

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3927248号  
(P3927248)

(45) 発行日 平成19年6月6日(2007.6.6)

(24) 登録日 平成19年3月9日(2007.3.9)

(51) Int. Cl. F I  
**A 6 1 K 38/22 (2006.01)** A 6 1 K 37/24  
**A 6 1 K 47/02 (2006.01)** A 6 1 K 47/02  
**A 6 1 K 47/12 (2006.01)** A 6 1 K 47/12

請求項の数 1 (全 11 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平7-199018                  (22) 出願日 平成7年7月11日(1995.7.11)                  (65) 公開番号 特開平9-25241                  (43) 公開日 平成9年1月28日(1997.1.28)                  審査請求日 平成14年7月9日(2002.7.9)</p>	<p>(73) 特許権者 000002831                  第一製薬株式会社                  東京都中央区日本橋3丁目14番10号                  (73) 特許権者 591115073                  中村 敏一                  京都府京都市左京区岡崎法勝寺町1番地の4                  (74) 代理人 100077012                  弁理士 岩谷 龍                  (72) 発明者 田中 克実                  大阪府高槻市玉川1-9-1 住友化学高槻社宅110                  (72) 発明者 東尾 侃二                  埼玉県川越市山田1769-10</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	---

(54) 【発明の名称】 HGF凍結乾燥製剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

安定化剤としてデキストラン硫酸を含有し、さらにクエン酸塩、塩化ナトリウムおよび界面活性剤を含有するHGF凍結乾燥製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、HGFを含有する溶液を凍結乾燥することにより得られる、HGF凍結乾燥製剤に関する。さらに詳しくは、安定化剤、塩化ナトリウム、緩衝剤、又は界面活性剤の少なくとも一種以上を含有する、前記HGF凍結乾燥製剤に関する。本発明により、HGF

10

【0002】

【従来の技術】

HGFは肝実質細胞の増殖活性を有する蛋白質であり、異なったアミノ酸配列を有するものが報告されており、その名称も、HGF、TCF、SCF等が使用されている。本発明では、これらの公知の肝実質細胞増殖活性を有する蛋白質をHGFと総称する。

HGFは様々な薬理作用を示す生理活性ペプチドであり、その薬理作用については、例えば実験医学 Vol.10, No.3 (増刊) 330-339 (1992)に記載されている。HGFはその薬理作用から肝硬変治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗ガン剤、ガン療法用副作用防止剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸損傷治療剤、脳神経障害治療剤、免疫抑制副作用

20

防止剤、コラーゲン分解促進剤、軟骨障害治療剤、動脈疾患治療剤、肺線維症治療剤、肝臓疾患治療剤、血液凝固異常治療剤、血漿低蛋白治療剤、創傷治療剤、神経障害改善薬、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤等(特開平4-18028号公報、特開平4-49246号公報、EP 492614号公報、特開平6-25010号公報、WO 93/8821公報、特開平6-172207号公報、特開平7-89869号公報、特開平6-40934号公報、WO 94/2165公報、特開平6-40935号公報、特開平6-56692号公報、特開平7-41429号公報、WO 93/3061公報、特開平5-213721号公報等)としての開発が期待されている。

#### 【0003】

HGFの製剤については、WO 90/10651公報及び特開平6-247872号公報に記載がある。上記WO 90/10651公報は、HGFと比較してアミノ酸5残基が欠失したデリーションタイプのHGF(dLeHGF)について開示されており、TCFIIと称している。この明細書では、アルブミン、ヒト血清、ゼラチン、ソルビトール、マンニトール、キリシトール等がHGFを安定化することを開示している。これらは、水溶液製剤に関するものであり、HGFを水溶液中で安定化させる。また、特開平6-247872号公報は塩基性アミノ酸等とHGF(TCF)を共存させることにより、HGFを高濃度に含有させた製剤について開示している。

10

#### 【0004】

ところで、タンパク質は一般に凍結操作においてそれほど安定ではない(「蛋白質 核酸 酵素」37(9), 1517 (1992))。また、水溶液中におけるタンパク質の安定化剤は、水分子とタンパク質との相互作用によって安定化させるものであり、従って、水の存在しないタンパク質の凍結乾燥品においては、水溶液におけるタンパク質の安定化剤は、多くの場合、安定化効果を示さない(「蛋白質 核酸 酵素」37(9), 1517 (1992))。一方、HGFの凍結乾燥製剤についてはまったく知られておらず、またHGFの凍結乾燥製剤がどの程度の物理的及び生物活性的安定性を示すかは予想することができなかった。

20

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

HGFの水溶液製剤自体は、低温又は室温で数日間保存すると、凝集、白濁、ゲル化が認められ、性状が変化し、類縁体・重合体が形成される等、物理的安定性が低く、また生物活性が低下する等、生物活性安定性が低く、長期間の保存に対し安定な製剤ではない。そのことは、HGFを注射用製剤等とした医薬又は動物薬としての開発に大きな障害となっていた。本発明は上記の従来の課題を解決するものである。即ち、本発明の目的は、医療用医薬品又は動物用薬として長期間の保存でも安定な製剤の提供にある。

30

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は前記課題を解決するためになされたものであり、その要旨は、

- (1) HGF凍結乾燥製剤、
- (2) 安定化剤を含有する(1)記載のHGF凍結乾燥製剤、
- (3) 安定化剤がグリシン、アラニン、ソルビトール、マンニトール又はデキストラン硫酸である(2)記載のHGF凍結乾燥製剤、
- (4) 緩衝剤を含有する(1)から(3)のいずれかに記載のHGF凍結乾燥製剤、
- (5) 緩衝剤がクエン酸塩である(4)記載のHGF凍結乾燥製剤、及び
- (6) 安定化剤、塩化ナトリウム、緩衝剤及び界面活性剤を含有するHGF凍結乾燥製剤に関する。

40

#### 【0007】

##### 【発明の実施の形態】

本発明に使用されるHGFとしては、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば、種々の方法で精製されたものを用いることができる。

HGFの精製方法としては、各種の方法が知られている。例えば、ラット、ウシ、ウマ、ヒツジなどの哺乳動物の肝臓、脾臓、肺臓、骨髄、脳、腎臓、胎盤等の臓器、血小板、白血球等の血液細胞や血漿、血清などから抽出、精製して得ることができる(FEBS Letters,

50

224, 312, 1987、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 5844, 1989など参照)。

【0008】

また、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物(培養上清、培養細胞等)から分離精製してHGFを得ることもできる。あるいは遺伝子工学的的手法によりHGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えHGFを得ることができる(例えば、Nature, 342, 440, 1989、WO 92/01053公報、特開平5-111383号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967, 1989など参照)。上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物又は動物細胞などを用いることができる。

10

【0009】

より具体的には、HGFを生体組織から抽出精製する方法としては、例えば、ラットに四塩化炭素を腹腔内投与し、肝炎状態にしたラットの肝臓を摘出して粉碎し、S-セファロース、ヘパリンセファロースなどのゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC等の通常の蛋白質精製法にて精製することができる。

また、遺伝子組換え法を用い、ヒトHGFのアミノ酸配列をコードする遺伝子を、ウシパピローマウィルスDNAなどのベクターに組み込んだ発現ベクターによって動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、マウスC127細胞、サルCOS細胞などを形質転換し、その培養上清より得ることができる。

【0010】

かくして得られたHGFは、肝細胞の増殖効果を有していれば、そのアミノ酸配列の一部が欠失又は他のアミノ酸により置換されていたり、他のアミノ酸配列が一部挿入されていたり、N末端及び/又はC末端に1又は2以上のアミノ酸が結合していたり、あるいは糖鎖が同様に欠失又は置換されていたりしてもよい。

20

【0011】

「HGF凍結乾燥製剤」とは、HGFを含有する水溶液を通常の凍結乾燥方法で凍結乾燥した製剤をいう。

「安定化剤」としては、グリシン、アラニン等のアミノ酸類、ヘパリン、デキストラン硫酸等の多糖類、ソルビトール、マンニトール等の糖アルコール等が挙げられ、二種以上を併用してもよい。安定化剤を加えて製造したHGF凍結乾燥製剤は、さらにHGFの保存安定性が増した製剤である。好ましい安定化剤は、グリシン、アラニン、ソルビトール、マンニトール、デキストラン硫酸等が挙げられる。例えば、グリシン、アラニン、ソルビトール又はマンニトールの添加量として好ましいのは、HGFの重量に対して、0.01 - 100倍の重量が挙げられ、特に好ましいのは、0.1 - 10倍の重量が挙げられる。

30

【0012】

「緩衝剤」としては、例えばリン酸バッファー、クエン酸バッファー等が挙げられる。緩衝剤は、再溶解後の水溶液のpHを調整しHGFの溶解性を保つ作用を有する。すなわち、例えば実施例で使用した組換えHGFの場合、pHによってHGFの溶解度は変化し、pH7付近では0.1 - 5.0 mg/mlの溶解度を示すが、pH5付近では20 mg/ml以上の溶解度を示すため、pHを5.0 - 6.0にするのが好ましい。緩衝剤として好ましいものは、クエン酸バッファーが挙げられ、特に好ましくはクエン酸ナトリウムバッファーが挙げられる。このクエン酸バッファーは、再溶解後の水溶液中でのHGFの安定化にも寄与する。緩衝剤の添加量として好ましい範囲は、例えば再溶解後の水量に対し、1 - 100 mMとなる範囲が挙げられる。

40

【0013】

「界面活性剤」としては、例えばポリソルベート20、ポリソルベート80、プルロニックF-68、ポリエチレングリコール等が挙げられ、二種以上を併用してもよい。界面活性剤として特に好ましくは、ポリソルベート80を挙げることができる。HGFは容器の材質であるガラスや樹脂などに吸着しやすい。従って、界面活性剤を添加することによって、再溶解後のHGFの容器への吸着を防止することができる。界面活性剤の添加量とし

50

て好ましい範囲は、例えば再溶解後の水重量に対し、0.001 - 2.0%の重量の範囲が挙げられる。

【0014】

「塩化ナトリウム」はHGFの溶解性を保つ作用を有する。すなわち、例えば実施例で使用した組換HGFの場合、塩化ナトリウムの添加により溶解度が向上し、特に300mM以上では著しく溶解性が向上する（特開平6-247872号公報）。塩化ナトリウムの添加量は浸透圧比により制限を受けるが、一般的に用いられる注射剤の浸透圧比を示す量でよい。特に医療用又は動物薬用注射剤の浸透圧比として許容される浸透圧比1 - 2が好ましく、例えば再溶解後の水量に対し150 - 300mMとすることが好ましい。

【0015】

HGF凍結乾燥製剤は、HGFを含有する水溶液を通常の方法で凍結乾燥することで製造できる。例えば、HGFを適切な溶剤（例えば、滅菌水、緩衝液、生理食塩水等）に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、必要に応じて、安定化剤、緩衝剤、界面活性剤、塩化ナトリウム等を加え、凍結乾燥する。本発明の製剤は製剤化に必要な添加物、例えば、溶解補助剤、酸化防止剤、無痛化剤、等張化剤等を含んでもよい。凍結乾燥方法としては、例えば、1 常圧下で冷却凍結する凍結過程、2 溶質に拘束されない自由水を減圧下で昇華乾燥する1次乾燥過程、3 溶質固有の吸着水や結晶水を除去する2次乾燥過程の3つの単位操作による方法が挙げられる（Pharm. Tech. Japan, 8(1), 75-87 (1992)）。

HGFは、溶液調製時、凍結乾燥時、及びその凍結乾燥製剤を再溶解した水溶液において、非常に安定である。なお、HGF含量は、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜調整することができる。

凍結乾燥製剤は、使用時に注射用蒸留水等を加え、再溶解して使用される。

【0016】

【発明の効果】

本発明のHGF凍結乾燥製剤は、HGFを安定化させることができ、長期間の保存が可能となった。

【0017】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。なお、本実施例においては、WO 90/10651公報に記載のdLeHGF（5アミノ酸欠失型HGF、別名TCFII）を用いた。

実施例1

HGF凍結乾燥製剤の作製

300mM塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10mMクエン酸緩衝液（pH5.0）にHGF20mg/mlとなるように溶解し、無菌的にHGF水溶液を得た。本水溶液のpHを調整した後、無菌的にバイアルに充填し、表1に示す条件に従って凍結乾燥して、HGF凍結乾燥製剤を得た。なお、表中の は、温度を変化させたことを示す。

【0018】

【表1】

10

20

30

40

	凍結過程		1次乾燥過程		2次乾燥過程	
温度 (°C)	5 → -40	-40	-40 → 0	0	0 → 20	20
時間 (hr)	1	10	8	24	1	24
圧力 (mmHg)	760	760	<1	<1	<1	<1

10

## 【 0 0 1 9 】

## 実施例 2

H G F 凍結乾燥製剤の作製

実施例 1 において、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) の代わりに 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いて、H G F 凍結乾燥製剤を得た。

## 実施例 3

20

H G F 凍結乾燥製剤の作製

実施例 1 において、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) の代わりに 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いて、H G F 凍結乾燥製剤を得た。

## 実施例 4

H G F 凍結乾燥製剤の作製

実施例 1 において、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) の代わりに 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて、H G F 凍結乾燥製剤を得た。

## 【 0 0 2 0 】

## 実施例 5

H G F 凍結乾燥製剤の作製

30

300 mM 塩化ナトリウム、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 5) に H G F 20 mg/ml となるように溶解した。続いて、グリシンを 50 mg/ml になるよう溶解し、無菌的に H G F 溶解液を得た。本溶解液の pH を調整した後、無菌的にバイアルに充填し、実施例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により H G F 凍結乾燥製剤を得た。

## 実施例 6

H G F 凍結乾燥製剤の作製

実施例 5 において、グリシンの代わりにアラニンを用いて、H G F 凍結乾燥製剤を得た。

## 【 0 0 2 1 】

## 実施例 7

40

H G F 凍結乾燥製剤の作製

300 mM 塩化ナトリウム、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 5) に H G F 20 mg/ml となるように溶解した。続いて、ソルビトールを 200 mg/ml になるよう溶解し、無菌的に H G F 溶解液を得た。本溶解液の pH を調整した後、無菌的にバイアルに充填し、実施例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により H G F 凍結乾燥製剤を得た。

## 【 0 0 2 2 】

## 実施例 8

H G F 凍結乾燥製剤の作製

300 mM 塩化ナトリウム、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM クエン酸

50

緩衝液 (pH 6) に HGF 10 mg/ml となるように溶解した。続いて、デキストラン硫酸を 50 mg/ml になるよう溶解し、pH を調整して、HGF 溶解液を得た。次いで、バイアル充填し、実施例 1 の凍結乾燥の条件と同様な条件により HGF 凍結乾燥製剤を得た。

#### 実施例 9

##### HGF 凍結乾燥製剤の作製

実施例 1 において、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) の代わりに 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用い、また HGF 濃度を 10 mg/ml として、HGF 凍結乾燥製剤を得た。

【0023】

10

#### 試験例 1

##### HGF の生物活性に及ぼす凍結乾燥過程の影響

凍結乾燥製過程における HGF の生物活性の変化を確認するため、実施例 1 において、凍結乾燥前の HGF 水溶液及び凍結乾燥後そのまま再溶解した HGF 水溶液を用いて HGF の生物活性を測定した (生物活性測定法は以下に示す)。その結果を表 2 に示す。凍結乾燥前後で比活性に変化が認められなかったことから、凍結乾燥過程及び再溶解において HGF の生物活性は失活せず、HGF を凍結乾燥製剤とすることが可能であることが示された。

【0024】

##### 生物活性測定方法

20

Wistar 系雄性ラットを肝灌流して得られた肝細胞を精製し、細胞生存率を確認後、 $1 \times 10^4$  / well でプレートに播種した。5% 炭酸ガスインキュベータでのプレインキュベーション 20 時間後、HGF サンプル及び標準品を添加した (n = 3)。さらに、5% 炭酸ガスインキュベータでのプレインキュベーション 24 時間後、 $[^3\text{H} - \text{チミジン}]$  を添加し、2 時間ラベルした。細胞をセルハースターで回収し、細胞内に取り込まれた  $[^3\text{H}]$  量を測定した。測定結果を平行線検定法にかけ、標準品に対する比活性を求めた。

【0025】

【表 2】

凍結乾燥前後における生物活性	
サンプル	比活性
凍結乾燥前 溶液製剤	0.89
凍結乾燥製剤 溶解直後	0.94

30

40

【0026】

#### 試験例 2

##### 凍結乾燥製剤溶解後の性状

実施例で作製した凍結乾燥製剤を、-40、25、50 にて 1 ヶ月間保存後、溶解し、溶解後の性状を目視により観察した。凍結乾燥製剤の溶解は精製水で行った。その結果を表 3 に示す。-40 及び 25 の保存において、いずれの実施例の製剤も性状に関して安定であった。また、50 の保存においては、実施例 1 の製剤は溶解直後白濁したが、実施例 5、6 及び 7 の製剤は性状に関して安定であった。

【0027】

50

【表3】

凍結乾燥製剤溶解後の性質(1ヶ月保存品)			
製剤	性 状		
	-40℃	25℃	50℃
実施例1	澄明	澄明	白濁
実施例5	澄明	澄明	澄明
実施例6	澄明	澄明	澄明
実施例7	澄明	澄明	澄明

10

## 【0028】

20

## 試験例3

## 凍結乾燥製剤における重合体含量変化

実施例1、5、6及び7で作製した凍結乾燥製剤を、-40、25、40、50にて1ヶ月間又は2ヶ月間保存し、その凍結乾燥製剤に含まれる重合体含量とHGF含量の比を測定した。測定方法は以下に示すゲルろ過法を使用した。その結果を表4及び表5に示す。いずれの温度の保存においても、いずれの実施例の製剤も重合体の生成は少なく物理的に安定であった。また、特に実施例5、6及び7の製剤は重合体の生成は極端に少なく物理的に安定であった。

## 【0029】

## 重合体含量測定方法

30

HGF濃度を2mg/mlに希釈後、ゲルろ過法を用いて、下記の条件で測定した。

カラム : TOSOH TSK G-3000SW XL (0.78×30cm)

流速 : 0.5 ml/min

検出 : OD 280

温度 : 25

キャリアー : 10mM Tris, 150mM NaCl, 0.05% SDS, pH 7.0

アプライ : 20 µl

重合体の保持時間 : 13.0 min

HGFの保持時間 : 14.4 min

## 【0030】

40

## 【表4】

1ヶ月保存の凍結乾燥製剤の重合体含量/HGF含量				
	-40℃	25℃	40℃	50℃
実施例1	1.07%	1.59%	2.76%	6.17%
実施例5	0.92%	1.39%	1.83%	4.09%
実施例6	0.93%	1.54%	1.81%	2.90%
実施例7	0.90%	1.35%	2.57%	6.64%

10

【0031】

【表5】

2ヶ月保存の凍結乾燥製剤の重合体含量/HGF含量				
	-40℃	25℃	40℃	50℃
実施例1	0.92%	1.44%	3.91%	12.23%
実施例5	0.88%	1.21%	2.49%	7.49%
実施例6	0.85%	1.10%	1.96%	5.76%

20

30

【0032】

試験例4

重合体生成に及ぼすデキストラン硫酸の影響

実施例8で調製した凍結乾燥製剤を、50℃にて1ヶ月保存し、その凍結乾燥製剤に含まれる重合体含量とHGF含量の比を測定した。なお、測定は試験例3と同様にして行った。また、比較例として、デキストラン硫酸を含まない点以外は同様な成分及び方法により調製されている実施例9の凍結乾燥製剤を用いて、同様な試験を行った。その結果を表6に示す。表6に示されるように、デキストラン硫酸を添加することにより、高温保存しても重合体の生成は少なく、安定性が向上することが判明した。

40

【0033】

【表6】



凍結乾燥製剤の重合体含量/HGF含量		
	保存開始前	50℃, 1ヶ月保存後
実施例8	2.46%	9.45%
実施例9	1.78%	14.01%

10

## 【0034】

## 試験例5

## 凍結乾燥製剤の生物活性変化

実施例1、5、6及び7で作製した凍結乾燥製剤を、-40、40、50、60にて1ヶ月間又は2ヶ月間保存し、その凍結乾燥製剤を再溶解した水溶液の生物活性を、試験例1に示す生物活性測定方法で測定した。その結果を表7及び表8に示す。なお、実施例1、5、6及び7の製剤の再溶解後の水溶液の生物活性の初期値は、それぞれ $1.01 \pm 0.25$ 、 $0.91 \pm 0.18$ 、 $0.88 \pm 0.05$ 、 $1.03 \pm 0.04$ であった。60の保存では、やや生物活性に低下傾向が見られるものの、50以下の保存では、いずれの実施例の製剤も生物活性に殆ど変化はなく、生物活性的に安定であった。

20

## 【0035】

## 【表7】

1ヶ月保存の凍結乾燥製剤の生物活性 (比活性)				
	-40℃	40℃	50℃	60℃
実施例1	$0.96 \pm 0.13$	$0.92 \pm 0.13$	$0.81 \pm 0.07$	$0.54 \pm 0.05$
実施例5	$0.80 \pm 0.14$	$0.99 \pm 0.10$	$0.80 \pm 0.16$	$0.72 \pm 0.03$
実施例6	$0.92 \pm 0.14$	$1.02 \pm 0.06$	$0.94 \pm 0.08$	$0.78 \pm 0.03$
実施例7	$0.92 \pm 0.02$	$0.97 \pm 0.04$	$0.83 \pm 0.06$	---

30

## 【0036】

## 【表8】

40

2ヶ月保存の凍結乾燥製剤の生物活性 (比活性)			
	-40℃	40℃	60℃
実施例1	1.14±0.14	0.98±0.01	0.46±0.09
実施例5	0.95±0.05	0.84±0.09	0.57±0.01
実施例6	1.11±0.14	1.09±0.03	0.52±0.02

---

フロントページの続き

(72)発明者 熊沢 栄太郎

栃木県河内郡南河内町祇園 2 - 2 0 - 7

審査官 瀬下 浩一

- (56)参考文献 特開平04 - 018028 (JP, A)  
特開平06 - 247872 (JP, A)  
国際公開第90 / 010651 (WO, A1)  
特開平07 - 089869 (JP, A)  
特開平06 - 040935 (JP, A)  
特開平06 - 040938 (JP, A)  
特開平06 - 172207 (JP, A)  
特開平05 - 301824 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/22  
A61K 47/02  
A61K 47/12  
BIOSIS(STN)  
CAplus(STN)  
EMBASE(STN)  
MEDLINE(STN)