅)の縮小を示すことを利用して実施した。

カニクイサルに急速静注及び点滴静注により抗ヒトF I Xヤギ抗体を投与して血友病Bインヒビターモデルを作製し、F V I I a単独投与(80 $\mu\text{g}/\text{kg}$)とF V I I a及びF X

40

を組み合わせた投与(各々80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び800 $\mu\text{g}/\text{kg}$)による治療効果を、1) A P T T、2)出血時間、3)TEGを測定して比較した。結果を各々、図9、図10及び図11 ~ 図12に示した。

A P T Tは薬液(F V I I aまたはF V I I a及びF X)投与前と比較して、ともに薬液投与により短縮し、その短縮効果はF V I I a及びF Xの同時投与がより優れていた。

出血時間測定は以下の方法により測定した。カニクイサルの尾の根本から15 cm付近を、尾と平行方向に、動静脈を避けてSimplet II R(Organon Teknika)でカットした。この際、blood pressure cuffを尾の根本に捲いて、40 mmHgの圧力下で2回ずつカットし測定した(一次出血時間)。滲み出てくる血液は、傷口に触れないようにろ紙で吸い取った。次に二次出血時間として、一次止血後、傷口を綿角で3回擦り、傷口からの再出血を

50

一次出血と同様に測定した。通常、一次出血時間は主として血小板による一次止血反応を反映することが知られており、事実、抗ヒトF I Xヤギ抗体を投与しても正常時と比較してやや延長した程度であり、顕著な延長は観察されなかった。一方、二次出血時間は抗ヒトF I Xヤギ抗体の投与により著明に延長し、F V I I aまたはF V I I a及びF Xの同時投与により短縮した。しかし、その治療効果を比較すると、F V I I a単独投与よりもF V I I a及びF Xを組み合わせた同時投与の方がより正常状態近くに改善しており、薬液による出血傾向は正効果もより長時間持続した。

T E Gパラメーターも r 及び $r + K$ において、F V I I a単独投与に比べてF V I I a及びF Xの同時投与がより正常状態近くに改善しており、治療効果の持続性も優れていた。

【図面の簡単な説明】

【図1】内因系凝固と外因系凝固の二つの経路の血液凝固カスケードを示す図である。

【図2】F V I I I 欠乏血漿またはF I X欠乏血漿のA P T Tに対するF V I I aの影響を示す図である。

【図3】F V I I I 欠乏血漿またはF I X欠乏血漿のA P T Tに対するF Xの影響を示す図である。

【図4】F V I I I 欠乏血漿またはF I X欠乏血漿のA P T Tに対するF I Iの影響を示す図である。

【図5】F V I I I 欠乏血漿のA P T Tに対するF V I I a及びF Xの協同的影響を示す図である。

【図6】F I X欠乏血漿のA P T Tに対するF V I I a及びF Xの協同的影響を示す図である。

【図7】血友病Bインヒビター様血液のT E Gパラメーター r (反応時間)に対するF V I I a + F Xの効果を示す図である。

【図8】血友病Bインヒビター様血液のT E Gパラメーター $r + K$ (反応時間 + 凝固時間)に対するF V I I a + F Xの効果を示す図である。

【図9】血友病Bインヒビター動物モデルのA P T TにおけるF V I I a単独投与とF V I I a + F X投与の比較を示す図である。

【図10】血友病Bインヒビター動物モデルの二次出血時間におけるF V I I a単独投与とF V I I a + F X投与の比較を示す図である。

【図11】血友病Bインヒビター動物モデルのT E Gパラメーター r (反応時間)に対するF V I I a単独投与とF V I I a + F X投与の比較を示す図である。

【図12】血友病Bインヒビター動物モデルのT E Gパラメーター $r + K$ (反応時間 + 凝固時間)に対するF V I I a単独投与とF V I I a + F X投与の比較を示す図である。

10

20

30

【 図 1 】

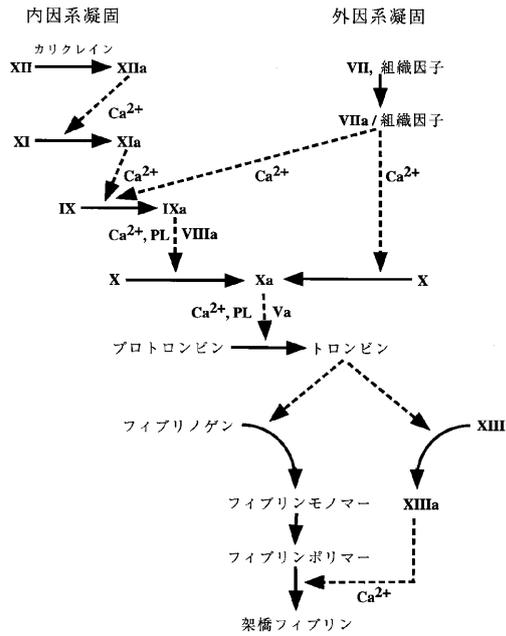
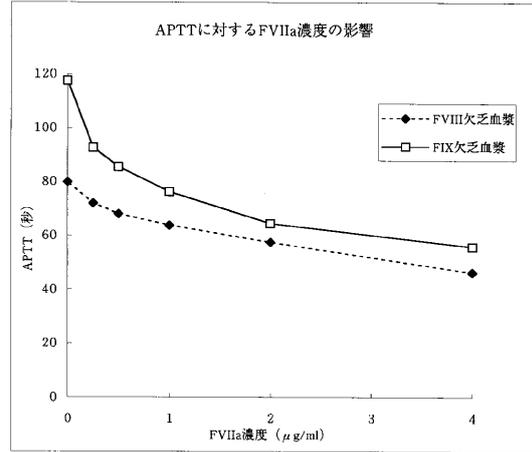
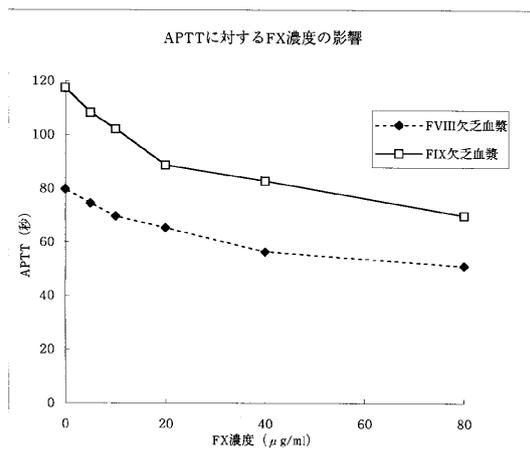


図1.凝固カスケード。ローマ数字は凝固因子を、aはその活性型を表す。PL；リン脂質

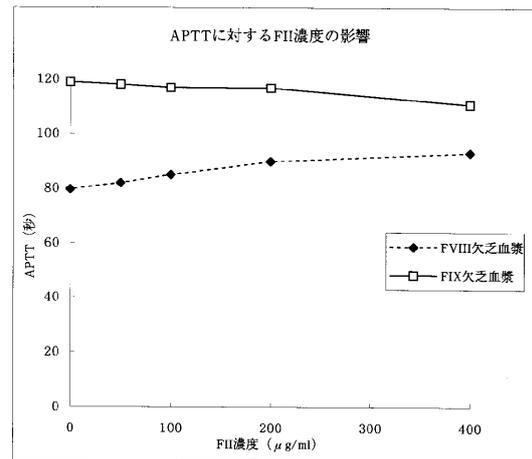
【 図 2 】



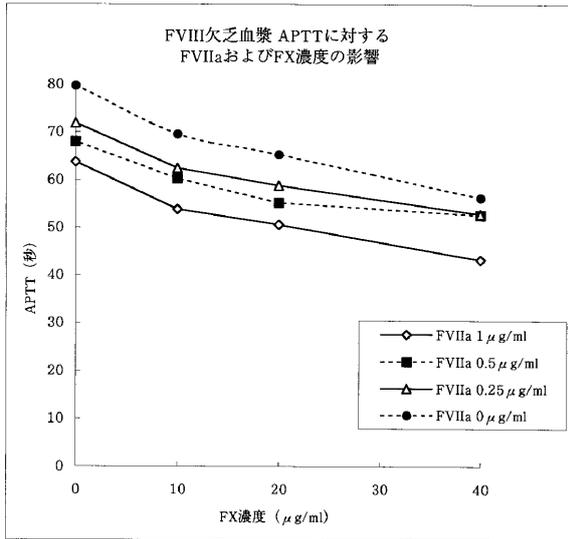
【 図 3 】



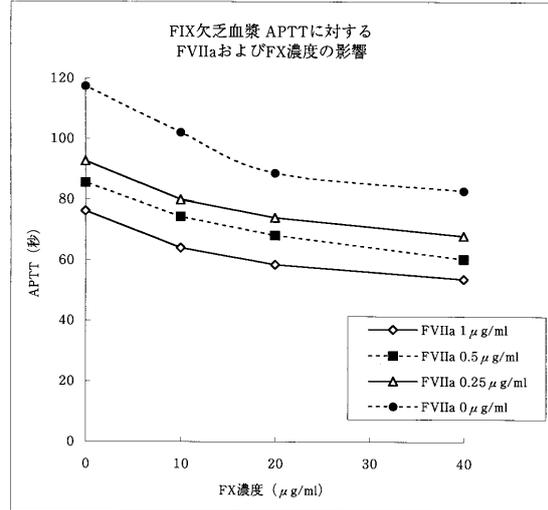
【 図 4 】



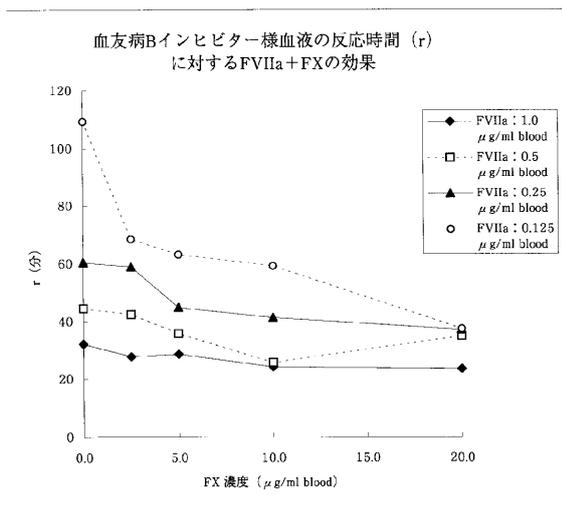
【 図 5 】



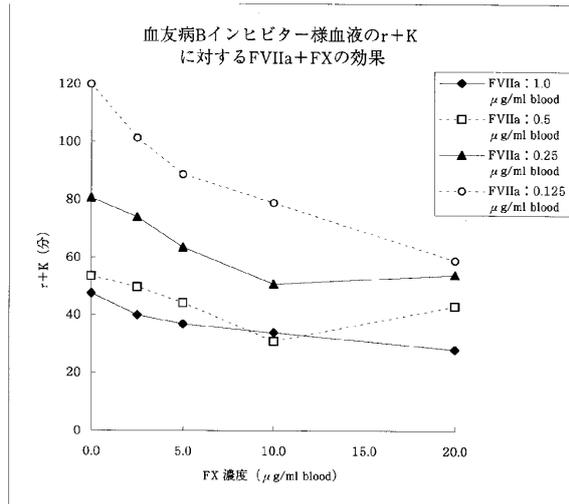
【 図 6 】



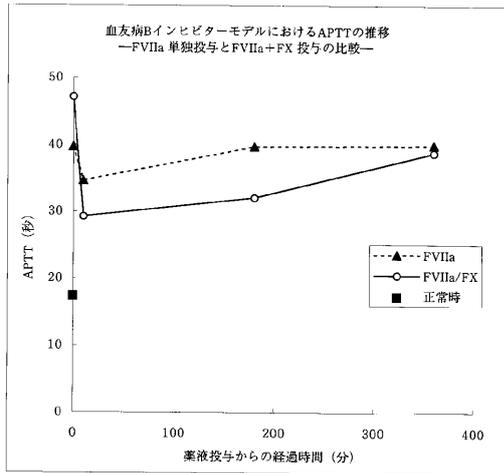
【 図 7 】



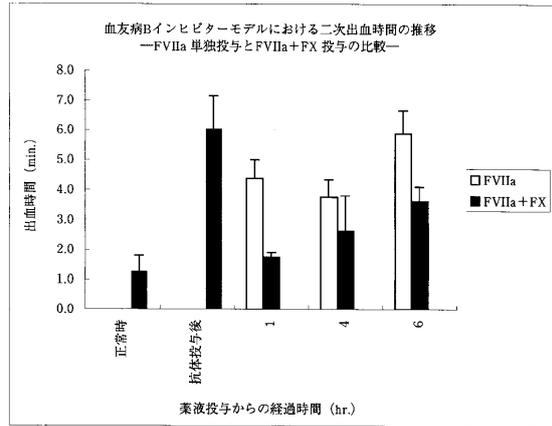
【 図 8 】



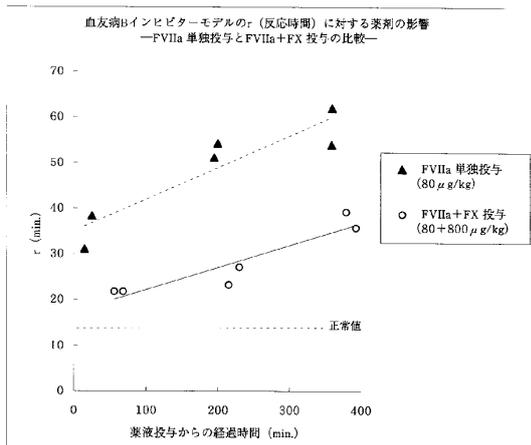
【図 9】



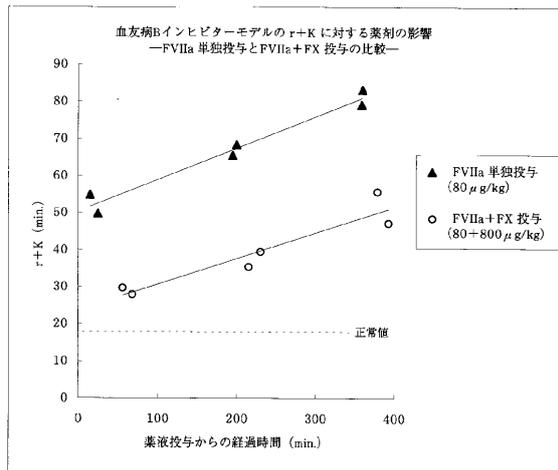
【図 10】



【図 11】



【図 12】



フロントページの続き

(72)発明者 中垣 智弘
熊本県菊池郡合志町豊岡 2 5 2 7 - 3 1 1

審査官 中尾 忍

(56)参考文献 特表昭 5 8 - 5 0 0 9 9 4 (J P , A)
米国特許第 0 4 5 0 1 7 3 1 (U S , A)
Hedner, U. et al. , Use of human Factor VIIa in the treatment of two hemophilia A patients with high-titer inhibitors , J. Clin. Invest. , 1 9 8 3 年 6 月 , Vol.71 , No.6 , P.183
6-1841

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 38/43

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

BIOSIS(STN)

CA(STN)

CAplus(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)