

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3844504号  
(P3844504)

(45) 発行日 平成18年11月15日(2006.11.15)

(24) 登録日 平成18年8月25日(2006.8.25)

(51) Int.C1.

F 1

C07K 14/62 (2006.01)  
C07K 1/30 (2006.01)C07K 14/62  
C07K 1/30

請求項の数 4 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平9-500832  
 (86) (22) 出願日 平成8年6月4日(1996.6.4)  
 (65) 公表番号 特表平11-506738  
 (43) 公表日 平成11年6月15日(1999.6.15)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US1996/007963  
 (87) 國際公開番号 WO1996/040730  
 (87) 國際公開日 平成8年12月19日(1996.12.19)  
 審査請求日 平成15年5月28日(2003.5.28)  
 (31) 優先権主張番号 08/484,220  
 (32) 優先日 平成7年6月7日(1995.6.7)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者  
 イーライ・リリー・アンド・カンパニー  
 アメリカ合衆国46285インディアナ州  
 インディアナポリス市、リリー・コーポ  
 レイト・センター  
 (74) 代理人  
 弁理士 青山 葉  
 (74) 代理人  
 弁理士 田村 恒生  
 (72) 発明者  
 ベイカー, ジェフリー・クレイトン  
 アメリカ合衆国46205インディアナ州  
 インディアナポリス、イースト・フォ  
 ティフォース・ストリート114番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アシル化タンパク質粉末の製造

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

脂肪酸アシル化タンパク質沈殿物を形成する方法であって、脂肪酸アシル化インスリン、脂肪酸アシル化インスリン類縁体、および脂肪酸アシル化プロインスリンからなる群より選択される脂肪酸アシル化タンパク質を含む溶液のpHをpH4.0～6.0の範囲内のpHに調節し、脂肪酸アシル化タンパク質が沈殿し、濾過できる粒子を形成するように溶液中の最終アルコール濃度が20～35容量%となる量のアルコールを添加することを含む方法。

## 【請求項2】

該脂肪酸アシル化タンパク質が、B30位のアミノ酸残基がThr、Alaであるかまたは欠失している脂肪酸アシル化類縁体である請求項1の方法。

10

## 【請求項3】

脂肪酸がミリスチン酸である請求項2の方法。

## 【請求項4】

脂肪酸アシル化タンパク質粉末の製造方法であって、

a) 請求項1～3のいずれかに記載の方法により製造される脂肪酸アシル化タンパク質沈殿物を回収し、

b) 工程a)の回収した沈殿物を乾燥して脂肪酸アシル化タンパク質を含む粉末を生成することを含む方法。

## 【発明の詳細な説明】

発明の背景

20

## 1. 発明の分野

本発明は、概して、アシル化タンパク質（特に、沈澱又は結晶化とそれに続く水溶液からの濾過による回収に抵抗するもの、具体的には、一定のアシル化プロインスリン類、アシル化インスリン類又はアシル化インスリン類縁体）を粉末として回収する方法に関する。より具体的に述べると、本発明は、一定のアシル化プロインスリン類、インスリン類及びインスリン類縁体の流動性（freely-flowing）粉末をそれらの水溶液から調製することに関する。

## 2. 関連技術の説明

インスリン療法は、長年の間、正常な個体における内因性インスリン分泌パターンを模倣することを目的としてきた。毎日の生理学的なインスリン需要には変動があり、これを2つの相、すなわち（a）食事に関する血中グルコースの変動を処理するためにインスリンのパルスを必要とする吸収相と、（b）絶食期の血中グルコースが最適に維持されるよう肝グルコース生産量を調節するための吸収後（post-absorptive）相に分けることができる。したがって、効果的な治療は、一般に、2つの外因性インスリン、すなわちボーラス注射によって供給される即効性食事期インスリンと、毎日1回又は2回の注射によって投与される持続性基礎インスリンの併用を必要とする。

最近、ある種のアシル化インスリンの使用が、持続性基礎インスリン療法として有望であることがわかった。これらのアシル化インスリン類は、プロインスリン、正常インスリン及び一定のインスリン類縁体を含む単量体インスリンの遊離アミノ基を、活性脂肪酸誘導体で選択的にアシル化することによって製造される。有用な脂肪酸誘導体としては、少なくとも6炭素原子鎖長を持つ反応性脂肪酸型化合物、特に8~21個の炭素原子をその鎖中に持つ脂肪酸誘導体が挙げられる。パルミチン酸誘導体でアシル化されたモノアシル化正常ヒトインスリンは特に有望な候補物質である。このカテゴリーに属するインスリン類は、日本国特許出願1-254,699に記述されている。

当業者にはよく知られているように、固体（好ましくは流動性粉末）のタンパク質を回収する方法は、多くの応用において（必須ではないとしても）とりわけ好都合である。例えば、粉末状タンパク質の製造により、貯蔵及び流通上の選択の幅が最大限になる。このことは、需要を満たすために大量の製品を生産しなければならないインスリン療法用組成物の場合は特にそうである。偶然にも、正常インスリン（牛肉インスリン、豚肉インスリン及びヒトインスリンを含む）は、比較的希薄なインスリン水溶液から亜鉛錯体又はナトリウム結晶としてインスリンを沈澱（より正確には結晶化）させることにより、粉末として回収できることが、かなり以前に発見された。一般に、いわゆる亜鉛インスリンは、亜鉛イオンを含有する緩衝水溶液から結晶化され、濾過によって容易に単離することができる。

残念ながら、長鎖脂肪酸誘導体でアシル化されたインスリン類を濾過によって回収しようとする試みは同じようには成功していない。実際、脂肪酸アシル化インスリン類を結晶化しようとする試みは、いずれも不成功に終わっている。これらのインスリン単量体上の長鎖脂肪酸部分の疎水性が、とりわけ、十分な結晶形成に必要とされるタンパク質-タンパク質相互作用を妨害することによって、結晶化を困難にしているのだと推測されている。したがって、固体粉末型のこれらアシル化インスリン類を製造するには、別な方法を発見しなければならない。

アシル化インスリンのようなアシル化タンパク質を粉末型で製造するための技術的に可能なアプローチの一つは、そのタンパク質の水溶液を凍結乾燥することである。脂肪酸アシル化インスリン類の粉末製剤はこの方法で生産することができるが、商業上必要とされるインスリンの大量生産に凍結乾燥技術を適合させることは簡単ではない。技師の安全と製品の取り扱いが、大量凍結乾燥操作にあっては特に問題となる。

もう1つの考えうる戦略は、等電沈澱の利用である。水溶液中のタンパク質の溶解性が、その環境のpHをそのタンパク質の等電点近くに調節すると減少することは、古くから知られている。この普遍的現象はタンパク質の精製と回収に古くから活用してきた。一旦不溶化すると、多くの場合、それらのタンパク質は、得られた水性懸濁液から簡単な重力濃

10

20

30

30

40

50

縮又は吸引及び加圧濾過によって回収することができる。

単にアシル化タンパク質水溶液のpHを等電的近くに調節することによって脂肪酸アシル化インスリン類を回収しようとする我々の試みでは、残念ながら、重力濃縮や吸引及び加圧濾過などによる簡単な固-液分離に抵抗するエマルジョン様組成物が生じた。したがって、このようなアシル化インスリン種を粉末の形態で回収するには、新しいアプローチを発見しなければならない。

本発明は、アシル化タンパク質（具体的には沈澱と濾過による上述のような単離及び回収に抵抗する一定の脂肪酸アシル化インスリン類）を沈澱及び濾過によって流動性粉末として回収する簡単な方法を提示する。したがって、本発明は、脂肪酸アシル化インスリン類を水溶液から流動性粉末として回収する方法を提供する。具体的には、本発明は、比較的大規模な生産技術に容易に適合させることができる粉末脂肪酸アシル化インスリンの回収法を提供する。本発明は、この方法によって製造される粉末タンパク質にも関係する。

#### 発明の説明

本明細書で使用するアミノ酸記号はすべて、37C.F.R. § 1.822(B)(2)に記載されているように、米国特許商標庁によって認められているものである。

本明細書で使用する「インスリン」とび「正常インスリン」という用語は、ヒトインスリン、豚肉インスリン又は牛肉インスリンを意味する。インスリンは3つの遊離アミノ基（B<sup>1</sup>-フェニルアラニン、A<sup>1</sup>-グリシン及びB<sup>29</sup>-リジン）を持つ。A<sup>1</sup>位とB<sup>1</sup>位にある遊離アミノ基は-アミノ基である。B<sup>29</sup>位の遊離アミノ基は-アミノ基である。

本明細書で使用する場合、「プロインスリン」とは、適当に架橋された式：

B-C-A

[ AはインスリンのA鎖又はその機能的誘導体をあらわす；

BはインスリンのB鎖又は-アミノ基を持つその機能的誘導体を表わす；

Cはプロインスリンの結合ペプチドを表わす ]

のタンパク質をいう。プロインスリンは、ヒトイインスリンのA鎖、ヒトイインスリンのB鎖、及びCが天然の結合ペプチドであることが好ましい。プロインスリンが天然配列である場合、プロインスリンは3つの遊離アミノ基 [ フェニルアラニン(1) (-アミノ基)、リジン(29) (-アミノ基) 及びリジン(64) (-アミノ基) ] を持つ。

本明細書で使用する場合、「インスリン類縁体」とは、インスリン活性を示す式：

A-B

[ AはインスリンのA鎖又はインスリンA鎖の機能的誘導体を表わす；

BはインスリンのB鎖又は-アミノ基を持つインスリンB鎖の機能的誘導体を表わす；

A又はBのうち少なくとも1つは、天然配列とは異なるアミノ酸を含むものとする ]

の適当に架橋されたタンパク質をいう。

好ましいインスリン類縁体には、次に挙げるものが含まれる。

B<sup>28</sup>位のアミノ酸残基がAsp、Lys、Leu、Val、又はAlaである；

B<sup>29</sup>位のアミノ酸残基がLys又はProである；

B<sup>10</sup>位のアミノ酸残基がHis又はAspである；

B<sup>1</sup>位のアミノ酸残基がPhe又はAspであるか、このアミノ酸残基が単独で又はB<sup>2</sup>位の残基と共に欠失している；

B<sup>30</sup>位のアミノ酸残基がThr又はAlaであるか、欠失している；

B<sup>9</sup>位のアミノ酸残基がSer又はAspである；

ただし、B<sup>28</sup>位又はB<sup>29</sup>位のいずれかはLysであるものとする。

当業者に知られている標準的な生化学用語で述べると、好ましいインスリン類縁体は、Ly<sup>s</sup><sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-ヒトイインスリン（B<sup>28</sup>がLys；B<sup>29</sup>がProである）；Asp<sup>B28</sup>ヒトイインスリン（B<sup>28</sup>がAspである）；Asp<sup>B1</sup>-ヒトイインスリン、Arg<sup>B31</sup><sup>B32</sup>-ヒトイインスリン、Asp<sup>B10</sup>-ヒトイインスリン、Arg<sup>A0</sup>-ヒトイインスリン、Asp<sup>B1</sup>,Glu<sup>B13</sup>-ヒトイインスリン、Ala<sup>B26</sup>-ヒトイインスリン、及びGly<sup>A21</sup>-ヒトイインスリンである。

「アシル化」とは、タンパク質の遊離アミノ基に共有結合した1又はそれ以上のアシル基の導入を意味する。

10

20

30

40

50

「脂肪酸」とは、飽和又は不飽和C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>脂肪酸を意味する。活性脂肪酸エステルとは、Methods of Enzymology, 25:494-499(1972)及びLapidotら, J. of Lipid Res., 8:142-145(1967)（これらは参考文献として本明細書の一部を構成する）に記述されているような一般的技術を用いて活性化されている脂肪酸を意味する。好ましい脂肪酸は飽和脂肪酸であり、ミリスチン酸(C<sub>14</sub>)、ペントデシル酸(C<sup>15</sup>)、パルミチン酸(C<sup>16</sup>)、ヘプタデシル酸(C<sup>17</sup>)及びステアリン酸(C<sup>18</sup>)が含まれる。脂肪酸はパルミチン酸であることがより好ましい。活性脂肪酸エステルとしては、ヒドロキシベンゾトリアジド(HOBT)、N-ヒドロキシスクシンイミド及びそれらの誘導体などといった試薬の誘導体が挙げられる。好ましい活性エステルはN-スクシンイミジルパルミテートである。

「架橋」とは、システイン残基間のジスルフィド結合の形成を意味する。適当に架橋されたプロインスリン、インスリン又はインスリン類縁体は、3つのジスルフィド橋を含有する。第1のジスルフィド橋は、A鎖の6位と11位にあるシステイン残基間に形成される第2のジスルフィド橋は、A鎖の7位にあるシステイン残基をB鎖の7位にあるシステインに連結する。第3のジスルフィド結合は、A鎖の20位にあるシステインをB鎖の19位にあるシステインに連結する。

「沈澱」とは、容易に濾過できる粒子を液体中に生成させる操作をいい、安定な懸濁液及び/又はエマルジョン様二相混合物の形成をもたらす溶液中の溶質の溶解性の単なる変化とは区別される。濾過できる粒子そのものは「沈澱物」という。

「容易に濾過できる」という表現及びこれに類する表現は、固-液混合物又はスラリーの粒子がデッドエンド(行き止まり; dead-end)濾過操作及び同様の技術によって単離されて、取扱い可能な濾過ケーキ(すなわち、そのケーキの(スラリーとしてではなく)固体としての取扱いの妨げとならない残存水分含量を持つ物質)を与える状態をいう。「デッドエンド(dead-end)」濾過は、スラリーを注入し、濾液をフィルター面に対して実質上垂直に通すものであり、主要な液体流がフィルター媒体の表面に対して平行である「横流(crossflow)」又は「接線流(tangential-flow)」濾過と対比すべきものである。重要な点は、本発明の方法が、デッドエンド濾過及び同様の技術によって51/m<sup>2</sup>/時間(LMH)を超える平均(average)又は中間(mean)濾過速度(多くの場合20LMH以上の平均又は中間濾過速度; ケーキが固体として取扱えるようになった時を濾過の終点とする)で単離することができるアシル化タンパク質のスラリーを生産するということである。商業的な生産規模で行なう操作の経済性には、このような濾過速度が不可欠である。

「水性(水溶液)」という用語は、補助溶媒系と水のみを溶媒として使用する場合とを包含する。

本発明は、アシル化タンパク質(具体的には等電沈澱によるアシル化タンパク質の水溶液からの単離及び回収に抵抗するアシル化タンパク質)を水性混合物から粉末として回収する方法に関する。この方法は、アシル化タンパク質の水溶液を溶液中のそのタンパク質が不溶性になるpHに調節すること、及び該pHで濾過可能な粒子状の当該タンパク質の沈澱を引き起こすに足るアルコールを、そのタンパク質の水性混合物に添加することからなる。もう1つの側面として、本発明は、粉末アシル化タンパク質、特に等電沈澱による水溶液からの単離に抵抗するアシル化タンパク質に関する。具体的に述べると、本発明は、アシル化インスリンタンパク質の水溶液を、該水溶液中のそのタンパク質を不溶性にするpHに調節し、該pHで濾過可能な粒子状の当該タンパク質の沈澱を引き起こすに足るアルコールを、そのタンパク質水溶液に添加することによって製造される、粉末状の脂肪酸アシル化プロインスリン、脂肪酸アシル化インスリン又は脂肪酸アシル化インスリン類縁体に関する。その後、濾過及び乾燥によって、そのタンパク質を無亜鉛粉末アシル化タンパク質として回収することができる。本発明の方法を用いて粉末の形態で製造される好ましいアシル化タンパク質としては、N-パルミトイ<sup>ル</sup>Lys<sup>B29</sup>ヒトインスリン及びB28-N-パルミトイ<sup>ル</sup>-Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-ヒトインスリン(B28がアシル化Lysであり、B29がProである)が挙げられる。

本発明の主な焦点であるアシル化タンパク質の製造に使用されるプロインスリン、インスリン及びインスリン類縁体は、よく知られる種々のペプチド合成法(古典的(溶液)法、

10

20

30

40

50

固相法、半合成法、最近の組換えDNA法を含む)のいずれでも製造できる。例えば、Chanceらの米国特許出願番号07/388,201、EP0公開番号383 472、BrangeらのEP0 214 826、及びBelagajeらの米国特許5,304,473は、種々のプロインスリン及びインスリン類縁体の製造を開示しており、これらは参考文献として本明細書の一部を構成する。本発明のインスリン類縁体のA鎖及びB鎖は、プロインスリン様前駆体分子を経て組換えDNA技術で製造することもできる。Frankら, Peptides: Synthesis-Structure-Function, Proc. Seventh Am. Pept. Symp., D. Rich及びE. Gross編(1981) (これは参考文献として本明細書の一部を構成する)を参照のこと。

一般に、プロインスリン、インスリン及びインスリン類縁体は、それらを活性脂肪酸誘導体(活性脂肪酸エステルなど)と反応させることによってアシル化される。脂肪酸による正常インスリンのアシル化は、日本国特許出願1-254,699に開示されている。Hashimotoら, Pharmaceutical Research, 6:171-176(1989)をも参照のこと。これらの開示は参考文献として本明細書の一部を構成する。

アシル化は、極性溶媒中、塩基性条件(すなわち9.0以上、好ましくは約10.5)で行なうことが好ましい。この反応は、10.75又はそれ以上の水性pKaを持つ塩基を用いて、完全な有機極性溶媒中でも行なうことができるが、我々はむしろ混合有機-水性溶媒を反応媒体として選択する。好ましい塩基はテトラメチルグアニジン、ジイソプロピルエチルアミン又は水酸化テトラブチルアンモニウムである。特に好適な溶媒の一つは、アセトニトリルと水(アセトニトリル含量約50%)だった。その他の極性溶媒としては、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどが挙げられる。補助溶媒系には、アセトンと水、イソプロピルアルコールと水、及びエタノールと水も含まれる。この反応の実施に適した時間と温度条件はそれほど厳密でなくてもよい。一般的には、0~40 の温度と15分~24時間の反応時間が適当なはずである。このような脂肪酸アシル化インスリン類を製造するための特に好ましい方法は、1994年11月17日に出願された同時係属米国出願番号08/341231(これは参考文献として本明細書の一部を構成する)に記述されている。

反応が完了したら、アシル化タンパク質を含むその反応混合物を通例、水で希釈し、酸を添加してアルカリ性を中和する。この酸は水溶液としてアシル化タンパク質に供給され、溶液のpHをそのタンパク質の等電点未満に下げる機能を果たす。通常、この時点で、タンパク質はさらなる処理に適した緩衝水溶液状態にある。具体的には、標準的なクロマトグラフィー法(逆相クロマトグラフィー又は疎水クロマトグラフィーなど)、横流(cross flow)濾過による濃縮、限外濾過による溶媒交換などが、この処理に含まれる。アシル化プロインスリン、アシル化インスリン及びアシル化インスリン類縁体、特にN-パルミトイ<sup>B29</sup>ヒトインスリンとB28-N -パルミトイ<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>ヒトインスリンについては、通常、必要なだけ酸を用いて、pHを約3.0未満(好ましくは約1.5~2.5)に調節すべきである。好適な酸としては、HCl、酢酸、グリシン、特にクエン酸が挙げられる。50mM濃度のクエン酸の使用が好適であることがわかった。必要であれば、望ましい範囲内にpHを維持するために、水酸化ナトリウムのような塩基でpHを再調節してもよい。

この時点で、単離された(好ましくは精製された)アシル化タンパク質(具体的には脂肪酸アシル化プロインスリン、脂肪酸アシル化インスリン又は脂肪酸アシル化インスリン類縁体)の水溶液を、本発明に従って処理することにより、可溶性タンパク質を粉末として回収することができる。本発明に従い、可溶性タンパク質を不溶性にするに足る量の塩基(好ましくは水酸化ナトリウムなどの水溶性塩基)を添加することにより、タンパク質水溶液のpHを調節する。これは、溶液のpHをそのアシル化タンパク質の等電点(等電点pHともいう)近くに調節することによって達成される。脂肪酸アシル化プロインスリン、脂肪酸アシル化インスリン及び脂肪酸アシル化インスリン類縁体(特にN-パルミトイ<sup>B29</sup>ヒトインスリン)の場合は、約4.0~6.0の範囲(好ましくは約4.5~5.5の範囲内)にpHを調節することが好ましいことがわかった。このpHでは、アシル化タンパク質上の正味の電荷が最小となり、そのタンパク質の溶解性が最低となっているはずである。pHの調節中は、完全に混合されるように溶液を攪拌すべきである。

本発明の方法に特に馴染むアシル化タンパク質の水溶液は、pHをその等電点pH付近に調節

10

20

30

40

50

した時にエマルジョン様組成物を形成する。この状態は、大規模処理に適したデッドエンド濾過などの固/液分離技術によるタンパク質の単離を妨げる。本発明の重要な特徴は、容易に濾過できるアシル化タンパク質沈澱物の形成を助長するために、水性タンパク質混合物にアルコール（特にエタノール）を添加することに関係する。

溶液pHの調節とアルコール添加の順番は重要でない。アルコールは、タンパク質を不溶化して最終的に沈澱を形成させるのに必要なpH調節に先立ってタンパク質溶液に加えることもできるし、タンパク質溶液のpH調節後に添加することもできる。

出願人は、容易に濾過できる沈澱物を得るためにアシル化タンパク質に加えなければならないアルコール量が狭い範囲内にあることを発見した。具体的に述べると、出願人は、脂肪酸アシル化インスリン（具体的にはN-パルミトイ<sup>B29</sup>ヒトインスリン）について、狭い範囲のアルコール（具体的にはエタノール）量を添加して、水性タンパク質懸濁液又はスラリー中の最終アルコール濃度を約20%以上約35%以下（好ましくは約25%～30%）にした場合にのみ、望ましい結果（つまり容易に濾過できる沈澱物の生成）が得られることを発見した。エタノールは明らかに選り抜きのアルコールであるが、メタノールやイソプロパノールなどといった他のアルコールも一定の状況では好適な代用物となるはずである。水性タンパク質にアルコールを加え過ぎると、十分な沈澱物生成レベルを得る妨げとなり、アルコール量が不十分だと、アシル化タンパク質のpH調節時に生成するエマルジョン様組成物が容易に濾過できるスラリー又は懸濁液に十分に変化しない。実際、望ましいレベルより高いアルコールレベルでは、タンパク質が再溶解して、収量減少の一因となるだろう。他の脂肪酸アシル化タンパク質の沈澱と濾過を容易にするために必要なエタノールなどのアルコール量の決定は、型通りの実験を用いて行なうことができる。

したがって本発明は、アシル化タンパク質（特に、他の方法では等電沈澱と濾過によるそのタンパク質水溶液からの単離及び回収に抵抗するもの）を流動性粉末として回収するには、次に挙げる条件の組み合わせを作らなければならないという認識に基づく：（a）そのタンパク質の等電点pH又はそれに近いpH、及び（b）容易に濾過できる粒子の生成を促進することによりそのタンパク質の沈澱及び濾過を助長するに足るアルコール濃度。上述のように、N-パルミトイ<sup>B29</sup>ヒトインスリンの場合は、スラリーの約20～35容量%（好ましくは25～30容量%）のエタノール濃度が、容易に濾過できる粒子の形態にあるタンパク質の沈澱を助長するのに特に適していることがわかった。

必要なアルコール（例えばエタノール）濃度を持ち、そのアシル化タンパク質の等電点pHを示す水性タンパク質混合物を調製する方法は、決定的な問題ではない。例えば、そのような混合物は、必要以上のアルコール濃度を持つpH調節済みのタンパク質水溶液を水で希釈することによって得ることができる。すなわち、N-パルミトイ<sup>B29</sup>ヒトインスリンの場合は、35容量%を超えるエタノール濃度（すなわち40～45%エタノール）を、望ましい範囲のアルコール濃度に希釈することによって、これを得ることができる。沈澱物の生成を促進するため、アルコール濃度とpHの両方を望ましい範囲内にする時に、組成物を穏やかに攪拌（混合）することが好ましい。

本発明に従って処理する前の溶液中のアシル化タンパク質濃度も決定的な問題ではない。アシル化インスリン類の場合は、アシル化プロインスリン類及びアシル化インスリン類縁体の場合をも含めて、一般に、少なくとも約1mg/ml（好ましくは少なくとも約5mg/ml）の濃度を使用すべきである。35～50mg/ml又はそれ以上の高濃度タンパク質を使用すれば、より良好な濾過速度で処理できる沈澱タンパク質が得られるはずである。上述のように、pH調節とアルコール添加の組み合わせ処理によって生産されるタンパク質スラリーは、少なくとも約5LMHの平均又は中間濾過速度を示すはずであり、好ましくは少なくとも約15LMHの中間濾過速度を示す。驚くべきことに、N-パルミトイ<sup>B29</sup>ヒトインスリン溶液を本発明に従って処理すると、約20LMH以上の中間濾過速度が観測された。

厳密に重要なわけではないが、最良の結果を得るには、濾過中の温度を20～30の範囲に維持する。しかし、0又はそれ以下の温度は望ましい高濾過速度での処理を妨害するので、濾過中はこれらの温度を避けるべきである。濾過は本質的に周囲温度で行なうことが好ましいが、事前のpH調節とエタノール添加段階は、そのスラリーの凍結点以上の任意

10

20

30

40

50

の温度で行なうことができる。

この時点では、水性タンパク質組成物は、濾過によって沈澱タンパク質を単離する準備ができている。場合によっては、濾過装置に対する液圧負荷を最小限にするために、濾過前に、その水性タンパク質組成物又はスラリーの重力濃縮又は沈降を行なうことが有利だろう。かなり大規模な処理（例えば約0.5kg以上の生産バッチ）には水性タンパク質組成物の遠心分離濾過が有利だろうが、本発明の一般的な実施では、吸引又は加圧濾過を含む任意の液/固分離手段を使用して、沈澱タンパク質を回収することができる。小規模（例えば約0.3～0.5kg未満のバッチサイズ）の場合は、多孔性フリット濾過面を持つ濾過装置を用いた加圧濾過の使用が有利である。公称ポアサイズ約5.0μmの多孔性フリットによる濾過が極めて有効であることがわかった。スラリーを濾過するために使用する装置は厳密に重要なわけではなく、医薬組成物の製造に適合する既知の様々な濾過システムはいずれも使用することができる。

濾過後、濾過ケーキを回収し、一般的には減圧留去によって、それを乾燥する。本発明の一般的な実施では、単離したタンパク質にとって有害でない限り、固体の濃厚ペーストを乾燥するための任意の方法を使用できる。濾過ケーキを回収する方法と濾過ケーキを乾燥する他の方法は、当業者には明らかなはずで、決定的な問題ではない。

本発明のアシル化インスリン粉末は、インスリン療法に使用される医薬組成物を製造するため（すなわち、それを必要とする患者（つまり高血糖症の患者）に投与するため）のバルク薬物（BDS）として有用である。そのような医薬組成物は、上記粉末の有効量を1又はそれ以上の医薬的に許容できる賦形剤又は担体と共に含有する。これらの用途には、約100単位/mL程度の有効量のアシル化インスリン粉末を含むように、医薬組成物を製剤化することができる。これらの組成物は一般的には（必ずしもそうではないが）非経口性であり、当技術分野でよく知られる従来の非経口製品用賦形剤又は担体を用いて、種々の技術のいずれでも製造することができる。例えば、*Remington's Pharmaceutical Sciences*（第17版、Mack Publishing Company、米国ペンシルバニア州イーストン、1985）を参照のこと（この刊行物は参考文献として本明細書の一部を構成する）。例えば、非経口投与剤は、望ましい量のタンパク質粉末を注射に適した非毒性液体担体（水性媒体など）に懸濁又は溶解し、その懸濁液又は溶液を滅菌することによって調製できる。別法として、測定した量の粉末をバイアルに入れ、そのバイアルと内容物を滅菌し、密閉してもよい。投与前に混合するために、バイアル又は賦形剤を添付してもよい。

非経口投与用の医薬組成物には、水及び水混和性有機溶媒（グリセリンなど）、ごま油、ピーナツオイル、プロピレングリコール水溶液、N,N-ジメチルホルムアミドなどの希釈剤、賦形剤及び担体を使用する。そのような医薬組成物の例としては、医薬的に許容できる緩衝剤で緩衝化することができ、発熱原を含まない、粉末の滅菌等張塩水溶液が挙げられる。また、非経口用医薬製剤は、メタクレゾールなどの保存剤、水酸化ナトリウムや塩酸などの最終製品のpHを調節するための試薬、及び亜鉛塩などの安定化剤を含んでもよい。以下、本発明を例示し、説明するために実施例を記載する。N-パルミトイyl Lys<sup>B29</sup>ヒトイインスリンの粉末としての回収を参照して本発明を例示するが、本発明の範囲はこの実施例に限定されないと考えるべきである。特に明記しない限り、割合と百分率はすべて重量に基づき、温度はすべて摂氏温度で表わす。

#### 実施例

脂肪酸アシル化生合成ヒトイインスリン（N-パルミトイyl Lys<sup>B29</sup>ヒトイインスリン）の水溶液（8.81）（タンパク質濃度50mg/ml、pH2.6）を2～8で530mlの10%水酸化ナトリウムで処理することにより、pHを5.7に上げる。このpH調節済み溶液を攪拌して十分に混合した後、pH調節済み溶液1リットルにつき0.46リットル（総体積131にする量）の無水エタノールを穏やかに攪拌しながら加えることにより、アシル化インスリンの沈澱を助長した。そのアシル化タンパク質スラリーを、公称ポアサイズ5.0μのステンレス鋼フリットを持つ加圧フィルターで脱水した。観測された中間濾過速度は約25LMHだった。濾液を捨てた。次に、濾過ケーキを30容量%エタノールを含む水溶液で洗浄し、洗浄した濾過ケーキをフィルターから回収して、減圧下で乾燥することにより、無亜鉛粉末を得た。この粉末は、優

10

20

30

40

50

れた貯蔵安定性を持つため、医薬用バルク薬物として好適であることがわかった。実質上すべてのタンパク質が濾過ケーク中に回収され、濾液にはほとんど失われなかった。

上述の明細書では、本発明の原理、好ましい態様及び実施法を、主として脂肪酸アシル化プロインスリン、インスリン及びインスリン類縁体（具体的にはN-パルミトイ<sup>B29</sup>Lys）に関して詳細に説明した。しかし、これらの記述は限定ではなく、例示であると見なすべきであるから、本願が保護を求める発明は開示した特定の形態に限られないと解釈すべきである。当業者は、以下の請求の範囲に規定する本発明の思想から逸脱することなく、修正や変更を施すことができる。

---

フロントページの続き

(72)発明者 モザー, ブライアン・エイ  
アメリカ合衆国46217インディアナ州 インディアナポリス、ウェスト・ハンナ・アベニュー  
751番

(72)発明者 シュレーダー, ウォーレン・イー  
アメリカ合衆国46227インディアナ州 インディアナポリス、エステル・ストリート7929  
番アパートメント10

審査官 田村 明照

(56)参考文献 特開平01-254699(JP, A)  
日本生化学会編, 「新生化学実験講座1 タンパク質I 分離・精製・性質」, 日本, 株式会社  
東京化学同人, 1990年 2月26日, 第1版, 第125-126頁

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 19/00

C12N 9/00 - 9/99

CA(STN)