(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3698721号

(P3698721)

(45)発行日　平成17年9月21日(2005.9.21)　(24)登録日　平成17年7月15日(2005.7.15)

(51)Int.Cl.[7]	F I
A61K 38/00	A61K 37/02
A61K 9/50	A61K 9/50
A61K 38/21	A61K 47/26
A61K 38/27	A61K 47/34
A61K 47/26	A61K 37/36

請求項の数 26　(全 20 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願平6-519100
(86)(22)出願日	平成6年2月17日(1994.2.17)
(65)公表番号	特表平8-507064
(43)公表日	平成8年7月30日(1996.7.30)
(86)国際出願番号	PCT/US1994/001666
(87)国際公開番号	WO1994/019020
(87)国際公開日	平成6年9月1日(1994.9.1)
審査請求日	平成13年2月8日(2001.2.8)
(31)優先権主張番号	08/021,421
(32)優先日	平成5年2月23日(1993.2.23)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者
ジェネンテク・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国カリフオルニア・９４０８０―４９９０・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌエー・ウェイ・１
(74)代理人
弁理士　青山　葆
(74)代理人
弁理士　田村　恭生
(74)代理人
弁理士　上田　敏夫
(72)発明者　クレランド，ジェフリー・エル
アメリカ合衆国カリフォルニア９４０７０、サン・カルロス、コルディリェラス・アベニュー８４４番

最終頁に続く

(54)【発明の名称】有機溶媒を用いて処理したポリペプチドの賦形剤安定化

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

有機溶媒で処理した場合の変性に対しポリペプチドを安定化させる方法であって、該方法はポリペプチドをトレハロースであるポリオール（ポリオールの分子量は約７０，０００kD未満である）と混合して混合物を形成し、該混合物を有機溶媒で処理することを含んでなる方法。

【請求項２】

ポリペプチドが成長ホルモンである請求の範囲第１項に記載の方法。

【請求項３】

成長ホルモンがヒトである請求の範囲第２項に記載の方法。

【請求項４】

ポリペプチドがγ－インターフェロンである請求の範囲第１項に記載の方法。

【請求項５】

有機溶媒が塩化メチレンである請求の範囲第１項に記載の方法。

【請求項６】

有機溶媒が酢酸エチルである請求の範囲第１項に記載の方法。

【請求項７】

ポリペプチドが乾燥している請求の範囲第１項に記載の方法。

【請求項８】

ポリペプチドが凍結乾燥されている請求の範囲第７項に記載の方法。

【請求項９】
トレハロースのポリペプチドに対する質量比が１００：１～１：１００である請求の範囲第７項に記載の方法。
【請求項１０】
トレハロースのポリペプチドに対する質量比が１：１～１：１０である請求の範囲第７項に記載の方法。
【請求項１１】
トレハロースのポリペプチドに対する質量比が１：３～１：４である請求の範囲第７項に記載の方法。
【請求項１２】
ａ）水溶液中のポリペプチドを、約７０，０００kD未満の分子量を有する、トレハロースであるポリオールと混合し；そして
ｂ）水溶液中の該ポリペプチドを有機溶媒で処理する、
ことを含んでなる変性有機溶媒を用いてポリペプチドを製剤化する方法。
【請求項１３】
工程ａの生成物を乾燥し、水性製剤中で再構成する請求の範囲第１２項に記載の方法。
【請求項１４】
制御放出のためにポリペプチドを製剤化することを更に含んでなる請求の範囲第１２項に記載の方法。
【請求項１５】
ａ）ポリペプチドを、約７０，０００kD未満の分子量を有するポリオール（ポリオールはトレハロースである）である賦形剤と混合し；そして
ｂ）工程ａ）の生成物を有機溶媒で処理する、
ことを含んでなる変性有機溶媒を用いて制御放出用乾燥ポリペプチドを製剤化する方法。
【請求項１６】
ポリマーマトリックス中にポリペプチドを被包することを更に含んでなる請求の範囲第１５項に記載の方法。
【請求項１７】
請求の範囲第１５項に記載の方法により調製した被包された組成物。
【請求項１８】
賦形剤と混合したポリペプチドを含んでなる、ポリペプチドの制御放出用の組成物であって、該賦形剤は約７０，０００kD未満の分子量を有する、トレハロースであるポリオールであり、賦形剤と混合したポリペプチドは有機溶媒で処理され、ポリマーマトリックス中に被包されている組成物。
【請求項１９】
賦形剤と混合したポリペプチドは水性製剤である請求の範囲第１８項に記載の組成物。
【請求項２０】
賦形剤と混合したポリペプチドは乾燥している請求の範囲第１８項に記載の組成物。
【請求項２１】
賦形剤と混合したポリペプチドは凍結乾燥されている請求の範囲第１８項に記載の組成物。
【請求項２２】
ポリマーがポリラクチドである請求の範囲第１８項に記載の組成物。
【請求項２３】
更に緩衝剤を含んでなる請求の範囲第１８項に記載の組成物。
【請求項２４】
緩衝剤がリン酸塩緩衝剤である請求の範囲第２３項に記載の組成物。
【請求項２５】
緩衝剤がコハク酸塩緩衝剤である請求の範囲第２３項に記載の組成物。
【請求項２６】

保存剤を更に含む請求の範囲第２３項に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
本発明は有機溶媒で処理したペプチドの、乾燥および水性製剤（formulation）を安定化させるための賦形剤の使用に関する。
発明の背景
ポリペプチドの医薬製剤は製剤化および貯蔵による変性および分解に敏感である。水性製剤中の、および水性溶液からの空気乾燥または凍結乾燥中のタンパク質および他の高分子を安定化させるためにポリオールを用いている。
米国特許第４，２９７，３４４号は、グリシン、アラニン、ヒドロキシプロリン、グルタミン、アミノ酪酸等の選択されたアミノ酸、および単糖類、オリゴ糖または糖アルコール等の炭水化物を加えることによる、熱に対する、凝集因子IIおよびVIII、アンチスロンビンIIIおよびプラスミノーゲンの安定化を開示する。
欧州特許公開第０３０３７４６号は、非還元糖、糖アルコール、糖酸、ペンタエリスリトール、ラクトース、水溶性デキストランからなるポリオール、並びにフィコル、アミノ酸、生理学的ｐＨで荷電する側鎖を有するアミノ酸のポリマー、およびコリン塩を用いた、生長促進ホルモンの安定化を開示する。
欧州特許公開第０１９３９１７号は、タンパク質および炭水化物の複合体の水溶液を特徴とする、徐放性の生物学的に活性な組成物を開示する。
オーストラリア特許出願ＡＵ－Ａ－３０７７１／８９はグリシンおよびマンニットを用いた生長ホルモンの安定化を開示する。
米国特許第５，０９６，８８号は、グリシン、マンニット、非イオン性界面活性剤およびバッファを含む、凍結乾燥用のｈＧＨの製剤を開示する。
タンパク質を安定化するためのポリエチレングリコールの使用はPharm.Res.、８巻、２８５～２９１頁、１９９１年にレビューされている。
水性の系における乾燥中のタンパク質の安定化のためのトレハロースおよび他のポリオールの使用の例には次のものがある。
米国特許第４，８９１，３１９号は、トレハロース存在下での周囲温度および大気圧下での乾燥による、水性の系中の敏感なタンパク質および他の高分子の保存を開示する。
米国特許第５，１４９，６５３号は、トレハロース存在下での、凍結状態または周囲温度での乾燥による、水性の系で生きているウイルスを保存する方法を開示する。
ポリオールは、例えば国際公開第８９０３６７１号（１９８９年5月5日出願）におけるように、乾燥した製品製剤を安定化させるためにも用いられている。該特許は油性媒体中に懸濁した細く粉末化された薬剤の混合物への、ゼラチン、アルブミン、デキストラン、またはトレハロース等の安定化剤の添加を開示する。
塩化メチレン等の有機溶媒によるポリペプチドの処理は、問題のポリペプチドの変性という問題を提出する。従って有機溶媒で処理した水性製剤中のポリペプチドを安定化させる方法を提供するのが本発明の目的である。
有機溶媒で処理した乾燥したポリペプチドを安定化させるのが本発明の他の目的である。
被包（emcapsulated）ポリペプチドの安定化方法を提供するのも本発明の他の目的である。
制御された放出性製剤における使用のために賦形剤により安定化されたポリペプチド（該ポリペプチドは有機溶媒で処理されている）を提供するのも本発明の他の目的である。
発明の概要
本発明の一態様は、有機溶媒で処理した場合の変性に対してポリペプチドを安定化させる方法であり、該方法は、分子量が約７０，０００kD未満のポリオールをポリペプチドと混合することを含んでなる。
本発明の他の態様は、
ａ）水溶液中のポリペプチドを、約７０，０００kD未満の分子量を有するポリオールと混合し、そして

ｂ）水溶液中のポリペプチドを有機溶媒で処理する、
ことを含んでなるポリペプチドを製剤化する方法である。
本発明の他の態様は、
ａ）ポリペプチドを、約７０，０００kD未満の分子量を有するポリオールである賦形剤と混合し、そして
ｂ）工程ａ）の生成物を有機溶媒で処理する、
ことを含んでなる制御された放出用乾燥ポリペプチドを製剤化する方法である。
本発明の他の態様は、賦形剤と混合したポリペプチドを含んでなるポリペプチドの制御された放出用組成物であり、該組成物において賦形剤は約７０，０００kD未満の分子量を有するポリオールであり、賦形剤と混合するポリペプチドは有機溶媒で処理されており、ポリマーマトリックス中に被包されている。

発明の詳細な記述

Ａ．定義

本明細書で用いる「ポリオール」の語は、炭素原子に結合した少くとも２つのヒドロキシルを含む炭化水素を言う。ポリオールは他の官能基を含んでもよい。本発明を実施するのに有用なポリオールの例には、マンニットおよびトレハロース等の糖アルコール、およびポリエーテルを含む。
本明細書で用いる「ポリエーテル」の語は、少くとも３つのエーテル結合を含む炭化水素を示す。ポリエーテルは他の官能基を含んでもよい。本発明を実施するのに有用なポリエーテルにはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む。
本明細書で用いる「乾燥したポリペプチド」の語は、凍結乾燥などの乾燥工程に付され少くとも５０％の水分が除かれているポリペプチドを示す。
本明細書で用いる「被包」の語は、ポリペプチド等の治療剤を、治療剤の制御された放出に有用な組成物に製剤化する方法を示す。本発明に有用なカプセル化用材料の例には、一般的に「ポリラクチド」と呼ばれる、乳酸およびグリコール酸のポリマーまたはコマポリマー、またはそのようなポリマーおよび／またはコポリマーの混合物を含む。
本明細書で用いる「混合」の語は、乾燥した薬剤の混合、乾燥した薬剤の溶液または懸濁液中の薬剤との混合、または薬剤の水性製剤の混合等による、問題のポリペプチドへの賦形剤の添加を示す。
本明細書で用いる「賦形剤」の語は、所望のコンシステンシーまたは安定化効果を得るために薬学的組成物に加える非治療性薬剤を言う。
本明細書で用いる「有機溶媒」の語は、炭素の化合物を含むすべて溶媒を意味することを意図する。例示的な有機溶媒には、塩化メチレン、酢酸エチル、ジメチルスルホオキシド、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミドおよびエタノールを含む。
本発明で用いる有機溶媒でポリペプチドを「処理する」とは、乾燥したポリペプチドを有機溶媒と混合すること、有機溶媒を用いて水性製剤中のポリペプチドのエマルジョンを作ること、水性製剤中のポリペプチドと有機溶媒の間に界面を作ること、または有機溶媒を用いて水性製剤からポリペプチドを抽出することを言う。
本明細書で用いる「ポリペプチド」とは、約１０以上のアミノ酸を有するペプチドまたはタンパク質を一般的に言う。

Ｂ．一般的方法

一般的には水性製剤および乾燥ポリペプチドを賦形剤と混合して、有機溶媒で処理する前に安定化効果を与える。ポリペプチドの水性製剤は溶液中または懸濁液中のポリペプチドであってよい。典型的には賦形剤の水性製剤をポリペプチドの水性製剤に加えるであろう。但し乾燥した賦形剤を加えてもよく、逆にしてもよい。ポリペプチドおよび賦形剤の水性製剤は凍結乾燥または他の手段により乾燥してよい。そのような乾燥した製剤は有機溶媒で処理する前に水性製剤へ再構築してよい。
問題のポリペプチドを安定化させるために用いる賦形剤は典型的には分子量７０，０００kD未満のポリオールである。用いてよいポリオールの例には、トレハロース、マンニット、およびポリエチレングリコールを含む。典型的にはトレハロースとポリペプチドとの質

量比は１００：１～１：１００、好ましくは１：１～１：１０、より好ましくは１：３～１：４である。マンニットとポリペプチドとの典型的なモル比は１００：１～１：１００、好ましくは１：１～１：１０、より好ましくは１：１～１：２であろう。典型的にはＰＥＧとポリペプチドとの質量比は１００：１～１：１００、好ましくは１：１～１：１０であろう。最適の割合は、ポリペプチドの変性を最小にしながらポリペプチドの溶解度を最大にする賦形剤濃度を基準にして選択する。

本発明の製剤は、保存剤、緩衝剤、トレハロースまたはマンニットの他にポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の多数の賦形剤またはトゥイーン（登録商標）等の非イオン性界面活性剤を含む。非イオン性界面活性剤としては、ポリソルベート２０または８０等のポリソルベート、ポロキサマー１８４または１８８等のポロキサマー、プルロニック（登録商標）ポリオール、および他のエチレン／ポリプロピレンブロックコポリマーを含む。安定な水性製剤を提供するのに有効な量を、通常約０．１％（ｗ／ｖ）～約３０％（ｗ／ｖ）の範囲で用いるであろう。

緩衝剤にはリン酸塩、トリス、クエン酸、コハク酸、酢酸塩、またはヒスチジン緩衝剤を含む。最も有利には緩衝剤は約２ｍＭ～約１００ｍＭの範囲である。好ましい緩衝剤にはコハク酸ナトリウムおよびリン酸カリウム緩衝剤を含む。

保存剤には、フェノール、ベンジルアルコール、メタクレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンザルコニウムクロライド、およびベンゼトニウムクロライドを含む。保存剤の種類および濃度範囲は重要でないが、好ましい保存剤は０．２～０．４％（ｗ／ｖ）フェノールおよび０．７～１％（ｗ／ｖ）ベンジルアルコールである。

一般に本発明の製剤は、安定な形の製造を損なわない量で、かつ有効で安全な薬学的投与に適した量の他の成分を含んでもよい。例えば当業者によく知られた他の薬学的に許容できる賦形剤は本発明の組成物の一部分を形成してよい。これらには、例えば様々なバルキング剤、更なる緩衝剤、キレート剤、抗酸化剤、コソルベント等を含み、これらの具体例にはトリヒドロキシメチルアミン塩（「トリス緩衝剤」）およびＥＤＥＴＡＴＥ二ナトリウムを含む。

問題のポリペプチドには、生長ホルモン、インターフェロン等のグリコシル化された、およびグリコシル化されないポリペプチドおよびＨＩＶプロテアーゼおよびgp１２０等のウイルスタンパク質を含む。

本発明の安定化されたポリペプチドは、持続放出用に製剤化されてよい。何故なら有機溶媒への暴露が多くのそのような製品において一般的な工程であるからである。持続放出性製品の適当な例には、ポリペプチドを含む固体の疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、該マトリックスは賦形された製品の形、例えばフィルムまたはマイクロカプセルである。持続放出性マトリックスの例にはポリエステル、ハイドロゲル［Langer等、J.Biomed.Mater.Res.,１５巻、１６７～２７７ページ（１９８１）およびLanger,Chem.Tech.,１２巻,９８～１０５頁（１９８２）に記載された例えばポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール）］、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号、欧州特許第５８，４８１号）、Ｌ－グルタミン酸とγ－エチル－Ｌ－グルタメートのコポリマー（Sidman等、Biopolymers.２２巻、５４７～５５６頁（１９８３））、非分解性のエチレン／酢酸ビニル（Longer等、同上）、Lupron Depot（商標）等の分解性乳酸－グリコール酸コポリマー（乳酸－グリコール酸コポリマーおよびロイプロリドアセテートよりなる注入可能なマイクロフフェア）、およびポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸（欧州特許第１３３，９８８号）を含む。エチレン－酢酸ビニルおよび乳酸－グリコール等のポリマーは、１００日以上の間分子の放出を可能にするが、いくつかのハイドロゲルはより短い期間でポリペプチドを放出する。カプセル化されたポリペプチドが人体中に長期間残存する場合、それらは３７℃で水分にさらされる結果として変性または凝集し、その結果として生物学的活性の損失および免疫原性の変化の可能をもたらす。合理的な戦略は関係するメカニズムに依存してポリペプチド安定化のために考案されている。例えば凝集メカニズムがチオ－ジサルファイド変換による分子間Ｓ－Ｓ結合形成であることが見出されたなら、安定化は、スルフヒドリル残基の改変、酸性条件からの凍結乾燥、

水分含量の調節、適当な添加剤の使用、および特殊なポリマーマトリックス組成物の開発により達成される。

持続放出リガンドアナログまたは抗体組成物にはリポソームに包みこまれたポリペプチドを含む。ポリペプチドを含むリポソームは従来公知の方法により調製される。例えばドイツ特許第３，２１８，１２１号；エプスタイン等、Proc.Natl.Acad.Sci.ＵＳＡ、８２巻、３６８８～３６９２頁（１９８５）；Hwang等、Proc.Natl.Acad.Sci.ＵＳＡ、７７巻、４０３０～４０３４頁（１９８０）；欧州特許第５２，３２２号、同第３６，６７６号、同第８８，０４６号、同第１４３，９４９号、同第１４２，６４１号；日本特許出願８３－１１８００８；米国特許第４，４８５，０４５号および同第４，５４４，５４５号および欧州特許第１０２，３２４号参照。通常リポソームは小さい（約２００～８００オングストローム）のユニラメラタイプであり、脂質含量は約３０モル％以上のコレステロールであり、選択される割合は最適のリガンドアナログ治療用に調節される。高められた循環時間を有するリポソームは、米国特許第５，０１３，５５６号に開示されている。

実施例

実施例Ｉ

水性製剤の安定化

組換ヒト生長ホルモン（hGH）および組換ヒトγ－インターフェロンを、有機溶媒、塩化メチレン中での安定化におよぼす賦形剤の影響を分析するために、様々な賦形剤を用いて製剤化した。至適の製剤は、一般に、塩化メチレンで処理した後、最大の可溶性ポリペプチド濃度および未変性ポリペプチドの最大回収を与える製剤であった。各溶液中でのhGHの最大溶解度は、重炭酸アンモニウム緩衝液中で凍結乾燥したhGHの溶液への連続的な添加により測定し、溶解度の限界はポリペプチドの添加が沈澱を生じる濃度として定義した。hIFN－γの最大溶解度は、濃厚なストック溶液（２６４mg／ml、hIFN－γ、１０mMコハク酸ナトリウム、pH５）を濃厚な賦形剤溶液に添加することにより測定した。hIFN－γの見かけの溶解度限界はこれらの条件でのいずれの製剤についても認められなかったが、ストック溶液の長期保存によるpH増加（最終溶液、pH６）の結果として沈澱を生じた。１００μlのポリペプチド溶液の１mlの塩化メチレンへの添加により両方のポリペプチド製剤を塩化メチレン中での安定性につき試験した。混合物を次に３０秒間ソニケートした。ソニケーションの後、５０mlの賦形剤を含まない緩衝液（hGHの場合５０mMリン酸塩緩衝液、pH８；hIFN－γの場合、１０mMコハク酸塩緩衝液、pH５）中への希釈により、ポリペプチドを有機相から抽出した。回収された可溶性ポリペプチドの量をＵＶ吸収測定により測定しモノマー性ポリペプチドの量をサイズ排除クロマトグラフィーにより評価した。

両ポリペプチドを、トレハロース、マンニット、カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）、トゥイーン２０界面活性剤、デキストラン、ゼラチンおよびポリエチレングリコールによる安定性につき試験した。hGHについての以前の研究により、等しい質量比のポリペプチドとマンニットを有する製剤がポリペプチドを変性から安定化させ、２００mg／mlという可溶性ポリペプチド最大濃度を与えた（１００mMリン酸塩、２００mg／mlマンニット、pH８）。１：４および１：３という賦形剤とポリペプチドの質量比を含むトレハロース製剤は、それぞれ４００mg／mlおよび３００mg／mlという可溶性ポリペプチドの最大濃度を生じさせた。さらに、これらの製剤中の凍結乾燥したポリペプチドを塩化メチレンで処理した場合、可溶性のモノマー性hGHの完全な回収が達成された。マンニット、またはＰＥＧと共にマンニットを含むhGH製剤は、モノマー性hGHの同様な回収をもたらしたが、変性を防止するのに必要な質量比（賦形剤／ポリペプチド）は、トレハロース製剤のそれより大きかった（マンニット１：１；マンニット／ＰＥＧ１：１または１：２；トレハロース１：３または１：４）（表Ｉ）。それ故トレハロースは、大きいhGH溶解性および塩化メチレン中での変性からの保護を小さい質量比で与える。賦形剤のない場合には、hGHの溶解度はずっと小さく（約１０６mg／ml）、ペプチドは変性をより受け易すかった。

表Ｉ　hＧＨ水性製剤の塩化メチレン試験

製剤[a]	回収された可溶性モノマー[b] (mg／mℓ)	最大溶解度[c] (mg／mℓ)
100mg／mℓ PEG (3350 MW)	１２．２	９６．４
50mg／mℓ PEG	３４．７	８９．６
10mg／mℓ PEG	３７．２	１２８．３
100mg／mℓ マンニット	６６．０	９８．０
50mg／mℓ マンニット	４６．２	１０６
10mg／mℓ マンニット	５６．０	１０６
100mg／mℓデキストラン70	３４．６	１１２．６
50mg／mℓ デキストラン70	６４．６	１４６．１
10mg／mℓ デキストラン70	３８．４	１６７．１
2% ＣＭＣ	４４．７	９１．９
100mg／mℓトレハロース	１１３．９	２６７．３
50mg／mℓ トレハロース	８２．８	２７５
10mg／mℓ トレハロース	９２．０	２６７．３
4mg／mℓ PEG (3350 MW) 96mg／mℓ マンニット	１０２．６	２４３．７
10mg／mℓ PEG (3350 MW) 90mg／mℓ マンニット	１０４．０	１８４
20mg／mℓ PEG (3350 MW) 80mg／mℓ マンニット	１３９．９	２４０
2% ゼンチン	２１．９	７０．５
100 mg／mℓ PEG(1000 MW)	６９．２	１３１．５
50mg／mℓ PEG	８４．３	２４６．５
10mg／mℓ PEG	１２６．５	２２６．３
4mg／mℓ PEG(1000 MW) 96mg／mℓ トレハロース	１２２．３	２３０．３
10mg／mℓ PEG(1000 MW) 90mg／mℓ トレハロース	５８．４	２１８．７
20mg／mℓ PEG(1000 MW) 80mg／mℓ トレハロース	７５．３	２０７．５
賦形剤なし	６５．０	１０６．３

a. 全溶液は１０ｍＭ　$NaPO_4$(ｐＨ８)を含む

b. ２７８ｎｍにおける吸収により測定した、塩化メチレンから抽出されたポリペプチド(全体のうちの割合)にＳＥＣ－ＨＰＬＣから回収されたモノマーの割合を掛けた値。最大溶解度で処理されたポリペプチド。

c. 最大溶解度は、各緩衝液に溶解するであろう製剤化されないｈＧＨの最大量として定義した。

hIFN－γについての研究の場合、マンニットとトレハロースが最良の賦形剤であった。マンニットを１：３という質量比（賦形剤／ポリペプチド）で用いた場合、塩化メチレン処理後の溶液中の可溶性ダイマーの量（サイズ排除クロマトグラフィーで測定）は、出発材料中の量と等量であった。しかしマンニット製剤は全可溶性ポリペプチドの６０％以下の回収を与えた。対照的に質量比１：２．５でのトレハロース製剤は、全可溶性ポリペプチドの８０％回収と、出発材料と同じ割合の可溶性ダイマー（サイズ排除クロマトグラフィーで測定）を与えた（表II）。塩化メチレンで処理した賦形剤を含まないポリペプチドは、塩化メチレン処理後最初の可溶性ダイマーの１０％を保持し（未変性ＳＥＣ－ＨＰＬＣで測定）、全可溶性ポリペプチド回収は６０％未満であった。PH６．８で０．２Ｍ　$NaPO_4$／０．１％ＳＤＳ中でのサイズ排除クロマトグラフィーによりアッセイした場合（ＳＤＳ　ＳＥＣ－ＨＰＬＣ）、すべての製剤は塩化メチレン処置の前後で９９％モノマーよりも小さかった。

両ペプチドについて、モノマー性ポリペプチドの劇的に低い回収がトゥイーン２０界面活性剤を含むすべての製剤について塩化メチレン処理後に認められた。他の界面活性剤は研究していないが、トゥイーン２０界面活性剤等の疎水性分子は変性したポリペプチドを安定化させ、一方マンニットおよびトレハロース等の糖は未変性のポリペプチドを安定化させる。

表Ⅱ　ｈＩＦＮ－γ水性製剤の塩化メチレン試験

製剤[a]	回収した可溶性ポリペプチド(%)[b]	インタクトダイマー(%)[c]	可溶性ダイマー[d]
0.01% トゥイーン[R] 20*	３６．１	４９．０	１１．１
0.01% トゥイーン[R] 20* 62㎎/㎖ マンニット	５９．０	６９．０	２５．６
5㎎/㎖ マンニット	５８．３	７２．７	５６．８
50㎎/㎖ マンニット	６２．９	８３．４	７０．３
5㎎/㎖ トレハロース	１１７	３４．２	５３．６
50㎎/㎖ トレハロース	７５．６	６１．３	６２．１
1% CMC	７８．２	６２．５	６５．５
賦形剤なし	５１．６	６．０	７．９

a. 賦形剤を有するすべての溶液は１３４㎎/㎖のｈＩＦＮ－γ、１０㎜Mのコハク酸ナトリウム(pH５)を含む。賦形剤のない製剤は２５６．３㎎/㎖のタンパク質、１０㎜Mのコハク酸ナトリウム(pH５．０)を含む。

b. ２８０nmにおける吸収により測定した、塩化メチレンから抽出したポリペプチド(全体のうちの割合)。

c. ＳＥＣ－ＨＰＬＣネイティブ法により測定したインタクト(intact)ダイマーの量。ＳＥＣ－ＨＰＬＣ　ＳＤＳ法により評価した場合、すべての製剤は＞９９％のモノマーを与えた。

d. 回収された可溶性ポリペプチドの量およびダイマーの割合を基準にした可溶性ダイマー濃度(㎎/㎖)(ネイティブＳＥＣ－ＨＰＬＣ法)

＊　これらの製剤中のポリペプチド濃度は６２．８㎎/㎖であった。

実施例II

カプセル化用乾燥および水性製剤の安定化

組換えヒト生長ホルモン用の長期間作用する製剤の開発において、hGHの持続放出用生分解性ポリマーマトリックスの使用を研究した。この応用に用いるポリマーは、しばしばポリ（乳酸／グリコール酸）またはＰＬＧＡと呼ばれる乳酸とグリコール酸とのコポリマーである。hGHをこのポリマー中に導入するためにＰＬＧＡを水と相溶性の溶媒に溶解せねばならない。ＰＬＧＡの溶解のために最も一般的に用いられる溶媒は、水との相溶性およびＰＬＧＡ溶解性の両方を提供する塩化メチレンであった。

一般に、hGH－ＰＬＧＡマイクロスフェアの製造のために、ポリペプチドをＰＬＧＡを含む塩化メチレンの溶液に加えた。最初の研究ではペプチドを粉末化した凍結乾燥粉末の形で加えた。ポリペプチド添加後、塩化メチレン溶液を短時間ホモジナイズし、溶液を乳化バスに加えた。この工程によりhGHを含むＰＬＧＡマイクロスフェアの付随的形成を伴う

塩化メチレンの抽出をもたらした。マイクロスフェアへの導入後のhGHの完全性を測定するため、これらのマイクロスフェアから放出されたポリペプチドを次に研究した。放出されたhGHの評価は分析的なサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ－ＨＰＬＣ）および他の技術により行った。サイズ排除クロマトグラフィーは、hGHがＰＬＧＡマイクロスフェアから、未変性モノマー、凝集物およびモノマーとダイマーの間に溶出する未知構造物の形で放出されることを示した。その未知のポリペプチド構造を広く研究し、hGHのコンホメーションバリアントであることが示された。さらに同じ凝集物およびコンホメーションバリアントが、hGHを塩化メチレンで処理することにより得られる。したがって、工程中で塩化メチレンを用いるとhGHの変性および凝集を起こすかも知れない。

ＰＬＧＡマイクロスフェアからモノマー性の未変性hGHを放出させることが長期間作用する製剤に必要である。以前の研究は塩化メチレン代用物としてのいくつかの有機溶媒を研究した。この研究はhGHはいくつかの有機溶媒により損傷され易いことを示した。塩化メチレンはＰＬＧＡマイクロスフェア製造に望ましい溶媒の性質（すなわち、水との相溶性、ＰＬＧＡ溶解等）を提供し、他の溶媒はhGH安定性を有意に改良しなかったので、塩化メチレンをＰＬＧＡマイクロスフェア製造のために選択した。溶媒の研究のためにおよびＰＬＧＡ製造工程において用いたポリペプチドを製剤化し、pH７の重炭酸アンモニウム緩衝液中で凍結乾燥した。それ故、この研究は、ＰＬＧＡマイクロスフェアの製造中のhGHを安定化させるであろう製剤を開発するために行った。

Ａ．方法

１．hGH製剤の調製

塩化メチレンに安定な製剤を開発するために、重炭酸アンモニウム中で凍結乾燥したhGHを所望の緩衝液中で再構築し、溶解させた。不溶のポリペプチドを１３，０００rpmで１分遠心分離することにより除去した。

以下に示す各凍結乾燥についてhGH濃度は１０mg／mlであった。これらの製剤の残存水分は測定しなかったが、同じ凍結乾燥サイクルを各場合に用いた。

凍結乾燥したタンパク質の粉砕は圧力駆動インパクションミルを用いて行い、hGHの微細な粒子を得た。

２．hGH製剤の塩化メチレン試験

hGHの安定性に及ぼす塩化メチレンの影響を、hGHを塩化メチレンの溶液に添加することにより調べた。固体のhGH条件の場合、ポリペプチド質量（mg）の有機溶媒の容積（ml）に対する割合は４０mg／mlであった。水性のhGH条件の場合、緩衝剤溶液中のhGHの１００μlを１．０mlの塩化メチレンに加え、各緩衝剤系の塩化メチレン中のhGHの安定性に及ぼす効果を評価した。ポリペプチド添加後、サンプルを４７KHzバスソニケーター（Cole Parmer、モデル０８８４９－００）で３０秒ソニケートし、マイクロスフェア製造工程におけるホモジナイズ工程をシュミレートした。製剤がこの試験でhGHを変性に対して安定化させるなら、その製剤を塩化メチレン中でのホモジナイズによりさらに評価した。ソニケーションまたはホモジナイゼーションの後、５０倍過剰の５mM $NaHPO_4$（pH８）中に希釈することによりポリペプチドを塩化メチレンから抽出した。この工程で抽出されたポリペプチドの量および品質を、ポリペプチド濃度測定（２７８nmにおける吸収）およびサイズ排除ＨＰＬＣ（ＳＥＣ－ＨＰＬＣ）により測定した。好ましい安定な製剤は、コンホメーションバリアントまたはダイマーより大きい凝集物を形成することなく、モノマー性ポリペプチドを最大に回収できるものであった。

Ｂ．結果

１．hGH安定化・賦形剤の研究

重炭酸ナトリウム中で凍結乾燥したhGHの最初の研究は、様々なpH条件における異なる緩衝液中のポリペプチドの溶解性を調べた。これらの研究から、hGHはリン酸塩緩衝液（５～１０mM）pH８で最大の安定性と溶解度を有することがわかり、かくしてさらなる研究をこの緩衝液中のhGHについて行った。

最初の試みは製剤緩衝液中でトゥイーン８０界面活性剤を用いてhGHの凝集を防止することであった。表IIIに示すように、これらの水性製剤の塩化メチレン試験は、１０mg／ml

のマンニットと共に用いる低いトゥイーン界面活性剤濃度（０．１％、トゥイーン８０界面活性剤）は可溶性モノマー性ポリペプチドの良好な回収を提供することを示した。しかし、この実験における最良の結果は、トゥイーン８０の界面活性剤を用いない１０mg／mlマンニット（５mM $NaHPO_4$、pH８）中で製剤化されたhGHについて得られた。製剤緩衝液中のトゥイーン界面活性剤の濃度を大きくすると凝集の増加および可溶性ポリペプチドの回収の減少をもたらした。表IIIに示した各ケースについて、製剤は、重炭酸ナトリウム中で凍結乾燥した粉砕したポリペプチドより、hGHのより大きい安定性を与えた。

表Ⅲ　　hGH水性製剤の塩化メチレン試験

			可溶性ポリペプチド（全体のうちの質量割合）			
製剤[a]	回収されたポリペプチド[b]（%）	面積回収[c]（%）	トリマー（%）	ダイマー（%）	中間物（%）	モノマー（%）
1%　トゥイーン 80	85.7	90.0	0.5	3.4	1.1	94.9
0.1% トゥイーン	70.9	98.3	2.0	3.6	1.8	92.6
1%　トゥイーン 80 10 mg/ml マンニット	65.0	97.8	3.3	3.4	3.4	90.0
0.1% トゥイーン 80 10 mg/ml マンニット	70.9	98.3	0.0	2.2	0.0	97.8
10 mg/ml PEG (3350 MW)	97.6	101.1	0.0	2.6	0.0	97.4
10 mg/ml PEG 10 mg/ml マンニット	76.4	97.7	1.7	2.8	1.6	93.9
5 mM $NaPO_4$ pH 8	55.3	99.4	0.0	3.2	0.0	96.8
5 mM $NaPO_4$ pH 8 10 mg/ml マンニット	91.7	99.8	0.0	1.8	0.0	98.2

a. すべての溶液は５mM　$NaHPO_4$(pH８)を含む。

b. ２７８nmにおける吸収から測定した、塩化メチレンから抽出したポリペプチド(全体のうちの割合)。

c. 塩化メチレン処理後に、緩衝液中に抽出したポリペプチドについてのＳＥＣ－ＨＰＬＣの結果。

固体のhGH製剤の塩化メチレン試験を表IVに示す。
これらの結果はタンパク質もよく安定化した製剤は５mM KPO_4、２．５mg／mlトレハロースであることを示した。

表Ⅳ　rhGH固体製剤の塩化メチレン試験

			可溶性タンパク質（全体のうちの質量割合）			
製剤[a]	回収されたポリペプチド[b]（%）	面積回収[c]（%）	トリマー（%）	ダイマー（%）	中間物（%）	モノマー（%）
粉砕した固体						
NH_4CO_3	44.5	85.4	7.5	5.9	7.3	79.2
5 mM $NaPO_4$ pH 8	85.7	100	0.0	2.1	0.0	97.8
5 mM $NaPO_4$ pH 8 10 mg/ml マンニット	87.6	100	0.0	3.0	0.0	97.0
均一にした固体[d]						
5 mM KPO_4 pH 8 2.5 mg/ml トレハロース	97.3	100	0.0	2.2	0.0	97.8
5 mM $NaPO_4$ pH 8 10 mg/ml マンニット	96.8	100	0.0	2.0	0.0	98.0
0.3 M Na コハク酸 10 mg/ml マンニット pH 7	97.3	100	0.0	4.2	0.0	95.8

a. すべてのサンプルを、示した緩衝液および賦形剤と共に１０mg／ml rhGHで凍結乾燥した。

b. ２７８nmでの吸収により測定した、塩化メチレンから抽出したタンパク質（全体のうちの割合）

c. 塩化メチレン処理後に緩衝液中に抽出したタンパク質についてのＳＥＣ－ＨＰＬＣの結果

d. 固体の凍結乾燥した製剤を塩化メチレン中で２５，０００rpmで１分間ホモジナイズした。

更なる研究を、界面活性剤が塩化メチレン－ポリペプチド界面を安定化させるか否か調べるために行った、そのため、トゥイーン界面活性剤を塩化メチレン相に加え、固体のhGHと混合した（KPO_4、pH８）。トゥイーン界面活性剤を塩化メチレン相に添加することは、表Ⅴに示すように、固体のhGH（KPO_4、pH８）の安定性を改良しなかった。さらに塩化メチレン相中における界面活性剤、スパン（登録商標）８０の使用は固体のhGH（KPO_4、pH８）の安定性を改良しなかった。塩化メチレン相中のトゥイーン界面活性剤を用いる更なる試みは、より安定な固体のhGH製剤（マンニット、KPO_4、pH８）について成功しなかった。水系での研究と共にこれらの結果は、トゥイーン界面活性剤はこれらの製剤と共には好ましくは用いられないことを示す。何故なら、それは凝集が促進し、塩化

メチレンで処理したhGHの溶解性を減少させるからである。

表Ｖ　塩化メチレン相中のトゥイーン界面活性剤の固体のｈＧＨ安定性に及ぼす影響

			可溶性ポリペプチド（全体のうちの質量割合）			
トゥイーン（$MgCl_2$中）	回収されたポリペプチド[a]（%）	面積回収[b]（%）	トリマー（%）	ダイマー（%）	中間物（%）	モノマー（%）
0.01% ﾄｩｲｰﾝ 80	40.8	98.7	5.2	13.0	0.0	81.8
0.1% ﾄｩｲｰﾝ 80	40.8	102.9	8.0	14.0	0.0	77.9
1% ﾄｩｲｰﾝ 80	53.8	97.3	7.0	11.6	0.0	81.4

a. ２７８nmにおける吸収から測定した、塩化メチレンから抽出したポリペプチド(全体のうちの割合)。

b. 塩化メチレン処理の後に緩衝液に抽出されたポリペプチドについてのＳＥＣ－ＨＰＬＣの結果

マイクロスフェア中に充填するポリペプチドの量を増大させるために、賦形剤の量は最小にすべきである。それ故、１０mg／ml hGHと共に低い濃度のマンニット（２および５mg／ml）を製剤緩衝液（１０mM $NaHPO_4$、pH８）に用い、その水性溶液を塩化メチレン安定性につき試験した。これらのマンニット濃度は、１０mg／mlマンニット製剤より２０％少ない可溶性モノマーを生じさせた。マンニット濃度の有意な減少は放出されるポリペプチドの品質を犠牲にするであろう。低濃度の別の賦形剤も試みた。０．５、２および５mg／mlのカルボキシメチルセルロースを水性製剤（１０mg／ml hGH、１０mM $NaHPO_4$、pH８）に用いた。０．５mg／mlのＣＭＣは１０mg／mlマンニット製剤と同じ割合の可溶性モノマーを得たが、水相に回収されたポリペプチドの量は１５％少なかった。ＣＭＣおよびマンニットの等質量混合物（各１mg／mlおよび２．５mg／ml）も、低賦形剤濃度での安定性を得るために試みた。各賦形剤の２．５mg／mlの使用は１０mg／mlマンニット製剤に匹敵する結果を得た。０．５mg／ml ＣＭＣおよび各２．５mg／mlのＣＭＣおよびマンニット製剤をそれ故凍結乾燥して、マイクロカプセル化のためのそれらの使用を評価した。

水性の形態での使用のための製剤を評価するために、それぞれの凍結乾燥した材料を、更なるペプチドが溶液中に溶解しないポリペプチド濃度として定義する最大溶解度まで再構築した。この実験におけるhGHの最大濃度は、１０mg／mlのマンニット中で凍結乾燥した製剤の場合達成された。この製剤は、５mM $NaHPO_4$緩衝液、pH８を用いて、ポリペプチドの沈澱を生じることなしに２００mg／mlのhGH（２００mg／mlマンニット、１００mM KPO_4）までうまく再構築された。賦形剤のない製剤（KPO_4、pH８）は１６５mg／ml hGHで２番目に良い溶解度を与えた。しかし、高ポリペプチド濃度でＣＭＣおよびＣＭＣ／マンニット製剤を再構築する試みは成功しなかった。両方の場合、製剤は１００mg／ml以上の濃度でペーストを形成した。ＣＭＣおよびＣＭＣ／マンニット製剤から形成されたペーストの塩化メチレン試験は、回収されたポリペプチドの量はマンニット製剤と比べてかなり減少（７５％以下の回収）するが、可溶性の画分は９５％以上モノマーであった。工程中の内部の水相を安定化させるのにゲル様製剤が有用性を有するかも知れないので、他の増粘剤、ゼラチンも試みた。最終の製剤（２００mg／ml hGH）用ゲルを得つつ、低賦形剤濃度を維持するために、ゼラチン製剤を０．５mg／mlゼラチン、１０mg／ml hGH、１０mM

ＫＰＯ$_4$、pH８で試験した。この製剤の塩化メチレン試験は、１０mg／mlマンニット製剤に匹敵する可溶性モノマーの回収を示した。それ故、この製剤も更なる分析のため凍結乾燥した。２００mg／ml hGH（１０mg／mlゼラチン、１００mM ＫＰＯ$_4$、pH８）での凍結乾燥したポリペプチドの再構築は、同じhGH濃度でのＣＭＣ／マンニットおよびＣＭＣ製剤の性質と似た性質を有するペーストの生成をもたらした。

実施例III

酢酸エチル中のrhGH製剤の安定性

生分解性ポリマー中へのタンパク質のマイクロカプセル化はポリマーを溶解させるための有機溶媒の使用をしばしば必要とする。ポリマー、典型的にはＰＬＧＡ、ポリラクチド（ＰＬＡ）、またはポリグリコライド（ＰＧＡ）を、水と完全には相溶性でない有機溶媒に先ず溶解する。この方法に用いる一般的な有機溶媒は塩化メチレンおよび酢酸エチルである。これら２つの溶媒は非常に異なった物理的および化学的性質を有する。それ故、両溶媒中におけるrhGH製剤の安定性を評価することが必要であった。

酢酸エチル中の安定性についてのrhGH製剤の試験は、上の実施例中の塩化メチレン研究に用いた方法と類似の方法で行った。１０mg／mlのrhGH溶液を、凍結乾燥した固体のrhGH（重炭酸アンモニウム製剤）を各製剤に加えることにより調製した。表ＶＩに示すように、製剤は５mM ＫＰＯ$_4$（pH８）を用いて調製し、異なる賦形剤、ＰＥＧ（分子量３３５０）、マンニット、トレハロースおよびトゥイーン２０、または賦形剤の組み合わせを含んだ。各rhGH製剤（１００μl）を１mlの酢酸エチルに加え、３０秒ソニケートし、エマルジョンを形成した。このエマルジョンを次に１０mlの５mM ＫＰＯ$_4$（pH８）と混合し、rhGHを全体で１００倍希釈した。緩衝液に抽出されたrhGHをサイズ排除ＨＰＬＣにより分析した。数個の製剤は可溶性タンパク質の１００％以上の回収を与え、エマルジョンに添加したタンパク質の量は容積測定における正確さの結果として算定した量（０．１ml×１０mg／ml＝１mg）より大であることを示した。さらに、可溶性タンパク質の回収および回収されたモノマー量は、塩化メチレンで処理された同じ製剤中のrhGHより一般に大きかった。結局、可溶性タンパク質の回収は、トレハロース（１および２mg／ml）、トレハロースとＰＥＧ（各１０mg／ml）、マンニットとＰＥＧ（各１０mg／ml）およびマンニットとトゥイーン２０（各１０mg／ml）の場合最大であった。しかし、トレハロースのみ（１および２mg／ml）およびマンニットとトゥイーン２０（各１０mg／ml）も大きいモノマー含量（９７％以上）を有した。マンニット／トゥイーン２０製剤は二重エマルジョンマイクロカプセル化工程の場合適当な溶解度を許さず、４：１の賦形剤対タンパク質比（質量で）を必要とする。かくして、これらの実験における至適の製剤は１mg／mlトレハロース製剤（１：１０の賦形剤対タンパク質比および大きいrhGH溶解性）であった。

表VI　テキストに記載した水性rhGH製剤の酢酸エチル試験

製剤[a]	回収(可溶)[b] (%)	可溶性タンパク質 (全体のうちの質量割合)		
		大凝集物 (%)	ダイマー (%)	モノマー (%)
賦形剤なし	98.9	2.3	3.2	94.5
10 mg/ml PEG (3350 MW)	99.8	2.7	2.3	94.9
5 mg/ml PEG	108.5	1.7	3.0	95.2
2 mg/ml PEG	107.2	1.8	3.8	94.3
10 mg/ml マンニット	96.6	1.7	3.6	94.7
2 mg/ml マンニット	86.3	4.1	3.8	92.2
10 mg/ml トレハロース	100.1	1.8	4.5	93.7
2 mg/ml トレハロース	119.8	0.4	2.0	97.7
1 mg/ml トレハロース	111.1	0.6	2.3	97.1
10 mg/ml PEG (3350 MW) 10 mg/ml トレハロース	115.6	3.8	2.9	93.3
2 mg/ml PEG (3350 MW) 2 mg/ml トレハロース	93.0	0.8	3.1	96.1
1 mg/ml PEG (3350 MW) 1 mg/ml トレハロース	95.8	4.5	3.3	92.2
10 mg/ml PEG (3350 MW) 10 mg/ml マンニット	116.3	1.2	2.5	96.3
2 mg/ml PEG (3350 MW) 2 mg/ml マンニット	106.5	1.7	2.7	95.6
0.1% トゥイーン 20 10 mg/ml マンニット	122.8	0.8	1.6	97.6

a. すべての初めの試験液は次のものを除き、１０mg／ml rhGHおよび５mM KPO_4(pH８)を含んでいた。但し、製剤のうちの３つは１０mg／ml以下のrhGH濃度であった(賦形剤なし: ９．３９mg／ml; １０mg／mlマンニット／１０mg／ml PEG: ７．８４mg／ml; １０mg／mlマンニット:９．７１mg／ml)。

b. 酢酸エチル処理後に緩衝液に抽出されたタンパク質についてのＳＥＣ－ＨＰＬＣ結果。可溶性タンパク質の回収%は、サンプルの全ピーク面積および適当な対照(同じ製剤)の全ピーク面積からの濃度比×１００%として定義した。対照のrhGH濃度は２７８nmにおける吸収により測定し、試料のrhGH濃度は、全体の方法で用いた希釈物を基準にしたストック材料の１００倍希釈として計算した(１０mlの緩衝液に加えた１mlのEtAc中の０．１ml)。

実施例IV

有機溶媒中のスプレードライしたrhGH製剤の安定性

マイクロカプセル化のための二重エマルジョン技術（水中油中水、ウォーター－イン－オイル－イン－ウォーター）は最終製品における薬剤の中等度の充填を提供するのみである。薬剤充填は、水への薬物の溶解性および有機溶媒中のポリマーへ加えることができる水性薬剤の体積により限定される。１グラムのポリマー当たり０．５ml以上の薬剤体積は、マイクロスフェアからの薬剤の大きい初期バースト（burst）をもたらす。これらの困難を避けるため、固体の薬物製剤を水性薬剤溶液の代わりに用いることができる。かくして、水中油中固体（ソリッド－イン－オイル－イン－ウォーター）方法を用いて、低～中等度の初期バーストの、大きい薬剤充填（１０％以上）を有するマイクロスフェアを作ることができる。

マイクロカプセル化に用いる固体の薬物製剤は有機溶媒中で安定でなければならず、マイクロスフェア（３０～１００μm）に比べて小さいサイズ（１～５μm）を有し、薬剤の高充填および低バーストを可能にしなければならない。タンパク質製剤の場合、小さい乾燥した固体を得る一つの方法はスプレードライングである。Mummenthaler等、Pharm.Res、１１巻（１）、１２～２０頁（１９９４）による最近の報告は、rhGH製剤のスプレドライング工程を記載する。rhGHは空気一液体界面等の表面相互作用により容易に変性するので、rhGHのスプレードライングはrhGH製剤中の界面活性剤と共に行わなければならない。しかし、上記したように、ある界面活性剤の存在は塩化メチレン中のrhGHの安定性に負の影響を及ぼす。異なる界面活性剤およびトレハロースを用いた（水性のrhGH製剤の安定化に最良であると上で認めている）スプレードライしたrhGH製剤を、塩化メチレンおよび酢酸エチル中での安定性につき試験した。

スプレードライしたrhGHを表ＶＩＩに掲げた各製剤から調製した。これらの製剤を５ml／分で、入口温度９０℃、エアノズル流量６００l／時間、乾燥空気速度３６，０００l／時間の条件でスプレーした。スプレードライしたrhGHをフィルターおよびスプレードライアーのサイクロンユニットから次に収集した。最終固体は通常直径約５μmであった。

スプレードライしたrhGH粉末を、酢酸エチルまたは塩化メチレンでの処理による安定性につき試験した。１０mgのrhGHに質量等量のスプレードライした粉末を、３ccガラス試験管中の２mlの有機溶媒に加えた。その懸濁液をミクロファインホモジナイゼーションチップを用いて３０秒間、１０，０００rpmで次にホモジナイズした。混合後、タンパク質を抽出するために２０μlの均一な懸濁液を９８０μlの５mM KPO_4（pH８）に加えた。抽出されたタンパク質の濃度を２７８nmにおける吸収により測定し、そのサンプルをサイズ排除クロマトグラフィーにより分析した。表ＶＩＩに示すように、界面活性剤を含まない製剤は、塩化メチレンで処理した場合、最大程度の凝集物を有した。この凝集物はおそらく、rhGHのスプレードライングについて以前に認められた乾燥工程中のrhGHの表面変性の結果であった。製剤にトゥイーン２０またはＰＥＧ（分子量３３５０）を加えることにより、塩化メチレンで処理したサンプルについての凝集物の量は減少したが、全体の回収収量は低く、モノマー含量は９０％よりずっと低かった。対照的に、界面活性剤を含む同じスプレードライしたrhGH製剤を酢酸エチルで処理すると、凝集物の量は無視でき、モノマー性rhGHの完全な回収が達成された。それ故、トレハロースおよびトゥイーン２０またはＰＥＧ（分子量３３５０）よりなるスプレードライしたrhGH製剤は、酢酸エチル中では安定であったが、塩化メチレン中での変性からタンパク質を保護しなかった。

表Ⅶ　塩化メチレンおよび酢酸エチル中のスプレードライしたrhGH固体製剤の安定性

製剤	% 回収[a] (全体)	% 回収[b] (可溶)	可溶性タンパク質 % 大凝集物	% ダイマー	% モノマー
塩化メチレン試験					
15 mg/mL rhGH 3.75 mg/mL トレハロース	--	--	12.3	8.8	75.4
10 mg/mL rhGH 2.5 mg/mL トレハロース 0.2% トゥイーン 20	56.5	65.2	1.9	13.3	78.1
10 mg/mL rhGH 2.5 mg/mL トレハロース 0.2% PEG (3350 MW)	50.7	56.7	3.9	12.3	77.7
酢酸エチル試験					
10 mg/mL rhGH 2.5 mg/mL トレハロース 0.2% トゥイーン 20	111.7	126.8	0.9	0.0	99.2
10 mg/mL rhGH 2.5 mg/mL トレハロース 0.2% PEG (3350 MW)	114.3	125.5	1.1	0.0	98.9
5.0 mg/mL rhGH 1.25 mg/mL トレハロース 0.2% トゥイーン 20	106.8	110.4	0.3	3.0	96.7

a. タンパク質の全回収は、有機溶媒中での処理後、緩衝液に抽出されたタンパク質の量を、抽出緩衝液に加えたタンパク質の計算量(０．０２ml×５mg／ml)で割ったものとして定義した。

b. 有機溶媒での処理後に緩衝液に抽出されたタンパク質についてのＳＥＣ－ＨＰＬＣ結果。可溶性タンパク質の回収％は、サンプルおよび対照標準の全ピーク面積からの濃度の比を１００倍したものとして定義した。対照および試料のrhGH濃度は２７８nmにおける吸収により測定した。

実施例Ⅴ

塩化メチレンおよび酢酸エチル中のスプレー凍結乾燥したrhGH製剤の安定性

高温におけるスプレードライングはタンパク質に不利な影響を有し得、しばしば中空球であるタンパク質粒子を作る（Mummenthaler等、Pharm.Res.、１１巻（１）、１２～２０頁（１９９４））。さらに、ミクロカプセル化に必要な小さい粒子（１～５μm）を集めるのが困難で、これらの粒子の全収量は通常非常に小さい（５０％未満）。高温スプレード

ライングの代替はスプレー凍結乾燥である。rhGH製剤のスプレー凍結乾燥は非常に小さい固体（１μm未満）に容易に破砕される微細粒子（２～３μm）を生じる。このタイプの固体の製剤はポリマーマトリックス中のマイクロカプセル化には望ましい。何故なら、それは均一に分散した固体タンパク質の高充填（多くの固体を３０～１００μmのマイクロスフェアに充填できる）を提供するからである（細いサスペンジョンのためバーストが減少する）。

rhGHのスプレー凍結乾燥を表VIIIに掲げた製剤を用いて行った。界面活性剤はスプレー工程の間rhGHを安定化させるために必要であったが、表面相互作用により容易に変性されない他のタンパク質は界面活性剤の使用を多分必要としないであろう。スプレー凍結乾燥したrhGHを、製剤を５ml／分でポンプで送り、高温スプレードライングで使用したエアノズルを６００l／時間で操作することにより調製した（Mummenthaler等、Pharm.Res.、１１巻（１）、１２～２０頁、１９９４）。溶液を液体窒素のオープンメタルトレイ中にスプレーした。スプレー後、トレイを－３０℃にセットした予冷した凍結乾燥器中に置いた。液体窒素を蒸発させ、タンパク質を次に凍結乾燥した（一次乾燥：－３０℃、１００ミリトール、５２時間；二次乾燥：５℃、１００ミリトール、１８時間）。最後の粉末を次に除き、使用の前にシールしたガラスバイアルに入れた。

スプレー凍結乾燥したrhGH粉末を、酢酸エチルおよび塩化メチレンを用いる処理による安定性につき次に試験した。１０mgのrhGHに質量等量のスプレー凍結乾燥した粉末を３ccガラス試験管中の２mlの有機溶媒に加えた。その懸濁液を次にミクロファインホモジナイゼーションチップを用いて３０秒間１０，０００rpmでホモジナイズした。混合後、２０μlの均一な懸濁液を９８０μlの５mMKPO_4（pH８）に加え、タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質濃度を２７８nmにおける吸収により測定し、そのサンプルをサイズ排除クロマトグラフィーにより分析した。表VIIIに示すように、ＰＥＧを含むスプレー凍結乾燥した製剤は、水性製剤を用いて上に認められたトゥイーン２０を含む製剤より、塩化メチレン中でより安定であった。しかし両方の製剤はモノマー性rhGHの高回収を与えなかった。これらの同じ製剤を酢酸エチルで処理した場合、モノマー性タンパク質の完全な回収が両製剤について達成された。製剤中のトレハロースは有機溶媒変性（酢酸エチル）に対し安定化を提供し、一方界面活性剤はスプレー凍結乾燥中の表面変性に対しタンパク質を安定化させた。したがってトレハロースと界面活性剤の双方を含むスプレー凍結乾燥した製剤は酢酸エチルからrhGHの完全な回収を提供する。

表Ⅷ　塩化メチレンおよび酢酸エチル中でスプレー凍結乾燥した
rhＧＨ固体製剤の安定性

製剤	%[a] 回収（全体）	%[b] 回収（可溶）	可溶性タンパク質 % 大凝集物	% ダイマー	% モノマー
塩化メチレン試験					
5 mg/mL rhＧＨ 1.25 mg/mL ﾄﾚﾊﾛｰｽ 0.2% ﾄｳｨｰﾝ 20	37.2	34.0	6.2	8.3	85.5
5 mg/mL rhＧＨ 1.25 mg/mL ﾄﾚﾊﾛｰｽ 0.2% PEG (3350 MW)	68.8	66.8	2.3	15.8	78.8
酢酸エチル試験					
5 mg/mL rhＧＨ 1.25 mg/mL ﾄﾚﾊﾛｰｽ 0.2% ﾄｳｨｰﾝ 20	94.6	117.7	0.5	0.9	98.7
5 mg/mL rhＧＨ 1.25 mg/mL ﾄﾚﾊﾛｰｽ 0.2% PEG (3350 MW)	97.7	104.7	0.6	0.0	99.4

a. タンパク質の全回収は有機溶媒中における処理の後に緩衝液に抽出されたタンパク質の量を、抽出緩衝液に加えたタンパク質の計算量（０．０２ml×５mg／ml）で割ったものとして定義した。

b. 有機溶媒による処理の後に緩衝液に抽出されたタンパク質についてのＳＥＣ－ＨＰＬＣ結果。可溶性タンパク質の回収％は、試料および対照標準の全ピーク面積からの濃度の比を１００倍したものとして定義した。対照および試料のrhＧＨ濃度は、２７８nmにおける吸収より測定した。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7] FI
Ａ６１Ｋ 47/34 Ａ６１Ｋ 37/66 Ｈ

(72)発明者 ジョーンズ，アンドリュー・ジェイ・エス
アメリカ合衆国カリフォルニア９４４０２、サン・マテオ、タリータウン・ストリート１４１６番

審査官 川口 裕美子

(56)参考文献 特開昭６３－００２９３０（ＪＰ，Ａ）
特表昭６３－５０２５９２（ＪＰ，Ａ）
特開昭６３－２３３９２６（ＪＰ，Ａ）
特開平０６－１４５０４６（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
A61K 38/00 - 38/58
A61K 47/26,34
A61K 9/50