



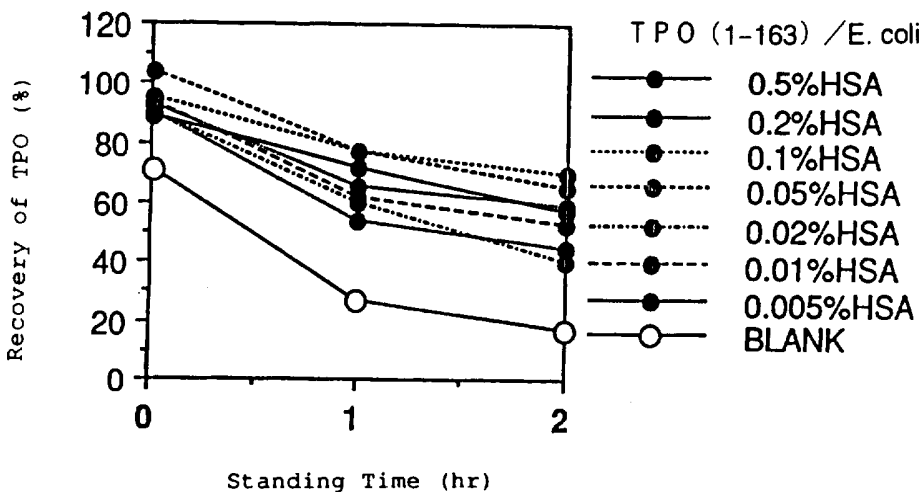
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 38/18, 38/19, 47/14, 47/18, 47/20, 47/24, 47/26, 47/32, 47/34, 47/36, 47/38, 47/42</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO96/28182 (43) 国際公開日 1996年9月19日(19.09.96)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/00636 (22) 国際出願日 1996年3月14日(14.03.96) (30) 優先権データ 特願平7/56249 1995年3月15日(15.03.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BREWERY COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒104 東京都中央区新川2丁目10番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 大槻直樹(OTSUKI, Naoki)[JP/JP] 〒370-12 群馬県高崎市宮原町3 麒麟麦酒株式会社 医薬開発研究所内 Gunma, (JP) (74) 代理人 弁理士 川口義雄, 外(KAWAGUCHI, Yoshio et al.) 〒160 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 山田ビル Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO特許(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title : METHOD OF PREVENTING TPO ADSORPTION AND STABLE TPO-CONTAINING COMPOSITION

(54) 発明の名称 TPOの吸着防止方法および安定なTPO含有組成物

(57) Abstract :



(57) Abstract

A TPO-containing composition comprising a TPO protein having no sugar-chain portion and at least one pharmaceutically acceptable additive selected from the group consisting of proteins, cellulose derivatives, sulfated polysaccharides, surfactants, polyvinyl alcohol, macrogols and aminoacetic acid; and a method of preventing TPO from being adsorbed on a container wall by using the above composition containing such additives, thereby preventing the titer reduction caused by the adsorption.

(57) 要約

この発明は、糖鎖部を有していないTPOタンパク質と、タンパク質、セルロース誘導体、硫酸化多糖、界面活性剤、ポリビニルアルコール、マクロゴール、アミノ酢酸からなる群より選ばれる少なくとも1種の薬学的に許容される添加剤とを含んでなるTPO含有組成物、およびTPO含有組成物中にこれら添加剤を含有させることにより、容器壁上へのTPOの吸着を防止するための方法に関する。この方法によって、TPO含有組成物を含有する容器壁上へのTPOの吸着による力価低下を防止することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AU	オーストラリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	ES	スペイン	LR	リベリア	SE	スウェーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FI	フィンランド	LS	レソト	SG	シンガポール
BB	バルバドス	FR	フランス	LT	リトアニア	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア
BF	ブルキナ・ファソ	GB	イギリス	MC	モナコ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TD	チャド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IL	イスラエル	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CN	中国	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
		KZ	カザフスタン				

明 細 書

T P O の吸着防止方法および安定な T P O 含有組成物

発 明 の 背 景

発 明 の 技 術 分 野

本発明は、糖鎖部を有していない T P O タンパク質を含有する安定な組成物に関し、特に、容器壁上への吸着または会合、重合などによる活性成分の損失、力価低下を防止する安定な T P O 含有組成物に関するものである。本発明はまた、該組成物を含有する容器壁上への T P O の吸着による力価低下を防止するための方法に関する。

従 来 技 術 の 開 示

ヒト T P O (thrombopoietin) は、サイトカインのレセプタースーパーファミリーの一つである M p l のリガンドとしてクローニングされたタンパク質である (de Sauvageら、Nature (London) 369巻、533-565 頁、(1994)、Bartley, T. D.ら、Cell 77 巻、1117-1124 頁、(1994))。これらの M p l リガンドはいずれも血小板減少症の動物 (ヒト、マウス、イヌ) の血

清や血漿中に検出され、巨核球形成や血小板形成への関与が確認されている。

血小板減少症の治療剤の開発を念頭において、本出願人も、ラット骨髄より高度に純化した巨核球前駆細胞からの巨核球生成を促進する活性を指標にして、血小板減少症のラット血漿よりラット T P O を精製し、その部分アミノ酸配列に基づいて、ラット T P O c D N A、さらにはヒト T P O c D N A をクローニングし、遺伝子組換え技術によって大量に均一なヒト T P O を取得することに成功した (H. Miyazaki ら、Exp. Hematol. 22巻、838 頁、(1994))。本出願人が取得に成功したこのヒト T P O は、前述のヒト M p l のリガンドとして取得された因子と同一のアミノ酸配列を有することが判明している (配列表：配列番号 1)。

本発明者らは、該ヒト T P O を制ガン剤や免疫抑制剤の投与、あるいは放射線照射や B M T によって骨髄抑制の起きた血小板減少症のマウスに投与したところ、血小板減少阻止効果、血小板増加促進効果、さらには、造血機能の亢進が認められ、本発明の T P O がこれらの血小板減少症に有効であることを見いだしている。

T P O は、その高活性ゆえに極めて微量で使用され、活性成分として通常 $0.05 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重 $\sim 1 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、好ましくは $0.5 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重 $\sim 50 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重を、病状、性別及び投与経路に応じて、一日数回程度投与され得る。従って、極めて微量で製剤化することが要求されるが、この場合、製剤容器（バイアル、アンプル等）への吸着による力価低下、点滴静注時に輸液と配合する場合の輸液瓶、点滴ラインへの吸着損失が無視できない。

そこで、本発明者は、糖鎖部を有していない T P O タンパク質を製剤化あるいは輸液配合する際の力価低下防止を目的として吸着を防止するような安定な T P O 含有組成物を得るべく、種々の検討を行った。その結果、T P O に薬学的に許容されるタンパク質、セルロース誘導体、硫酸化多糖、界面活性剤、ポリビニルアルコール、マクロゴール（別名：ポリエチレングリコール）、アミノ酢酸（別名：グリシン）を添加することが有効であることを見だし、本発明を完成した。

発明の要約

本発明は、糖鎖部を有していない T P O タンパク質を含有する組成物中に、タンパク質、セルロース誘導体、硫酸化多糖、

界面活性剤、ポリビニルアルコール、マクロゴール、アミノ酢酸からなる群より選ばれる少なくとも1種の薬学的に許容される添加剤を含有させることを特徴とする、該組成物を含有する容器壁上へのTPOの吸着による力価低下を防止するための方法を提供する。

また、本発明は、糖鎖部を有していないTPOタンパク質と、薬学的に許容されるタンパク質、セルロース誘導体、硫酸化多糖、界面活性剤、ポリビニルアルコール、マクロゴール、アミノ酢酸からなる群より選ばれる少なくとも1種の添加剤を含有することを特徴とするTPO含有組成物を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、ELISA法により決定された、TPO(1-163) / *E. coli* の濃度と吸収値(450 / 650nm)との関係を示す標準曲線である。

図2は、種々の濃度のヒト血清アルブミン(HSA)を添加したときの、TPO(1-163) / *E. coli* の回収率の経時変化を示す。

発明の詳細な説明

本発明におけるTPOとは、純度が高く、単離されたタンパ

ク質であればその製法による由来は問わないが、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなり、糖鎖部を有していないタンパク質が用いられる。あるいは、配列番号1に示されたアミノ酸配列のうち、TPO活性を保持する限りにおいてその一部が改変（置換、欠失、挿入、および／または付加）されているようなアミノ酸配列からなり、糖鎖部を有していないタンパク質も本発明のTPOとして用いることができる。

別の言い方をすれば、アミノ酸配列が実質的に配列番号1に示されたアミノ酸配列であり、糖鎖部を有していないタンパク質をも用いることができる。ここで言う「実質的に配列番号1に示されたアミノ酸配列」とは、配列番号1に示されたアミノ酸配列に加えて、「TPO活性を保持する限りにおいて、配列番号1に示されたアミノ酸配列の一部に置換、欠失、挿入、および／または付加などがあるアミノ酸配列」を含むことを意味する。

本出願人は、ヒトTPOのC末端側については配列番号に示されたアミノ酸配列の152位まで欠失させても活性を保持していること、N末端側については6位まで欠失させても活性を保持していることを確認している。具体的なデータについては

表 1 に示した。

表 1

<u>誘 導 体</u>	<u>活 性 の 有 無</u>
1 - 2 3 1 位	+
1 - 2 1 1 位	+
1 - 1 9 1 位	+
1 - 1 7 1 位	+
1 - 1 6 3 位	+
1 - 1 5 7 位	+
1 - 1 5 6 位	+
1 - 1 5 5 位	+
1 - 1 5 4 位	+
1 - 1 5 3 位	+
1 - 1 5 1 位	+
1 - 1 5 0 位	-
7 - 1 6 3 位	+
8 - 1 6 3 位	-
1 3 - 2 3 1 位	-

従って、本発明の T P O としては、配列番号 1 に示されたアミノ酸配列の 7 位から 1 5 1 位のアミノ酸配列を含み、かつ T P O 活性を有する糖鎖部を有していないタンパク質も含まれる。より具体的には配列番号 1 に示されたアミノ酸配列のうち、1 位から 2 3 1 位、1 位から 2 1 1 位、1 位から 1 9 1 位、1 位から 1 7 1 位、1 位から 1 6 3 位、1 位～1 5 7 位、1 位から 1 5 6 位、1 位から 1 5 5 位、1 位から 1 5 4 位、1 位から 1 5 3 位、1 位から 1 5 1 位および 7 位から 1 6 3 位からなる糖鎖部を有していないタンパク質が本発明の T P O として挙げられる。

更には、上記 7 位から 1 5 1 位の配列内部または外部に、T P O 活性を損なわない範囲で、少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、欠失、挿入、および／または付加を有しているアミノ酸配列からなり、糖鎖部を有していないタンパク質も本発明の T P O に含まれる。

本発明における T P O を更に例示すれば、糖鎖部をもたず、かつ少なくとも、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するヒト T P O の 1 位のセリン残基がアラニン残基に、かつ 3 位のアラニン残基がバリン残基に置換されたタンパク質、2 5 位のアル

ギニン残基がアスパラギン残基に置換されたタンパク質、33位のヒスチジン残基がトレオニン残基に置換されたタンパク質、25位のアルギニン残基がアスパラギン残基に、かつ231位のグルタミン酸残基がリジン残基に置換されたタンパク質、更にこれらのタンパク質のC末端に T h r S e r I l e G l y T y r P r o T y r A s p V a l P r o A s p T y r A l a G l y V a l H i s H i s H i s H i s H i s H i s のポリペプチドが付加されたタンパク質を挙げることができる。

更には、糖鎖部をもたず、かつ配列番号1のアミノ酸配列に対し、少なくとも、33位のヒスチジン残基が欠失したタンパク質、116位のグリシン残基が欠失したタンパク質、117位のアルギニン残基が欠失したタンパク質、33位のヒスチジン残基と34位のプロリン残基の間にトレオニン残基が挿入されたタンパク質、33位のヒスチジン残基と34位のプロリン残基の間にアラニン残基が挿入されたタンパク質、33位のヒスチジン残基と34位のプロリン残基の間にグリシン残基が挿入されたタンパク質、33位のヒスチジン残基と34位のプロリン残基の間にグリシン残基が挿入され、かつ38位のプロリン残基がセリン残基に置換されたタンパク質、116位のグリ

シン残基と117位のアルギニン残基の間にアスパラギン残基が挿入されたタンパク質、116位のグリシン残基と117位のアルギニン残基の間にアラニン残基が挿入されたタンパク質、116位のグリシン残基と117位のアルギニン残基の間にグリシン残基が挿入されたタンパク質を挙げることができる。また、少なくとも、129位のロイシン残基がアルギニン残基に置換されたタンパク質、133位のヒスチジン残基がアルギニン残基に置換されたタンパク質、143位のメチオニン残基がアルギニン残基に置換されたタンパク質、82位のグリシン残基がロイシン残基に置換されたタンパク質、146位のグリシン残基がロイシン残基に置換されたタンパク質、148位のセリン残基がプロリン残基に置換されたタンパク質、59位のリジン残基がアルギニン残基に置換されたタンパク質、115位のグルタミンがアルギニン残基に置換されたタンパク質が挙げられる。

また、本発明のTPOとしては、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するヒトTPOおよび前述の誘導体の-2位にメチオニン残基、かつ-1位にリジン残基が付加された糖鎖部を有していないタンパク質、-1位にメチオニン残基が付加さ

れた糖鎖部を有していないタンパク質も含まれる。

本発明の T P O は、c D N A、染色体 D N A、または化学合成により得られる D N A を含む組換えベクターで、形質転換された宿主細胞から分離・精製して得られたものであることが好ましい。宿主としては、原核生物（細菌、好ましくは大腸菌）を用いることができる。

本発明の安定な T P O 含有組成物を得るために使用し得る添加剤としては、タンパク質、セルロース誘導体、硫酸化多糖、界面活性剤、ポリビニルアルコール、マクロゴール、アミノ酢酸などが挙げられる。これらの添加剤は、例えばガラス製、樹脂製等の容器、チューブ（例えば点滴ライン）等への T P O の吸着を防止するものであれば、その種類を問わないが、例えば下記のもので挙げられる。

タンパク質としては、ヒト血清アルブミン、ゼラチン、牛血清アルブミン、カゼイン、コラーゲン、ヒト血清グロブリンなどが利用できる。

セルロース誘導体としては、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースなどが利用できる。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリソルベート 80 やモノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン（別名：ポリソルベート 20）などのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、モノオレイン酸ソルビタンなどのソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖モノラウリン酸エステルなどのショ糖脂肪酸エステル、卵黄レシチンなどの卵黄リン脂質、塩化ベンゼトニウム、塩化ベンザルコニウムなどの芳香族四級アンモニウム塩、ラウリル硫酸ナトリウムなどのアルキル硫酸塩が利用できる。

硫酸化多糖としては、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヘパリンナトリウムなどが利用できる。

本発明において用いられるこれらの添加剤は、TPO含有組成物を水溶液とした場合に0.001～10%の濃度範囲で使用されうる。また、本発明において用いられる添加剤は、一般に活性成分としてのTPOタンパク質1重量部に対し、0.02重量部～10,000重量部の範囲内で使用することが望ましい。

更に本発明のTPO含有組成物は、その製剤化の目的に応じ

て希釈剤、可溶化剤、防腐剤、酸化防止剤、賦形剤および等張化剤等を含有することができる。

本発明の安定な T P O 含有組成物は注射などの非経口、経肺、経鼻、および経口を含めた種々の投与経路に応じた剤形として、溶液剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、凍結乾燥製剤などが例示される。T P O と本発明に係わる添加剤が必ずしも当初から同一の組成物中に共存した状態で与えられる必要がなく、それぞれを別々に用意し、用時に両者を混合すればよいような組成物剤形も可能である。

以下、実験例、実施例によって本発明を具体的に説明する。

実施例

以下の実験例で使用する T P O の固相酵素免疫定量法は以下のとおりである。

抗ヒト T P O モノクローナル抗体を用いた固相酵素免疫定量法

(E L I S A 法)

固相抗体として、ヒト T P O の HT-1 領域 (配列番号 1 の 8 位 ~ 2 8 位のアミノ酸配列に相当) を認識する抗ヒト T P O モノクローナル抗体 (L3-1 のサブクローン L3-1-54) を、50 mM 炭酸塩バッファー (pH 9.2) にて 20 μ g/ml に調製し 96 ウェル マク

ロタイタープレート (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp™、InterMed社製、Ca. No. 4-42404) の各ウェルに50 μ l ずつ分注した。マイクロプレートミキサー (ADVANTEC TS-96、アドバンテック東洋株式会社製) で攪拌し各ウェルの底面に固相抗体をゆきわたらせた。プレートシール (SUMILON 社製、Ca. No. MS-30020) でシールし37 $^{\circ}$ Cで2時間、或いは4 $^{\circ}$ Cで一晩静置して固相抗体をプレートに吸着させた。次に20 mM Tris-HCl/0.5M NaCl/0.1% Tween 20 (pH 7.5) の洗浄バッファーで洗浄後、4倍希釈 Block Ace (大日本製薬株式会社製、Ca. No. UK-B25) を300 μ l/ウェル加え、プレートシールでシールし37 $^{\circ}$ Cで1時間、或いは4 $^{\circ}$ Cで一晩静置してブロッキング処理した。洗浄バッファーで4回洗浄後、10倍希釈 Block Ace で希釈した被検体または標準とする濃度既知TPO を各ウェルに50 μ l 添加し、マイクロプレートミキサー攪拌後、プレートシールでシールし37 $^{\circ}$ Cで2時間、或いは4 $^{\circ}$ Cで一晩静置して反応させた。反応終了後、洗浄バッファーで4回洗浄した。次に、ヒトTPOのHT-2領域 (配列番号1の47位~62位のアミノ酸配列に相当) を認識する抗ヒトTPOモノクローナル抗体 (L4-1のサブクローンL4-1-31, 1次抗体) をビオチン標識し、10倍希釈 Block Ace

で500ng/mlに希釈して各ウェルに50 μ l添加し、マイクロプレートミキサーで攪拌後、プレートシールでシールし37 $^{\circ}$ Cで2時間、或いは4 $^{\circ}$ Cで一晩静置して反応させた。反応終了後、洗浄バッファーで4回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識アビジン(UltraAvidinTM-Horseradish Peroxidase、Leinco Technologies社製、Ca. No. A106)を10倍希釈Block Aceで2000倍希釈して各ウェルに50 μ l添加し、マイクロプレートミキサーで攪拌後、プレートシールでシールして37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。反応終了後、洗浄バッファーで4回洗浄した後、ペルオキシダーゼ用発色キット(SUMILON社製、Ca.No.ML-1120T)のTMBZ発色剤に1/100容の基質液を加えた発色剤を各ウェルに100 μ l添加しマイクロプレートミキサーで攪拌後、プレートシールでシールして室温下で反応させた。約30分後に反応停止液を各ウェルに100 μ l加え、マイクロプレートミキサーで攪拌して発色反応を停止した。ELISAプレートリーダー(THERMOmax、Molecular Devices社製)で450/650nmの波長の吸収を測定した。

後述の参考例に記載の方法で得られる、濃度既知のTPO(1-163)/E.coliによる吸収値をもとに標準曲線を作製した(図1参照)。

なお、ここで用いる抗ヒト T P O モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ L4-1 のサブクローン (L4-1-31) 及び L3-1 のサブクローン (L3-1-54) は、1994 年 12 月 27 日付けで日本国の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にそれぞれ受託番号 F E R M B P - 4 9 5 6 、 F E R M B P - 4 9 5 5 として、ブダペスト条約下で国際寄託されている。上記サブクローンはまた、中国寄託機関 (C C T C C) に、それぞれ Mouse-Mouse hybridoma L4-1-31 として受託番号 C C T C C - C 9 5 0 0 3 で、また Mouse-Mouse hybridoma L3-1-54 として受託番号 C C T C C - C 9 5 0 0 2 で寄託されている。

< 実験例 1 >

10 m M トリスバッファー (p H 7 . 5) にヒト血清アルブミン 0.005%、0.01%、0.02%、0.05%、0.1%、0.2%、0.5% となるように含有せしめたものを用意し検体試料とした。他に対照試料として、10 m M トリスバッファー (p H 7 . 5) のみを用意した。

各試料 1000 μ l を加えたガラス正試験管に後述の参考例に記載の方法で得られる T P O 3 μ g を含む溶液 1.5 μ l を加え、室温にて放置した。0.5 分、1 時間、2 時間後に

10 μ l ずつ採取し、E L I S A 法にて溶液中の T P O 量を測定し、期待値に対する回収率を求めた。

その結果を図 2 に示す。図中、B L A N K は 10 m M トリスバッファー (p H 7 . 5) のみの場合、H S A は、ヒト血清アルブミンを示す。図より、ヒト血清アルブミンが吸着防止効果を示すことが判明した。

< 実験例 2 >

表 2 に示す各種添加剤を 0 . 1 % の濃度で 10 m M トリスバッファー (p H 7 . 5) に溶解したものを 1000 μ l を加えたガラス製試験管に後述の参考例に記載の方法で得られる T P O [T P O (1 - 163) / E . coli] 3 μ g を含む溶液 2 . 7 μ l を加え、E L I S A 法により 24 時間放置後の回収率を測定した。結果を表 2 に示す。

表 2

添加物 (添加濃度 1 m g / m l)	回収率 (%)
ヒト血清アルブミン	41.3
精製ゼラチン (タイプ A)	41.2
精製ゼラチン (タイプ B)	24.9
アミノ酢酸	21.7
メチルセルロース	44.0
ヒドロキシプロピルセルロース	51.5
ヒドロキシエチルセルロース	23.3
コンドロイチン硫酸ナトリウム	61.6
ヘパリンナトリウム	41.4
マクロゴール 400	24.4
ポリビニルアルコール (部分けん化物)	36.7
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60	50.3
ポリソルベート 80	67.8
モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン	57.6
ホ ^o リオキシエチレン (160) ホ ^o リオキシプロピレン (30) グリコール	33.7
モノオレイン酸ソルビタン	89.6
ショ糖モノラウリン酸エステル	59.2
卵黄リン脂質	20.8
塩化ベンゼトニウム	97.6
ラウリル硫酸ナトリウム	72.6
無添加	16.2

表から明らかのように、ガラス製試験管に接触したときにみられる T P O の吸着を各種添加剤が防止することが判明した。

本発明の T P O 含有組成物の製造例を以下に示す。

< 実施例 1 >

p H 6 . 0 の 5 m M リン酸緩衝液 1 0 m l 中に T P O 1 0 0 0 μ g 、 ヒト血清アルブミン 0 . 0 2 5 g 、 塩化ナトリウム 8 7 . 6 6 m g を含む水溶液を無菌的に調製し、1 m l ずつバイアルに分注し密封する。

< 実施例 2 >

実施例 1 におけるヒト血清アルブミン 0 . 0 2 5 g に代えて精製ゼラチン (タイプ B) 0 . 1 g を用い、同様にして製剤を調製した。

< 実施例 3 >

p H 6 . 0 の 1 m M クエン酸緩衝液 1 0 m l 中に T P O 2 5 0 0 μ g 、 ポリソルベート 8 0 1 0 m g 、 ソルビトール 0 . 5 g を含む水溶液を無菌的に調製し、1 m l ずつバイアルに分注し密封する。

< 実施例 4 >

p H 6 . 5 の 1 0 m M トリス緩衝液 1 0 m l 中に T P O

2500 μ g、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60 10 mg、塩化ナトリウム81.82 mgを含む水溶液を無菌的に調製し、1 ml ずつバイアルに分注し密封する。

以下、参考例として本発明の有効成分であるTPOの製造例を示す。

<参考例>大腸菌におけるTPO(1-163) / E. coli の製造例

(1) hMKT(1-163) の大腸菌発現用プラスミド pAMG11 - hMKT(1-163) の構築、大腸菌における発現

配列番号1の1位~163位までのアミノ酸配列を有するタンパク質(以下、TPO(1-163) / E. coli という。)を大腸菌で発現させるために、そのアミノ酸配列をコードするDNAを大腸菌における優先コドンを用いて化学合成した。更に、そのN末端にメチオニン残基とリジン残基を、またC末端側にストップコドンをコードするDNA配列を付加した。このDNA配列によりコードされるタンパク質、即ち配列番号1の1位から163位のアミノ酸配列のN末端にMet-Lysが付加されているタンパク質(以下、「hMKT(1-163)」という)のアミノ酸配列については配列番号2に示した。

合成された h M K T (1-163) 遺伝子フラグメントは、その 5' 末端、3' 末端にそれぞれ Xba I、HindIII 制限酵素部位を有しており、リボソーム結合部位、A T G 開始コドン、h M K T (1-163) のアミノ酸配列をコードする配列、および stop コドンを含んでいる。

上記フラグメントはラクトース誘導性発現ベクター、pAMG11 の Xba I、HindIII 部位にクローニングされた。pAMG11ベクターは、pR100 由来の複製起源をもつ低コピー数のプラスミドである。発現ベクター、pAMG11はプラスミド pCFM1656 (ATCC No . 69576、1994年2月24日付で寄託されている。) から P C R を利用した変異導入法により一連の部位特異的塩基の変異を起こすことによって得ることができる。このプラスミドの複製プロモーター、P c o p B のすぐ 5' 側にある Bgl II 部位 (プラスミド bp #180) から始まって、プラスミド複製遺伝子が続いているが、塩基対の変異は以下、表 3 に示すとおりである。

表 3

<u>pAMG11 bp #</u>	<u>bp in pCFM1656</u>	<u>bp changed to in pAMG11</u>
# 204	T/A	C/G
# 428	A/T	G/C
# 509	G/C	A/T
# 617	- -	2 対の G/C を挿入
# 679	G/C	T/A
# 980	T/A	C/G
# 994	G/C	A/T
# 1004	A/T	C/G
# 1007	C/G	T/A
# 1028	A/T	T/A
# 1047	C/G	T/A
# 1178	G/C	T/A
# 1466	G/C	T/A
# 2028	G/C	欠失
# 2187	C/G	T/A
# 2480	A/T	T/A
# 2499-2502	<u>AGTG</u>	<u>GTCA</u>
	TCAC	CAGT
# 2642	<u>TCCGAGC</u>	欠失
	AGGCTCG	
# 3435	G/C	A/T
# 3446	G/C	A/T
# 3643	A/T	T/A
# 4489-4512	- -	以下の塩基対を挿入
		<u>GAGCTCACTAGTGTTCGACCTGCAG</u>
		CTCGAGTGATCACAGCTGGACGTC

更に、特異的な Aat II 部位と Cla I 部位との間の DNA 配列を以下のオリゴヌクレオチドで置換した。

Aat II (#4358)

```

5'      CTCATAATTTTTTAAAAAATTCATTTGACAAATGCTAAAATTCTT-
3'  TGCAGAGTATTTAAAAATTTTTTAAGTAAACTGTTTACGATTTTAAAGAA-
      -GATTAATATTCTCAATTGTGAGCGCTCACAATTTAT      3'
      -CTAATTATAAGAGTTAACACTCGCGAGTGTTAAATAGC 5'

```

Cla I (#4438)

pAMG11 に導入された hMKT (1-163) 遺伝子の発現は以下に示した配列を有する Ps4 プロモーターのような合成ラクトース誘導性プロモーターによって誘導される。

```

5'  GACGTCTCATAATTTTTTAAAAAATTCATTTGACAAATGCTAAA-
      -ATTCTTGATTAATATTCTCAATTGTGAGCGCTCACAATTTATCGAT      3'

```

Ps4 プロモーターによる、hMKT (1-1-63) 遺伝子の発現は、大腸菌 lac I 遺伝子産物であるラクトースリプレッサー (Lac I)、により抑制される。

続いて、pAMG11- hMKT (1-163) プラスミドによって laq I^q 対立遺伝子を含む大腸菌 K-12 株を形質転換した。laq I^q 対立遺伝子は Lac I 遺伝子の発現を増加させる lac I プロ

モーターの内部における変異であり、その結果、P s 4 プロモーターによるタンパク質の発現に関し、より厳密なコントロールをうけることになる。従って、この株においては、ラクトースの非存在下では、h M K T (1-163) の発現は Lac I により抑制される。ラクトースの添加により P s 4 プロモーターのオペレーター部位への Lac I タンパク質の結合が減少し、P s 4 プロモーターによる h M K T (1-163) 遺伝子の転写が開始される。この実施例で宿主細胞として用いられた大腸菌は 1994 年 11 月 30 日付で ATCC に ATCC No. 69717 として寄託されている。

その大腸菌 (ATCC No. 69717) を、pAMG11- h M K T (1-163) プラスミドにより形質転換し、以下の培養条件にて培養した。

(2) h M K T (1-163) を発現する組換え大腸菌の培養、
T P O (1-163) / E. coli の製造

得られた形質転換株を L B 培地にて 30℃、約 12 時間培養した。培養した細胞は、バッチ培地 (酵母抽出物 20g/l ; クエン酸 3.4g/l ; K₂ HPO₄ 15g/l ; Dow P2000 15ml ; グルコース 5g/l ; MgSO₄ · 7H₂O 1g/l ; 微量金属類 5.5ml/l ;

ビタミン 5.5ml/l を含む) を含む発酵槽に無菌的に移された。まず、最初の培養工程では、その培養液の OD が A_{600} で 5.0 ± 1.0 に至るまで続けた。

次に、第 1 フィード培地 (グルコース 700g/l ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 6.75g/l を含む) は添加速度を規定の方法に従って、2 時間ごとに調整しながら培養を行った。

第 2 フィード培地 (トリプチカーゼ ペプトン 129g/l ; 酵母抽出物 258g/l) の添加は、培養液の OD が A_{600} で 2.0 ~ 2.5 になってから開始した。その第 2 フィード培地の添加は、第 1 フィード培地の添加を調整し続ける一方で、一定の流速を維持した。

培養は全工程にわたって約 30℃ で行った。培養液は必要に応じて酸や塩基を添加することにより pH 約 7.0 に保たれた。望ましい溶存酸素濃度は発酵槽における攪拌速度、通気速度、および酸素流入速度を調整することにより維持した。その培養液の OD が A_{600} で 5.7 ~ 6.3 に達してから、第 3 フィード培地 (ラクトース 300g/l) を一定の速度で発酵槽に送りこんだ。第 1 フィード培地の添加を止め、第 2 フィード培地の流速を新たに一定の速度に変更した。培養を第 3 フィード培地の添加開

始後、約 10 時間続けた。培養後、その培養液を 15 ± 5 °C まで冷却し、細胞を遠心分離により回収した。

得られたペレットは -60 °C 以下で保存された。

こうして組換え大腸菌で産生された h M K T (1-163) の精製、および T P O (1-163) / E. coli の製造は次のように行った。

細胞菌体 1800g を約 18 L の 10mM EDTA に懸濁し、高圧ホモジナイザーに 15,000 psi にて通した。破碎した細胞懸濁液を遠心分離にかけ、その沈澱物を 10 L の 10mM EDTA に再懸濁した。その懸濁液を遠心分離にかけ、沈澱物 200g を、2 L の 8M 塩酸グアニジン、10mM DTT、5mM EDTA を含む 10mM Tris 緩衝液、pH 8.7 で可溶化した。この溶液を 200 L の 3M 尿素、30% グリセロール、3mM シスタミン、1mM システインを含有する 10mM CAPS、pH 10.5 でゆっくりと希釈した。

この希釈液を 16 時間、室温にてゆっくりと攪拌し、pH を 6.8 に調整した。pH 調整後、清澄化し、1.5M 尿素、15% グリセロールを含む 10mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.8 で予め平衡化した 2 L の CM Sepharose カラム (ファルマシアバイオテク社製) に添加した。添加終了後、15% グリセロールを含有するリ

ン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.2で洗浄した。h M K T (1-163) は10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 中で塩化ナトリウム濃度0 から0.5Mの直線濃度勾配により溶出された。

このようにして得られたCM Sepharoseカラムの溶出画分を、分子量10,000カットの膜を用いて10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) で濃縮しかつバッファー交換した。その濃縮液 (タンパク濃度約2mg/ml) は、90分間、室温にてカテプシンC (基質タンパク質 : 酵素 = 500:1 (モル比)) により処理した。

この反応液を、15%グリセロールを含有する10mMリン酸ナトリウム (pH 7.2) で予め平衡化した1.2LのSP High Performance Sepharose カラム (ファルマシアバイオテク社製) に添加した。添加終了後、h M K T (1-163) のN末端のM e t - L y s が切断されたT P O 活性タンパク質、即ち、T P O (1-1-63) / E. coli は10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 中で塩化ナトリウム濃度0.1 から0.25M の直線濃度勾配で溶出した。

このSP High Performance カラムからの溶出液に0.6Mになるまで硫酸アンモニウムを添加し、0.6M硫酸アンモニウムを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) で予め平衡化した1.6L

の Phenyl Toyopearl カラム（東ソー社製）に添加した。T P O（1-163）／E. coli のピークは、10mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.2）中で硫酸アンモニウム濃度 0.6 から 0M の直線濃度勾配により溶出された。

このようにして得られた Phenyl Toyopearl の溶出液を、分子量 10,000 カットの膜を用いて 5 % ソルビトール含有 10mM Tris 緩衝液（pH7.5）で濃縮かつバッファー交換した。

配 列 表

配列番号 : 1

配列の長さ : 3 3 2

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

起源 : ヒト (H o m o S a p i e n s)

配列

```

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu
  1                5                10                15
Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val
      20                25                30
His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu
      35                40                45
Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu
      50                55                60
Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln
      65                70                75                80
Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln
      85                90                95
Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu
      100                105                110
Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe
      115                120                125
Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu
      130                135                140

```


GGC CAG CTT GGC CCG ACC TGC CTG TCT TCC CTG CTT GGC CAG CTG TCT 316
 Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser
 80 85 90
 GGC CAG GTT CGT CTG CTG CTC GGC GCT CTG CAG TCT CTG CTT GGC ACC 364
 Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr
 95 100 105 110
 CAG CTG CCG CCA CAG GGC CGT ACC ACT GCT CAC AAG GAT CCG AAC GCT 412
 Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala
 115 120 125
 ATC TTC CTG TCT TTC CAG CAC CTG CTG CGT GGC AAA GTT CGT TTC CTG 460
 Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu
 130 135 140
 ATG CTG GTT GGC GGT TCT ACC CTG TGC GTT CGT CGG GCG CCG CCA ACC 508
 Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr
 145 150 155
 ACT GCT GTT CCG TCT TAATGAAAGC TT 535
 Thr Ala Val Pro Ser
 160

請 求 の 範 囲

1. 糖鎖部を有していないTPOタンパク質と、タンパク質、セルロース誘導体、硫酸化多糖、界面活性剤、ポリビニルアルコール、マクロゴール、アミノ酢酸からなる群より選ばれる少なくとも1種の薬学的に許容される添加剤とを含むことを特徴とするTPO含有組成物。
2. TPO含有組成物を水溶液とした場合に添加剤が0.001～10%である請求項1に記載のTPO含有組成物。
3. 該タンパク質が、ヒト血清アルブミン、および／またはゼラチンであることを特徴とする請求項1または2に記載のTPO含有組成物。
4. 該セルロース誘導体が、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースからなる群より選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする請求項1または2に記載のTPO含有組成物。
5. 該界面活性剤が、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エ

テル、卵黄リン脂質、芳香族四級アンモニウム塩、アルキル硫酸塩からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする請求項1または2に記載のTPO含有組成物。

6. 該硫酸化多糖が、コンドロイチン硫酸ナトリウム、および/またはヘパリンナトリウムであることを特徴とする請求項1または2に記載のTPO含有組成物。

7. 糖鎖部を有していないTPOタンパク質を含有する組成物中に、タンパク質、セルロース誘導体、硫酸化多糖、界面活性剤、ポリビニルアルコール、マクロゴール、アミノ酢酸からなる群より選ばれる少なくとも1種の薬学的に許容される添加剤を含有させることを特徴とする、該組成物を含有する容器壁上へのTPOの吸着による力価低下を防止するための方法。

Fig. 1

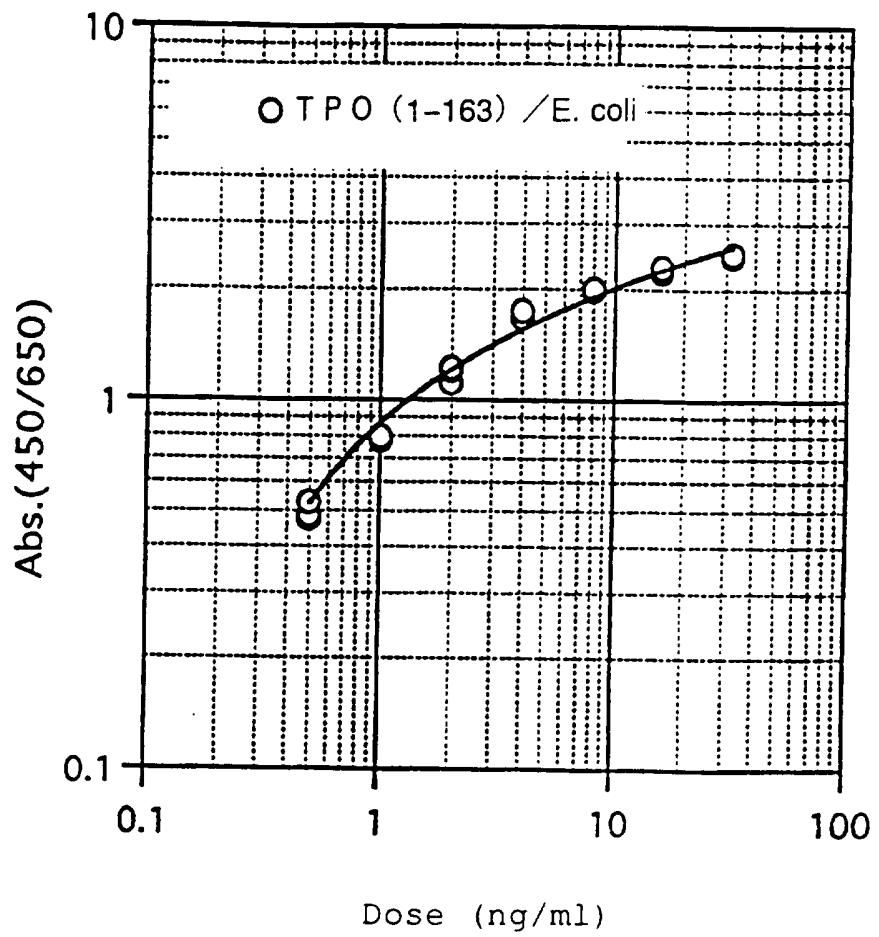
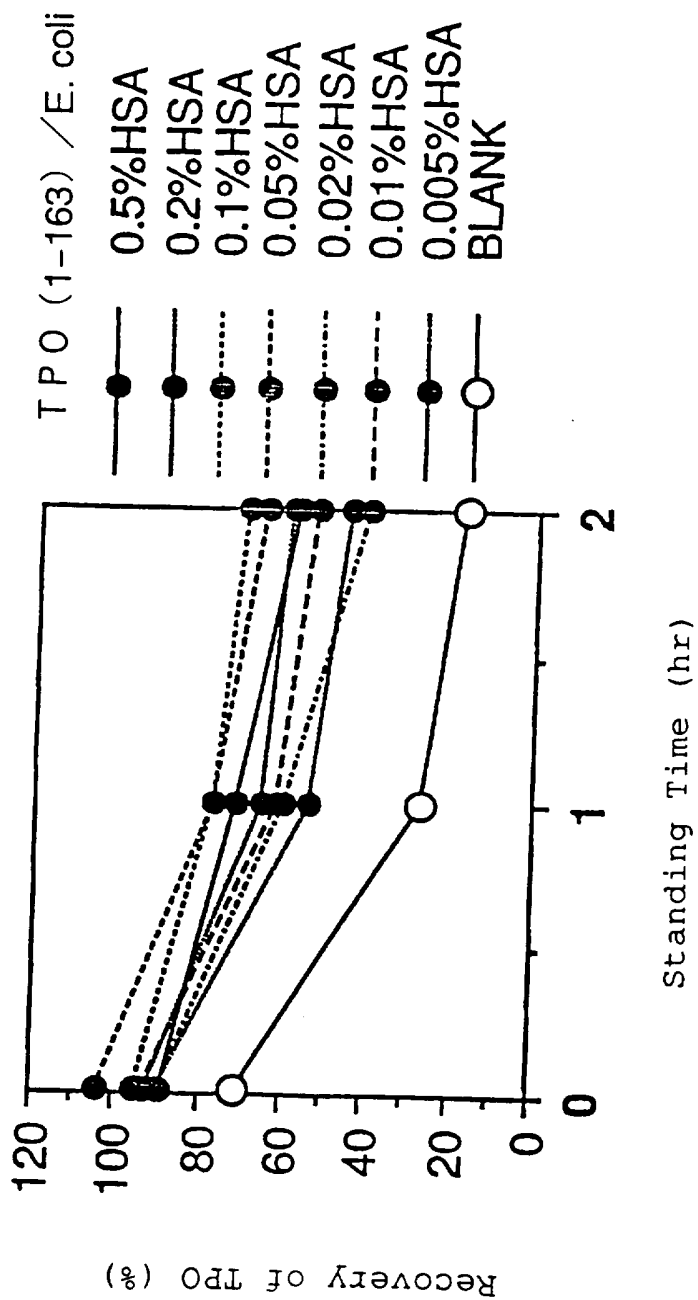


Fig. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00636

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K38/18, 38/19, 47/14, 47/18, 47/20, 47/24, 47/26,
47/32, 47/34, 47/36, 47/38, 47/42

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)

Int. Cl⁶ A61K38/18, 38/19, 47/14, 47/18, 47/20, 47/24, 47/26,
47/32, 47/34, 47/36, 47/38, 47/42

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)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 6-313000, A (Suntory Ltd.), November 8, 1994 (08. 11. 94) & EP, 583884, A	1 - 7
Y	JP, 4-506513, A (Genetics Institute, Inc.), November 12, 1992 (12. 11. 92) & WO, 90/12108, A & EP, 466780, A & US, 5260417, A	1 - 7
Y	JP, 3-72429, A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), March 27, 1991 (27. 03. 91) & EP, 363083, A	1 - 7
A	WO, 95/18858, A (Genentech Inc.), July 13, 1995 (13. 07. 95) & GB, 2285446, A & DE, 19500030, A & FR, 2714670, A	1 - 7
A	WO, 95/21919, A (Kirin Brewery Co., Ltd.), August 17, 1995 (17. 08. 95)	1 - 7

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 document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
June 4, 1996 (04. 06. 96)

Date of mailing of the international search report
June 11, 1996 (11. 06. 96)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00636

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& EP, 668352, A	
A	WO, 95/21920, A (Zymogenetics Inc. and another), August 17, 1995 (17. 08. 95) (Family: none)	1 - 7
A	WO, 95/21626, A (University of Washington), August 17, 1995 (17. 08. 95) (Family: none)	1 - 7
A	WO, 95/26746, A (Amgen Inc.), October 12, 1995 (12. 10. 95) & EP, 675201, A	1 - 7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁶ A61K38/18, 38/19, 47/14, 47/18, 47/20, 47/24, 47/26, 47/32, 47/34, 47/36, 47/38, 47/42

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁶ A61K38/18, 38/19, 47/14, 47/18, 47/20, 47/24, 47/26, 47/32, 47/34, 47/36, 47/38, 47/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 6-313000, A, (サントリー株式会社) 8. 11月. 1994 (08. 11. 94) &EP, 583884, A	1~7
Y	JP, 4-506513, A, (ジェネティックス・インスティテュート・イン コーポレイテッド), 12. 11月. 1992 (12. 11. 92) &WO, 90/12108, A, &EP, 466780, A &US, 5260417, A	1~7

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 06. 96

国際調査報告の発送日

11.02.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松 浦 新 司 印

4C 8314

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 3-72429, A, (中外製薬株式会社) 27. 3月. 1991 (27. 03. 91) &EP, 363083, A	1~7
A	WO, 95/18858, A, (Genentech Inc) 13. 7月. 1995 (13. 07. 95) &GB, 2285446, A, &DE, 19500030, A &FR, 2714670, A	1~7
A	WO, 95/21919, A, (麒麟麦酒株式会社) 17. 8月. 1995 (17. 08. 95) &EP, 668352, A	1~7
A	WO, 95/21920, A, (Zymogenetics Inc 他) 17. 8月. 1995 (17. 08. 95) (ファミリーなし)	1~7
A	WO, 95/21626, A (University of Washington), 17. 8月. 1995 (17. 08. 95) (ファミリーなし)	1~7
A	WO, 95/26746, A, (Amgen Inc) 12. 10月. 1995 (12. 10. 95) &EP, 675201, A	1~7