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

特許第5596064号
(P5596064)

(45)発行日　平成26年9月24日(2014.9.24)　(24)登録日　平成26年8月15日(2014.8.15)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 38/43	(2006.01)	A61K	37/465
A61K 47/10	(2006.01)	A61K	47/10
A61K 47/18	(2006.01)	A61K	47/18
A61K 47/26	(2006.01)	A61K	47/26
A61K 47/02	(2006.01)	A61K	47/02

請求項の数 2　(全 24 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-9767(P2012-9767)
(22)出願日　平成24年1月20日(2012.1.20)
(62)分割の表示　特願2008-120035(P2008-120035)の分割
原出願日　平成12年2月22日(2000.2.22)
(65)公開番号　特開2012-72198(P2012-72198A)
(43)公開日　平成24年4月12日(2012.4.12)
審査請求日　平成24年1月20日(2012.1.20)
(31)優先権主張番号　09/255,279
(32)優先日　平成11年2月22日(1999.2.22)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　09/452,752
(32)優先日　平成11年12月1日(1999.12.1)
(33)優先権主張国　米国(US)

前置審査

(73)特許権者　591013229
バクスター・インターナショナル・インコーポレイテッド
ＢＡＸＴＥＲ　ＩＮＴＥＲＮＡＴＩＯＮＡＬ　ＩＮＣＯＲＰＯＲＡＴＥＤ
アメリカ合衆国　６００１５　イリノイ州、ディアフィールド、ワン・バクスター・パークウェイ　（番地なし）
(73)特許権者　501315876
ユニバーシティ　オブ　コネチカット
アメリカ合衆国　コネチカット　０６０３０－６２０７　ファーミントン　ファーミントン・アベニュー　２６３
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アルブミンを含有していない新規の第ＶＩＩＩ因子処方物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
アルブミンを添加することなく処方された、液体の第ＶＩＩＩ因子組成物であって、該組成物は、第ＶＩＩＩ因子に加えて、以下の処方賦形剤：
マンニトール、グリシンおよびアラニンからなる群より選択される、６％～９％（ｗ／ｖ）の充填剤；
スクロース、トレハロース、ラフィノースおよびアルギニンからなる群より選択される、２％～３％（ｗ／ｖ）の安定化剤；
３ｍＭ～４ｍＭの塩化カルシウム；
１５０ｍＭ～２５０ｍＭの塩化ナトリウム；
１０ｍＭ～５０ｍＭのヒスチジン；
トリス－（ヒドロキシメチル）－アミノメタン、１，２－ビス－［トリス－（ヒドロキシ－メチル）メチルアミノ］－プロパン、ピペラジン－Ｎ，Ｎ’－ビス－（２－エタンスルホン酸）、３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸、Ｎ－２－ヒドロキシエチル－ピペラジン－Ｎ’－２－エタンスルホン酸、２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸およびＮ－２－アセトアミド－２－アミノエタンスルホン酸からなる群より選択される緩衝剤；
１．０ｍｇ／ｍＬ超のグルタチオン；ならびに
０．０３％（ｗ／ｖ）のポリソルベート８０
を含む、組成物。

【請求項２】
アルブミンを添加することなく処方された、液体の第ＶＩＩＩ因子組成物であって、該組成物は、第ＶＩＩＩ因子に加えて、以下の処方賦形剤：
８％（ｗ／ｖ）のマンニトール；
２％（ｗ／ｖ）のトレハロース；
４ｍＭの塩化カルシウム；
２２５ｍＭの塩化ナトリウム；
２５ｍＭのヒスチジン；
０．０３％（ｗ／ｖ）のポリソルベート８０；ならびに
１．０ｍｇ／ｍＬ超のグルタチオン；
を含み、該液体の第ＶＩＩＩ因子組成物のｐＨは、６と８との間である、組成物。

【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
（発明の背景）
第ＶＩＩＩ因子は、血液の凝固を導く反応のカスケードにおいて補因子として作用する、血漿中に見出されるタンパク質である。血液中の第ＶＩＩＩ因子活性の量の欠乏は、主に男性が罹患する遺伝状態である、血友病Ａとして公知の凝固障害を生じる。血友病Ａは、ヒトの血漿に由来するかまたは組換えＤＮＡ技術を使用して製造された第ＶＩＩＩ因子の治療用調製物で現在処置されている。このような調製物は、放血のエピソードに応答して（要求があり次第治療）、または制御されていない放血を予防するために頻繁に一定の間隔で（予防）のいずれかで、投与される。
【０００２】
第ＶＩＩＩ因子は、治療用調製物中では比較的不安定であることが公知である。血漿中では、第ＶＩＩＩ因子は通常は、別の血漿タンパク質であるフォン・ビルブラント因子（ｖＷＦ）（これは、第ＶＩＩＩ因子に対して大過剰のモルで血漿中に存在し、そして成熟前の崩壊から第ＶＩＩＩ因子を防御すると考えられている）と複合体を形成する。別の循環している血漿タンパク質であるアルブミンもまた、インビボで第ＶＩＩＩ因子を安定化させることにおいて役割を果たし得る。従って、現在市場で売買されている第ＶＩＩＩ因子調製物は、主に、製造プロセスの間および保存の間、第ＶＩＩＩ因子を安定させるために、アルブミンおよび／またはｖＷＦの使用に頼っている。
【０００３】
現在市場で売買されている第ＶＩＩＩ因子調製物中で使用されるアルブミンおよびｖＷＦは、ヒトの血漿に由来するが、しかし、このような材料の使用は、特定の欠点を有する。第ＶＩＩＩ因子と比較して大過剰のモルのアルブミンが、このような調製物中での第ＶＩＩＩ因子の安定性を増大させるために一般的に添加されているので、これらの調製物中の第ＶＩＩＩ因子タンパク質自体を特徴づけることは困難である。第ＶＩＩＩ因子に対するヒトに由来するアルブミンの添加もまた、組換えによって産生された第ＶＩＩＩ因子調製物に関して不利であると認められている。これは、組換えによって誘導された第ＶＩＩＩ因子調製物が、このような添加されたアルブミンの非存在下では、他にヒトに由来するタンパク質を含まず、そしてウイルスを伝達する理論的な危険性が減少されるからである。
【０００４】
アルブミンまたはｖＷＦを伴わずに（または比較的低いレベルのこれらの賦形剤を用いて）第ＶＩＩＩ因子を処方するためのいくつかの試みが記載されている。例えば、Ｆｒｅｕｄｅｎｂｅｒｇの米国特許第５，５６５，４２７号（ＥＰ　５０８　１９４）（Ｂｅｈｒｉｎｇｗｅｒｋｅに譲渡）は、塩化ナトリウムおよびスクロースのような賦形剤に加えて、界面活性剤およびアミノ酸の特定の組合せ（詳細には、アルギニンおよびグリシン）を含む第ＶＩＩＩ因子調子物を記載している。界面活性剤であるポリソルベート２０また

はポリソルベート８０は、０．００１から０．５％（ｖ／ｖ）の間の量で存在すると記載され、一方、アルギニンおよびグリシンは、０．０１から１ｍｏｌ／ｌの間の量で存在する。スクロースは、０．１から１０％の間の量で存在すると記載されている。この特許の実施例２は、溶液（１）（０．７５％のスクロース、０．４Ｍのグリシン、および０．１５ＭのＮａＣｌ）、ならびに溶液（２）（０．０１Ｍのクエン酸ナトリウム、０．０８Ｍのグリシン、０．０１６Ｍのリジン、０．００２５Ｍの塩カルシウム、および０．４Ｍの塩化ナトリウム）は、１６時間を超えると溶液中では安定ではないが、一方、溶液（３）（１％のスクロース、０．１４Ｍのアルギニン、０．１Ｍの塩化ナトリウム）ならびに溶液（４）（１％のスクロース、０．４Ｍのグリシン、０．１４Ｍのアルギニン、０．１Ｍの塩化ナトリウム、および０．０５％のＴｗｅｅｎ８０）は安定性を示したことを主張する。

【０００５】

Ｎａｙｅｒの米国特許第５，７６３，４０１号（ＥＰ　８１８　２０４）（Ｂａｙｅｒに譲渡）もまた、アルブミンを含有しない治療用の第ＶＩＩＩ因子処方物を記載している。これは、１５～６０ｍＭのスクロース、５０ｍＭまでのＮａＣｌ、５ｍＭまでの塩化カルシウム、６５～４００ｍＭのグリシン、および５０ｍＭまでのヒスチジンを含有する。以下の特定の処方物が安定であることが同定された：（１）１５０ｍＭのＮａＣｌ、２．５ｍＭの塩化カルシウム、および１６５ｍＭのマンニトール；ならびに（２）１％のスクロース、３０ｍＭの塩化ナトリウム、２．５ｍＭの塩化カルシウム、２０ｍＭのヒスチジン、および２９０ｍＭのグリシン。より多い量の糖を含有する処方物（１０％のマルトース、５０ｍＭのＮａＣｌ、２．５ｍＭの塩化カルシウム、および５ｍＭのヒスチジン）が、処方物（２）と比較して凍結乾燥された状態で安定性が低いことが見出された。

【０００６】

Ｏｓｔｅｒｂｅｒｇの米国特許第５，７３３，８７３号（ＥＰ　６２７　９２４）（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　＆　Ｕｐｊｏｈｎに譲渡）は、０．０１～１ｍｇ／ｍｌの界面活性剤を含む処方物を開示している。この特許は、以下の範囲の賦形剤を含有する処方物を開示している：少なくとも０．０１ｍｇ／ｍｌ、好ましくは、０．０２～１．０ｍｇ／ｍｌの量のポリソルベート２０または８０；少なくとも０．１ＭのＮａＣｌ；少なくとも０．５ｍＭのカルシウム塩；および少なくとも１ｍＭのヒスチジン。より詳細には、以下の特異的な処方物が開示されている：（１）１４．７～５０～６０ｍＭのヒスチジン、０．３１～０．６ＭのＮａＣｌ、４ｍＭの塩化カルシウム、０．００１～０．０２～０．０２５％のポリソルベート８０、０．１％のＰＥＧ　４０００または１９．９ｍＭのスクロースを含むかまたは含まない；ならびに（２）２０ｍｇ／ｍｌのマンニトール、２．６７ｍｇ／ｍｌのヒスチジン、１８ｍｇ／ｍｌのＮａＣｌ、３．７ｍＭの塩化カルシウム、および０．２３ｍｇ／ｍｌのポリソルベート８０。

【０００７】

低いまたは高い濃度の塩化ナトリウムを使用する他の試みもまた、記載されている。Ｌｅｅの米国特許第４，８７７，６０８号（ＥＰ　３１５　９６８）（Ｒｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｅ　Ｒｏｒｅｒに譲渡）は、比較的低濃度の塩化ナトリウムを含有する処方物、言い換えれば、０．５ｍＭ～１５ｍＭのＮａＣｌ、５ｍＭの塩化カルシウム、０．２ｍＭ～５ｍＭのヒスチジン、０．０１～１０ｍＭのリジンヒドロクロライド、および１０％までの糖を含有する処方物を教示している。「糖」は、１０％までのマルトース、１０％までのスクロース、または５％までのマンニトールであり得る。

【０００８】

Ｌｅｅの米国特許第５，６０５，８８４号（ＥＰ　０　３１４　０９５）（Ｒｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｅ　Ｒｏｒｅｒに譲渡）は、比較的高濃度の塩化ナトリウムを含有する処方物の使用を教示している。これらの処方物は、０．３５Ｍ～１．２ＭのＮａＣｌ、１．５～４０ｍＭの塩化カルシウム、１ｍＭ～５０ｍＭのヒスチジン、および１０％までの「糖」（例えば、マンニトール、スクロース、またはマルトース）を含有する。０．４５ＭのＮａＣｌ、２．３ｍＭの塩化カルシウム、および１．４ｍＭのヒスチジンを含有する処

方物が例示されている。
【０００９】
Ｒｏｓｅｒの国際特許出願番号第ＷＯ９６／２２１０７号（Ｑｕａｄｒａｎｔ Ｈｏｌｄｉｎｇｓ Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｌｉｍｉｔｅｄに譲渡）は、糖トレハロースを含有する処方物を記載している。これらの処方物は、以下を含有する：（１）０．１ＭのＮａＣｌ、１５ｍＭの塩化カルシウム、１５ｍＭのヒスチジン、および１．２７Ｍ（４８％）のトレハロース；または（２）０．０１１％の塩化カルシウム、０．１２％のヒスチジン、０．００２％のＴｒｉｓ、０．００２％のＴｗｅｅｎ ８０、０．００４％のＰＥＧ ３３５０、７．５％のトレハロース、および０．１３％または１．０３％のいずれかのＮａＣｌ。
【００１０】
先行技術の他の治療用の第ＶＩＩＩ因子処方物は、一般的には、第ＶＩＩＩ因子を安定化させる目的のためにアルブミンおよび／またはｖＷＦを含み、従って、本発明には関係しない。例えば、Ｓｃｈｗｉｎｎの米国特許第５，３２８，６９４号（ＥＰ ５１１ ２３４）（Ｏｃｔａｐｈａｒｍａ ＡＧに譲渡）は、１００～６５０ｍＭのジサッカライドおよび１００ｍＭ～１．０Ｍのアミノ酸を含有する処方物を記載している。詳細には、以下の処方物が開示されている：（１）０．９Ｍのスクロース、０．２５Ｍのグリシン、０．２５Ｍのリジン、および３ｍＭの塩化カルシウム；ならびに（２）０．７Ｍのスクロース、０．５Ｍのグリシン、および５ｍＭの塩化カルシウム。
【００１１】
アルブミンまたはｖＷＦを用いないで第ＶＩＩＩ因子を処方するためのいくつかの試みが行われていているが、アルブミンまたは他のタンパク質の非存在下で安定である治療用の第ＶＩＩＩ因子処方物の必要性は依然として残されている。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００１２】
（発明の要旨）
本発明は、アルブミンの非存在下で安定である治療用の第ＶＩＩＩ因子組成物に関する。詳細には、本発明は、第ＶＩＩＩ因子に加えて以下を含有する第ＶＩＩＩ因子組成物を含む：マンニトール、グリシン、およびアラニンからなる群より選択される４％から１０％の充填剤；スクロース、トレハロース、ラフィノース、アルギニンからなる群より選択される１％から４％の安定化剤；１ｍＭから５ｍＭのカルシウム塩；１００ｍＭから３００ｍＭのＮａＣｌ；ならびに約６から８の間のｐＨを維持するための緩衝剤。この組成物はさらに、ポリソルベート２０、ポリソルベート８０、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ Ｆ６８、またはＢｒｉｊ ３５のような界面活性剤を含む。界面活性剤がポリソルベート８０である場合は、これは、０．１％未満の量で存在する。
【００１３】
本発明に従う第ＶＩＩＩ因子組成物の緩衝剤は、好ましくは、１０ｍＭから５０ｍＭまでの濃度で存在し、そして好ましくは、ヒスチジン、Ｔｒｉｓ、ＢＩＳ－Ｔｒｉｓ Ｐｒｏｐａｎｅ、ＰＩＰＥＳ、ＭＯＰＳ、ＨＥＰＥＳ、ＭＥＳ、およびＡＣＥＳからなる群より選択される。有利には、緩衝剤は、ヒスチジンまたはＴｒｉｓのいずれかである。本発明の第ＶＩＩＩ因子組成物は、さらに抗酸化剤を含有し得る。
【００１４】
本発明の第ＶＩＩＩ因子組成物は、充填剤および安定化剤の両方を含み得る。充填剤は、約６％から約８％まで、好ましくは、約８％の量で存在し得る。安定化剤は、好ましくは、約２％の量で存在する。塩化ナトリウムもまたこれらの組成物中に存在し、好ましくは、１５０から３５０ｍＭまでの量で、そしてより好ましくは、約２２５ｍＭの量で存在する。組成物のカルシウム塩はまた、好ましくは、塩化カルシウムであり、そして組成物自体は好ましくは、凍結乾燥された形態である。
【００１５】

別の実施形態においては、本発明は、第ＶＩＩＩ因子に加えて以下の賦形剤を含有する、アルブミンを添加せずに処方された第ＶＩＩＩ因子組成物を含有し得る：２％から６％のヒドロキシエチル澱粉；スクロース、トレハロース、ラフィノース、アルギニンからなる群より選択される１％から４％の安定化剤；１ｍＭから５ｍＭのカルシウム塩；１００ｍＭから３００ｍＭのＮａＣｌ；ならびに約６から８の間のｐＨを維持するための緩衝剤。好ましくは、このような組成物は、約４％のヒドロキシエチル澱粉を含み、そしてＮａＣｌは、２００ｍＭの量で存在する。安定化剤もまた、好ましくは、約２％の量で存在する。

【００１６】

さらなる実施形態においては、本発明は、以下を含有する、アルブミンを用いることなく処方された第ＶＩＩＩ因子組成物を含む：３００ｍＭから５００ｍＭのＮａＣｌ；スクロース、トレハロース、ラフィノース、およびアルギニンからなる群より選択される１％から４％の安定化剤；１ｍＭから５ｍＭのカルシウム塩；ならびに約６から８の間のｐＨを維持するための緩衝剤。好ましくは、ＮａＣｌは約４００ｍＭの濃度で存在する。

【００１７】

なお別の実施形態においては、本発明は、凍結乾燥装置を使用して容器中で水性の第ＶＩＩＩ因子組成物を凍結乾燥させるためのプロセスを包含する。ここでは、このプロセスは、最初の凍結工程を包含し、そして最初の凍結工程は、さらに以下の工程を包含する：（ａ）少なくとも約－４５℃に凍結乾燥装置のチャンバーの温度を低下させる工程；（ｂ）約－１５℃から－２５℃の間の温度にチャンバーの温度を上昇させる工程；および続いて（ｃ）少なくとも約－４５℃にチャンバーの温度を低下させる工程。このプロセスにおいては、チャンバーの温度は、好ましくは、１分あたり約０．５℃から約１．０℃の間の速度で低下させられるかまたは上昇させられる。工程（ａ）においては、温度は、好ましくは、約１時間維持され、そして約－５５℃まで低下させられる。工程（ｂ）においては、温度は、好ましくは、－１５℃および－２５℃で、１～３時間の間維持される。そしてより好ましくは、－２２℃で維持される。そして工程（ｃ）の温度は、好ましくは、約１時間の間維持される。このプロセスで使用される第ＶＩＩＩ因子組成物は、好ましくは、マンニトール、グリシン、およびアラニンからなる群より選択される４％から１０％の試薬を含み、そしてまた、好ましくは、スクロース、トレハロース、ラフィノース、およびアルギニンからなる群より選択される１％から４％の試薬を含有する。さらに、このプロセスにおいて使用される第ＶＩＩＩ因子組成物はまた、好ましくは、１００ｍＭから３００ｍＭの間のＮａＣｌを含有する。

・本発明はさらに、以下を提供し得る：

・（項目１）　第ＶＩＩＩ因子に加えて以下の処方賦形剤：

マンニトール、グリシン、およびアラニンからなる群より選択される４％から１０％の充填剤；

スクロース、トレハロース、ラフィノース、およびアルギニンからなる群より選択される１％から４％の安定化剤；

１ｍＭ～５ｍＭのカルシウム塩；

１００ｍＭ～３００ｍＭのＮａＣｌ；ならびに

約６～８のｐＨを維持するための緩衝剤；

を含有する、アルブミンを添加することなく処方された第ＶＩＩＩ因子組成物。

・（項目２）　界面活性剤をさらに含有する、項目１に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。

・（項目３）　上記界面活性剤が、ポリソルベート２０、ポリソルベート８０、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ６８、およびＢｒｉｊ３５からなる群より選択される、項目２に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。

・（項目４）　上記界面活性剤がポリソルベート８０であり、そしてここで、上記ポリソルベート８０が０．１％未満の量で存在する、項目３に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。

・（項目５）　上記界面活性剤が約０．０３％の量で存在する、項目１～４に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。

・（項目６）　上記緩衝剤が、Ｔｒｉｓ、ＢＩＳ－Ｔｒｉｓ　Ｐｒｏｐａｎｅ、ヒスチジン、ＰＩＰＥＳ、ＭＯＰＳ、ＨＥＰＥＳ、ＭＥＳ、およびＡＣＥＳからなる群より選択される、項目１～５に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目７）　上記緩衝剤がＴｒｉｓを含む、項目６に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目８）　上記Ｔｒｉｓが約２０ｍＭの量で存在する、項目７に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目９）　上記緩衝剤が約１０ｍＭと約５０ｍＭの間のヒスチジンを含む、項目６に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目１０）　上記ヒスチジンが約２５ｍＭの量で存在する、項目９に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目１１）　抗酸化剤をさらに含有する、項目１～１０に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目１２）　上記抗酸化剤がグルタチオンである、項目１１に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目１３）　上記グルタチオンが約０．０５ｍｇ／ｍｌ～約１．０ｍｇ／ｍｌの量で存在する、項目１２に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目１４）　上記充填剤が約８％の量で存在する、項目１～１３に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目１５）　上記充填剤がマンニトールである、項目１～１４に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目１６）　上記充填剤がグリシンである、項目１～１４に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目１７）　上記安定化剤が約２％の量で存在する、項目１～１６に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目１８）　上記安定化剤がスクロースである、項目１～１７に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目１９）　上記安定化剤がアルギニンである、項目１～１７に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目２０）　上記安定化剤がトレハロースである、項目１～１７に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目２１）　上記ＮａＣｌが約２００ｍＭ～約２５０ｍＭの量で存在する、項目１～２０に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目２２）　上記ＮａＣｌが約２２５ｍＭの量で存在する、項目２１に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目２３）　上記カルシウム塩が塩化カルシウムである、項目１～２２に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目２４）　上記組成物が凍結乾燥された形態である、項目１～２３に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目２５）　第ＶＩＩＩ因子に加えて以下の処方賦形剤：
　２％～６％のヒドロキシエチル澱粉；
　スクロース、トレハロース、ラフィノース、およびアルギニンからなる群より選択される１％～４％の安定化剤；
　１ｍＭ～５ｍＭのカルシウム塩；
　１００ｍＭ～３００ｍＭのＮａＣｌ；ならびに
　約６～８のｐＨを維持するための緩衝剤；
を含有する、アルブミンを添加することなく処方された第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目２６）　約４％のヒドロキシエチル澱粉を含有する、項目２５に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目２７）　約２００ｍＭのＮａＣｌを含有する、項目２５～２６に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。

・（項目２８）　上記安定化剤が約２％の量で存在する、項目２５～２７に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目２９）　上記安定化剤がスクロースである、項目２５～２８に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目３０）　上記安定化剤がアルギニンである、項目２５～２８に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目３１）　上記安定化剤がトレハロースである、項目２５～２８に記載の第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目３２）　第ＶＩＩＩ因子に加えて以下の処方賦形剤：
　３００ｍＭ～５００ｍＭのＮａＣｌ；
　スクロース、トレハロース、ラフィノース、およびアルギニンからなる群より選択される１％～４％の安定化剤；
　１ｍＭ～５ｍＭのカルシウム塩；ならびに
　約６～約８のｐＨを維持するための緩衝剤；
を含有する、アルブミンを添加することなく処方された第ＶＩＩＩ因子組成物。
・（項目３３）　上記ＮａＣｌが約４００ｍＭの量で存在する、項目３２に記載の組成物。
・（項目３４）　血友病の処置のための医薬品の調製のための、項目１～３３のいずれかに記載の第ＶＩＩＩ因子組成物の使用。
・（項目３５）　結晶化が可能な充填剤およびＮａＣｌを含有する水性の薬学的処方物を凍結乾燥させる、改善された方法であって、ここで上記方法が、以下の工程：
　（ａ）約－３５℃未満の温度で水性の上記薬学的処方物を凍結する工程；
　（ｂ）約－３０℃～約－１９℃で上記薬学的処方物をアニーリングする工程；
　（ｃ）約－５０℃未満に上記薬学的処方物の温度を下げる工程；
　（ｄ）約－３０℃～－３９℃で上記薬学的処方物をアニーリングする工程；次いで、
　（ｅ）上記薬学的処方物を凍結乾燥させる工程、
を包含する、改善された方法。

【発明を実施するための形態】

【００１８】

（発明の詳細な説明）

（定義）

本明細書中で使用される場合は、以下の用語およびそのバリエーションは、他に特に示されない限りは、以下のように定義されるはずである：

第ＶＩＩＩ因子：第ＶＩＩＩ因子分子は、天然に存在し、そして単一の遺伝子産物から生じるポリペプチドの不均質な生体内分布として、治療用調製物中に存在する（例えば、Ａｎｄｅｒｓｓｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８３，２９７９－２９８３、１９８６年５月を参照のこと）。用語「第ＶＩＩＩ因子」は、本明細書中で使用される場合は、血漿に由来するかまたは組換えＤＮＡ技術の使用を通じて産生されたかにはかかわらず、全てのこのようなポリペプチドをいう。第ＶＩＩＩ因子を含有する治療用調製物の商業的に入手可能な例として、ＨＥＭＯＦＩＬ　ＭおよびＲＥＣＯＭＢＩＮＡＴＥの登録商標のもとで販売されているもの（Ｂａｘｔｅｒ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓ，Ｕ．Ｓ．Ａ．から入手可能である）が挙げられる。他の現在開発されている調製物は、主に第ＶＩＩＩ因子分子の単一のサブ集団を含み、これは、分子のＢドメイン部分を欠失している。

【００１９】

国際単位、ＩＵ：国際単位、すなわちＩＵは、以下の１つのような標準的なアッセイによって測定された場合の、第ＶＩＩＩ因子の血液凝固活性（能力）の測定値の単位である：

一段階アッセイ。Ｌｅｅ、Ｍａｒｔｉｎ　Ｌら、Ａｎ　Ｅｆｆｅｃｔ　ｏｆ　Ｐｒｅｄｉｌｕｔｉｏｎ　ｏｎ　Ｐｏｔｅｎｃｙ　Ａｓｓａｙｓ　ｏｆ　Ｆａｃｔｏｒ　ＶＩＩＩ

Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅｓ，Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ Ｌｔｄ．）３０、５１１－５１９（１９８３）に記載されているような一段階アッセイが、当該分野で公知である。

【００２０】

色素形成アッセイ。Ｃｏａｔｅｓｔ Ｆａｃｔｏｒ ＶＩＩＩ（Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｘ ＡＢ，Ｍｏｌｎｄａｌ、Ｓｗｅｄｅｎから入手可能である）のような色素形成アッセイは、商業的に購入することができる。

【００２１】

アニーリング：用語アニーリングは、調製物の凍結－乾燥の前に、凍結乾燥を受ける薬学的調製物の凍結乾燥プロセスにおける工程を示すために使用される。ここでは、調製物の温度は、より低い温度からより高い温度に上昇させられ、次いで一定の時間後に再び冷却される。

【００２２】

充填剤：本出願の目的のためには、充填剤は、「塊」の構造を提供するか、またはそれが凍結乾燥された後に薬学的調製物の残った固体の塊を提供し、そしてそれを崩壊から防御するそのような化学的実体である。結晶化が可能な充填剤は、本明細書中で使用される場合には、塩化ナトリウム以外の、凍結乾燥の間に結晶化され得る充填剤を意味する。ＨＥＳは、結晶化が可能な充填剤のこの群には含まれない。

【００２３】

凍結－乾燥、凍結、凍結乾燥：「凍結－乾燥」は、それが明らかである状況において他に示されない限りは、その中で薬学的調製物の温度が、調製物を水に溶解させる（ｗａｔｅｒ ｏｕｔ）ために生じられる、凍結乾燥プロセスの一部を示すために使用される。凍結乾燥プロセスの「凍結」工程は、凍結乾燥の段階の前に行われるこれらの工程である。「凍結乾燥」は、他に特に示されない限りは、凍結工程および凍結－乾燥工程の両方を含む、凍結乾燥の全体のプロセスをいう。

【００２４】

他に特に示されない限りは、パーセンテージの用語は、質量／容量のパーセンテージを示し、そして温度は摂氏尺度である。

【００２５】

（処方物の成分）

本発明の第ＶＩＩＩ因子組成物は、充填剤、安定化剤、緩衝剤、塩化ナトリウム、カルシウム塩、および有利には他の賦形剤を含有する。これらの賦形剤は、凍結乾燥された調製物中での第ＶＩＩＩ因子の安定性を最大にするために選択されている。しかし、本発明の第ＶＩＩＩ因子組成物は、液体の状態でもまた安定性を示す。

【００２６】

本発明の処方物中で使用される充填剤（これは、凍結乾燥された生成物の結晶の部分を形成する（ＨＥＳの場合を除く））は、マンニトール、グリシン、アラニン、およびヒドロキシエチル澱粉（ＨＥＳ）からなる群より選択される。マンニトール、グリシン、またはアラニンは、４～１０％の量で、好ましくは、６～９％の量で、そしてより好ましくは、約８％の量で存在する。充填剤としてＨＥＳが使用される場合には、これは、２～６％の量で、好ましくは、３～５％の量で、そしてより好ましくは、約４％の量で存在する。

【００２７】

本発明の処方物中で使用される安定化剤は、スクロース、トレハロース、ラフィノース、およびアルギニンからなる群より選択される。これらの薬剤は、１～４％の間の量で、好ましくは、２～３％、より好ましくは、約２％の量で本発明の処方物中に存在する。ソルビトールおよびグリセロールは、可能な安定化剤として評価されたが、これらは、本発明の処方物中では好ましくない安定化剤であることが見出された。

【００２８】

塩化ナトリウムは、１００～３００ｍＭの量で、好ましくは、１５０～２５０ｍＭで、そして最も好ましくは、約２２５ｍＭの量で本発明の処方物中に含まれる。本発明の１つ

の実施形態においては、３００ｍＭから５００ｍＭのＮａＣｌの間、好ましくは、３５０から４５０ｍＭのＮａＣｌの間、そして最も好ましくは、約４００ｍＭのＮａＣｌの量で処方物中に含まれる場合には、塩化ナトリウム自体は、上記のいずれの充填剤も伴わずに使用され得る。

【００２９】

さらに、緩衝剤が、これらの処方物中に存在する。なぜなら、第ＶＩＩＩ因子分子が凍結乾燥の間のｐＨのシフトによって有害な影響を受け得ると考えられるからである。ｐＨは好ましくは、凍結乾燥の間は６から８の間の範囲、そしてより好ましくは、約７のｐＨに維持されるはずである。緩衝剤は、任意の薬学的に受容可能な化学的実体または、ヒスチジン、Ｔｒｉｓ、ＢＩＳ－Ｔｒｉｓ、Ｐｒｏｐａｎｅ、ＰＩＰＥＳ、ＭＯＰＳ、ＨＰＥＳ、ＭＥＳ、およびＡＣＥＳを含む緩衝剤として作用する能力を有する化学的実体の組合せであり得る。これらの緩衝剤の完全な化学的名称が、以下の表１に列挙される。代表的には、緩衝剤は、１０～５０ｍＭの濃度で含まれる。ヒスチジンが処方物に添加される場合は、２０ｍＭを超える濃度、そして好ましくは、約２５ｍＭが、単独で、またはＴｒｉｓのような他の緩衝剤と組合せて使用される。ヒスチジンは、以下に非常に詳細に記載されるように、本発明の組成物中での使用にとくに好ましい。

【００３０】

【表１】

表1-緩衝剤

Tris	ﾄﾘｽ-(ﾋﾄﾞﾛｷｼﾒﾁﾙ)-ｱﾐﾉﾒﾀﾝ
BIS-Tris-Propane	1,3-ﾋﾞｽ-[ﾄﾘｽ-(ﾋﾄﾞﾛｷｼｰﾒﾁﾙ)ﾒﾁﾙｱﾐﾉ]-ﾌﾟﾛﾊﾟﾝ
PIPES	ﾋﾟﾍﾟﾗｼﾞﾝ-N,N'-ﾋﾞｽ-(2-ｴﾀﾝｽﾙﾎﾝ酸)
MOPS	3-(N-ﾓﾙﾎﾘﾉ)ﾌﾟﾛﾊﾟﾝｽﾙﾎﾝ酸
HEPES	N-2-ﾋﾄﾞﾛｷｼｴﾁﾙ-ﾋﾟﾍﾟﾗｼﾞﾝ-N'-2-ｴﾀﾝｽﾙﾎﾝ酸
MES	2-(N-ﾓﾙﾎﾘﾉ)ｴﾀﾝｽﾙﾎﾝ酸
ACES	N-2-ｱｾﾄｱﾐﾄﾞ-2-ｱﾐﾉｴﾀﾝｽﾙﾎﾝ酸

第ＶＩＩＩ因子の活性を保存するためには、本発明の処方物はまた、カルシウムまたは第ＶＩＩＩ因子と相互作用することが可能な別のニ価のカチオンを含み、そしてその活性を、おそらく、第ＶＩＩＩ因子の重鎖および軽鎖の会合を維持することによって維持することが、重要である。１ｍＭから５ｍＭの間、より好ましくは、３～４ｍＭ、そして最も好ましくは、約４ｍＭのカルシウム塩が使用され得る。カルシウム塩は、好ましくは、塩化カルシウムであるが、カルシウムグルコネート、カルシウムグルビオネートまたはカルシウムグルセプテートのような他のカルシウム塩でもあり得る。

【００３１】

本発明の第ＶＩＩＩ因子組成物はまた、好ましくは、界面活性剤を、好ましくは、０．１％以下の量で、そしてより好ましくは、約０．０３％の量で含有する。界面活性剤は、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（ｐｌｕｒｏｎｉｃ）ポリオール、およびＢｒｉｊ　３５（ポリオキシエチレン２３ラウリルエーテル）からなる群より選択され得る。プルロニックポリオールのいくつかのグレード（ＢＡＳＦ　Ｗｙａｎｄｏｔｔｅ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎによって製造された、登録商標Ｐｌｕｒｏｎｉｃのもとで販売されている）が利用可能である。多様化した分子量（１，０００から１６

，０００以上まで）および物理化学的特性のこれらのポリオールが、界面活性剤として使用されている。分子量５，０００のＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ－３８および分子量９，０００のＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ－６８の両方が、（重量で）８０パーセントの親水性のポリオキシエチレン基、および２０パーセントの疎水性のポリオキシプロピレン基を含む。しかし、市販されているポリソルベートであるＴｗｅｅｎ－８０（特に、植物に由来するＴｗｅｅｎ－８０）が、本発明の処方物に好ましい。

【００３２】

本発明の第ＶＩＩＩ因子処方物はまた、好ましくは、抗酸化剤を含む。本発明の凍結乾燥させた処方物に対する抗酸化剤の添加は、これらの処方物の安定性を改善し、従って、それらの保存期間を延長させることが見出されている。使用される抗酸化剤は、薬学的調製物との使用に適合性でなければならず、そしてさらに、好ましくは、水可溶性である。処方物に対して抗酸化剤を添加する場合には、可能である場合には、抗酸化剤の自発的な酸化を回避するために、凍結乾燥の前のプロセスの後半に、このような抗酸化剤を添加することが好ましい。以下の表２は、適切な抗酸化剤を列挙する。これらは、ＣａｌｂｉｏｃｈｅｍおよびＳｉｇｍａのような会社を通じて市販されている。

【００３３】

【表２】

表2-抗酸化剤

N-ｱｾﾁﾙ-L-ｼｽﾃｲﾝ/ﾎﾓｼｽﾃｲﾝ
ｸﾞﾙﾀﾁｵﾝ
6-ﾋﾄﾞﾛｷｼ-2,5,7,8-ﾃﾄﾗﾒﾁﾙｸﾛﾏﾝ-2-ｶﾙﾎﾞﾝ酸(Trolox)
ﾘﾎﾟ酸
ﾒﾁｵﾆﾝ
ﾁｵ硫酸ﾅﾄﾘｳﾑ
白金
ｸﾞﾘｼﾝｰｸﾞﾘｼﾝｰﾋｽﾁｼﾞﾝ(ﾄﾘﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ)
ﾌﾞﾁﾙﾋﾄﾞﾛｷｼﾄﾙｴﾝ(BHT)

上記の抗酸化剤のうちでは、グルタチオンが好ましい。約０．０５ｍｇ／ｍｌから１．０ｍｇ／ｍｌ以上までの範囲の濃度が全て、第ＶＩＩＩ因子組成物の安定性を増強することが見出されており、そしてより高い濃度もまた有用である（任意の毒性の影響、または凍結乾燥させた生成物のガラス転移温度の低下のような有害な製造による影響の点まで）と考えられる。

【００３４】

特に、ヒスチジンおよびグルタチオンの組合せが、第ＶＩＩＩ因子組成物の安定性に対して共作用性の有利な影響を生じることが見出されている。ヒスチジン（緩衝剤として作用するが）もまた、金属キレート化剤として作用し得る。従って、第ＶＩＩＩ因子の不活化が金属によって誘導される酸化によって引き起こされる程度までは、ヒスチジンは、酸化金属イオンのような結合剤によって、第ＶＩＩＩ因子を安定化させるように作用し得る。これらの金属の結合によって、グルタチオン（または実際には存在する任意の他の抗酸化剤）は、それによって、さらに抗酸化保護を提供することができると考えられる。なぜなら、ヒスチジンによって結合された金属イオンの酸化効果が含まれているからである。

【００３５】

他のキレート化剤もまた、本発明の組成物中で使用され得る。このような試薬は、好ま

しくは、組成物中でカルシウム塩が使用される場合には、カルシウムよりも大きな親和性を有して銅および鉄のような金属と結合するはずである。１つのこのようなキレート化剤は、デフェロキサミンであり、これは、Ａｌ＋＋および鉄の除去を促進するキレート化剤である。Ｄｅｆｅｒｏｘａｍｉｎｅ　Ｍｅｓｙｌａｔｅ、Ｃ２５Ｈ４８Ｎ６Ｏ８*ＣＨ４Ｏ３Ｓは、Ｓｉｇｍａ（Ｓｉｇｍａ
Ｐｒｏｄ．Ｎｏ．Ｄ９５３３）から入手可能である。アルミニウムおよび鉄（ＩＩ）キレート化剤は、イオンを＋３の酸化状態のみならず＋２の酸化状態にもキレート化し（１：１のキレート複合体）、そしてマンガンイオンおよび他の金属にも結合し得る。デフェロキサミンは、０．２５ｍｇ／ｌの量で有利に使用され得る。

【００３６】

本発明の処方物中で使用される第ＶＩＩＩ因子は、高度に精製されたヒトの血漿に由来する第ＶＩＩＩ因子であり得るか、またはより好ましくは、組換えによって産生された第ＶＩＩＩ因子であり得る。組換え第ＶＩＩＩ因子は、第ＶＩＩＩ因子分子をコードするＤＮＡ配列を保有しているベクターでトランスフェクトされたチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞によって産生され得る。このようなトランスフェクトされたＣＨＯ細胞を作成するための方法は、とりわけ、Ｔｏｏｌｅ，Ｊｒらの米国特許第４，７５７，００６号に記載されているが、別の方法もまた、当該分野で公知である（例えば、またＴｏｏｌｅ，Ｊｒ．の米国特許第４，８６８，１１２号、およびＰＣＴ国際出願番号第ＷＯ－Ａ－９１／０９１２２号を参照のこと）。第ＶＩＩＩ因子を産生するようにこのようなＣＨＯ細胞を培養するために使用される方法もまた、当該分野で公知である。例えば、Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅの、「Ｉｍｐｒｏｖｅｄ　ｍｅｔｈｏｄ　ｆｏｒ　ｐｒｏｄｕｃｉｎｇ　Ｆａｃｔｏｒ　ＶＩＩＩ：Ｃ－ｔｙｐｅ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ」の表題の、欧州特許出願番０　３６２　２１８号。しかし、組換え第ＶＩＩＩ因子はまた、他の細胞株（例えば、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞）中で産生され得る。第ＶＩＩＩ因子分子自体は、組換えによって産生された場合には、全長の第ＶＩＩＩ因子またはその欠失誘導体（例えば、Ｂドメインを欠失している第ＶＩＩＩ因子分子）のいずれかであり得る。

【００３７】

本出願に記載される第ＶＩＩＩ因子組成物は凍結乾燥され得、そして示された濃度で再構成され得るが、当業者は、これらの調製物がまた、さらなる稀釈液の形態で再構成され得ることを理解する。例えば、凍結乾燥されそして／または通常は２ｍｌの溶液に再構成される本発明に従う調製物はまた、５ｍｌのようなのような稀釈液の容量で再構成され得る。これは、第ＶＩＩＩ因子調子物が患者にすぐに注射される場合に特に適切である。なぜなら、第ＶＩＩＩ因子が活性を損失する（これは第ＶＩＩＩ因子のより稀い溶液中でより迅速に生じ得る）可能性が低いからである。

【００３８】

（処方物および凍結乾燥の開発）

最大の安定性を達成するために、本発明の第ＶＩＩＩ因子組成物は、好ましくは、凍結乾燥される。凍結乾燥の間には、第ＶＩＩＩ因子は、水性の相から非結晶性の固相に転換され、これは、化学的および／または立体構造的な不安定性からタンパク質を保護する。凍結乾燥された調製物は、非結晶相を含むのみならず、凍結乾燥の間に結晶化する成分をもまた含む。これは、第ＶＩＩＩ因子組成物の迅速な凍結乾燥、およびより洗練された形態の塊（すなわち、その中でそれが凍結乾燥された容器の側部から最少の収縮を有する塊）の形成を可能にすると考えられる。本発明の処方物においては、安定化剤は、凍結乾燥させた生成物の非結晶相中に主に存在するように選択され、一方、充填剤（ＨＥＳを除く）は、凍結の間に結晶化するように選択されている。

【００３９】

第ＶＩＩＩ因子および安定化剤の両方が、好ましくは、凍結乾燥された塊の非結晶相中に分散される。安定化剤の量はまた、好ましくは、非結晶性の形態中の他の賦形剤と比較して多い。さらに、非結晶相の見かけのガラス転移温度（T_g'）は、好ましくは、凍結－乾燥の間には比較的高く、そして固体のガラス転移温度（Ｔｇ）は、好ましくはおそら

く、保存の間には高い。生成物中の塩化ナトリウムの結晶化は、望ましいと考えられる。なぜなら、非結晶性の塩化ナトリウムは、非結晶相のT_g'を低下させるからである。

【００４０】

特定の組成物の塊の崩壊を避けるために、最初の乾燥が、好ましくは、凍結濃縮物の見かけのガラス転移温度以下の温度の生成物に対して行われる。乾燥時間の増大もまた、T_g'の低下をオフセットするために必要とされ得る。凍結乾燥についてのさらなる情報は、Ｃａｒｐｅｎｔｅｒ，Ｊ．Ｆ．およびＣｈａｎｇ，Ｂ．Ｓ．，Ｌｙｏｐｈｉｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｕｔｉｃａｌｓ，Ｂｉｏｔｃｈｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，Ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ ａｎｄ Ｐｒｅｓｅｒｖａｔｉｏｎ，Ｋ．Ｅ．ＡｖｉｓおよびＶ．Ｌ．Ｗｕ編（Ｂｕｆｆａｌｏ Ｇｒｏｖｅ，Ｉ．Ｌ．：Ｉｎｔｅｒｐｈａｒｍ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）、１９９～２６４頁（１９９６）に見出され得る。

【実施例】

【００４１】

（実施例１）

第ＶＩＩＩ因子の濃度の影響、および第ＶＩＩＩ因子の回収の際の安定化剤の添加の影響を、いくつかの実験において調べた。これらの実験を、モデル充填剤としてマンニトールを、そしてモデル安定化剤としてスクロースを使用して行った。以下の表３に記載する３つのサンプル処方物を，これらの実験において使用した。これらの実験で使用した全ての処方物は、１０ｍＭのＴｒｉｓ、２００ｍＭのＮａＣｌ、８％のマンニトール、４ｍＭの$CaCl_2$、および０．０２％のＴｗｅｅｎ－８０を含み、そしてｐＨ７．０で行われた。

【００４２】

【表３】

表3

ｻﾝﾌﾟﾙI.D.	最初の第VIII因子(IU/ml)	ｽｸﾛｰｽ%
IA	600	-
IB	60	-
IC	60	2

これらのサンプルを、見かけのガラス転移温度（T_g'）未満の温度で生成物を維持するために、以下の表４に示す凍結－乾燥のサイクルを使用して凍結乾燥させた。ディファレンシャルスキャニング熱量測定（ＤＳＣ）実験は、マンニトール処方物中での約－４０℃での転移の存在を示した。この値未満の温度で生成物を維持するために、棚の温度を、最初の乾燥の間は－３２℃に設定した。これらの条件下での最初の乾燥を、約８０時間の全サイクル時間を用いて、約５５時間行った。

【００４３】

【表４】

表4

凍結/処理方法	詳細
I (凍結)	+5℃に冷却する; 1℃/分で-5℃まで冷却、 20分間維持する; -20±5℃まで1℃/分で冷却、1時間(3時間まで)維持する; 0.5℃/分で-45℃まで冷却、1時間維持する。
II	方法Iにより冷却 -35℃で48時間維持する。
III	方法Iにより冷却 -35℃で48時間維持する; -20℃で48時間維持する。
IV (凍結-乾燥)	約55時間(10時間まで)の最初の乾燥の間は、棚は-32℃; 生成物は、最初の乾燥の間は<-40℃; 0.2℃/分で、-32℃から+40℃までの勾配;3時間の2回目の乾燥の間は棚は+40℃。

一段階の凝固アッセイによって決定したこれらのサンプルの第ＶＩＩＩ因子活性を、－４５℃に保ったコントロールと比較した。アッセイの結果を、以下の表５に示す。

【００４４】

【表５】

表5

処理方法	それぞれの工程の間での第VIII因子の活性の損失%		
	処方物IA (600IU/ml)	処方物IB (60IU/ml)	処方物IC (60IU/ml、2%スクロース)
I	6.7	37.5	41.7
II	2.0	9.3	3.9
III	7.3	11.6	5.0
IV (凍結乾燥)	20.0	24.2	18.3

これらの結果は、タンパク質の濃度が、凍結の間の第ＶＩＩＩ因子の回収に対して影響を有することを示す。６０ＩＵ／ｍｌを含有している処方物は、凍結工程の間に最初の第ＶＩＩＩ因子活性の約３７～４２％を欠失し、一方、第ＶＩＩＩ因子活性の６．７％が、６００ＩＵ／ｍｌを含有している処方物については失われた。これらの結果は、より高いタンパク質濃度が、凍結の間の防御効果を有することを示す。スクロースは、中間の温度の維持の間、ならびに凍結－乾燥の間に第ＶＩＩＩ因子に対していくらかの保護を提供したが、これは、最初の凍結工程の間にタンパク質を保護することはできなかった。

【００４５】

（実施例２）

実施例１に概説される凍結乾燥プロセスの開発の後、このプロセスのさらなる最適化を行った。より高いガラス転移温度を有する（そして、理論的には、より良好の第ＶＩＩＩ因子の安定性を有する）凍結乾燥した組成物を、以下によって産生することができる：（１）最初に－４５℃以下に凍結温度を低下させる（例えば、約－５０℃または－５５℃に低下させる）；（２）－２０℃または－２２℃（±５℃）に温度を上昇させる；次いで、（３）再び－４５℃以下に温度を低下させる。温度を、可能である場合には、１分間に約０．５℃から約１．０℃の間の速度で、低下または上昇させる。一旦、所望される温度に到達すると、組成物を１から３時間の間その温度で維持する。この改良された凍結サイクルを、以下の表６に示す。

【００４６】

【表６】

表６

凍結方法	詳細
I	＋５℃に冷却する； ０．５～１℃／分で－５℃に冷却し、２０分間維持する； ０．５～１℃／分で－５５℃と－４５℃との間に冷却し、約１時間維持する； ０．５～１℃／分で－２２℃（±５℃）に温め、１～３時間維持する； ０．５～１℃／分で－４５℃に冷却し、約１時間維持する。

他に特に示されない限りは、この実施例および他の実施例で言及する温度は、凍結乾燥装置の棚の温度をいい、そして生成物自体の温度をいうわけではない。改良された凍結サイクルに続いて、凍結乾燥プロセスの残りを、上記の実施例１に概説されるように、またはそうでなければ本明細書中にさらに記載されるように、または当業者によって決定されるように、行うことができる。

【００４７】

この改良された凍結乾燥プロセスが、充填剤としてグリシンを含有する処方物、ならびにマンニトールを使用する処方物について有用であることを見出した。これはさらに、本発明の他の充填剤を使用する処方物に対して十分な適用可能性を有すると考えられる。

【００４８】

（実施例３）

受容可能な塊の出現およびガラス転移温度を有する凍結乾燥させた生成物を産生するために、塩化ナトリウムを含有している凍結乾燥させた薬学的調製物の充填剤（例えば、グリシンまたはマンニトール）が、結晶化のために必要とされ得ると考えられる。従って、結晶化が可能な充填剤についての以下の改良した凍結乾燥プロセスを開発した。

【００４９】

【表７】

表７ａ－凍結工程

処理工程	温度	工程時間
最初の凍結	－４０℃以下	１時間
最初のアニーリング	－２３℃と－２７℃との間	３時間
２回目の凍結	－５５℃	１時間
２回目のアニーリング	－３６℃	４時間
３回目の凍結	－５０℃	１時間

表７ｂ－凍結－乾燥工程

処理工程	温度	工程時間
最初の乾燥	－３５℃	１００時間まで
２回目の乾燥：第１工程	４０℃	３時間
２回目の乾燥：第２工程	４５℃	３時間
２回目の乾燥：第３工程	５０℃	３時間

凍結工程においては、温度の変更は、約０．５℃／分と約１℃／分との間の速度で行った。より長い持続時間の工程もまた有効であると考えられる。

【００５０】

最初の凍結工程の前に、温度を、全てのバイアルをほぼ同じ温度にする目的のために、約１時間、約２℃と約８℃との間にした。この後、凍結乾燥装置を－５℃に冷却した。最初の凍結工程は、－３０℃未満、好ましくは、－３５℃未満、そしてより好ましくは、約－４０℃の温度で行うべきである；この後、最初のアニーリング工程を、－３０℃と－１９℃との間、より好ましくは、約－２５℃と約－２８℃との間（グリシンが充填剤である場合）、または－２１℃と－２４℃との間（マンニトールが充填剤である場合）のいずれかで行うべきである。－２３℃と－２６℃との間の温度が最も好ましい。この温度では、結晶化が可能な充填剤が、少なくとも一部結晶化すると考えられる。しかし、－２７℃付近の低い範囲は、マンニトールおよびアルギニンを含有している処方物については推奨されない。この工程を、好ましくは、約３時間行う。

【００５１】

最初のアニーリング工程の後、温度を、好ましくは、約－５０℃未満に、そしてより好ましくは、－５５℃未満に、約１時間低下させる。調製物中の塩化ナトリウムがこの時点で凝集すると考えられる。

【００５２】

第２のアニーリング工程の間に、薬学的調製物の温度を、約－３０℃と約－３９℃との間、そして好ましくは、マンニトールを含有している組成物については約－３３℃、そしてグリシンを含有している組成物については－３６℃に、上昇させる。ＮａＣｌの結晶の成長が少なくとも一部、この時点で生じると考えられる。この工程を、好ましくは約４時間行う。この後、凍結乾燥装置の温度を約－５０℃に、好ましくは、調製物の温度を低下

させるために約１時間、低下させる。

【００５３】

この後の凍結－乾燥工程においては、温度の変更を、約０．５℃／分と約１℃／分との間の速度で行った。約６５ｍＴｏｒｒに凍結乾燥装置の圧力を低下させた後、最初の乾燥のために、温度を約－３２℃と約－３５℃との間に上昇させる。調製物中の氷の結晶が、この温度で昇華する。この工程を、約１００時間まで、または氷のほとんどが調製物から昇華するまで行う。ほとんどの氷が昇華した点は、例えば、露点センサーを使用して決定することができる。露天決定装置は、読み取り値が下がるときに氷の昇華の終わりを示す（湾曲点）。

【００５４】

最初の乾燥の後、調製物からさらに水を除くための２回目の乾燥を開始するために、温度を＋４０℃に、好ましくは、０．２℃／分の速度で上昇させる。この温度を、好ましくは、約３時間維持する。２回目および３回目の二次的な乾燥工程が、１回目の工程に続く。ここでは、２％（ｗ／ｗ）未満に凍結乾燥させた塊中の水分を減少させるために、温度を約３時間の間＋４５℃に上昇させ、次いで約＋５０℃にさらに３時間以上上昇させる。

【００５５】

（実施例４）

さらなる実験を、充填剤としてグリシンまたはマンニトールを含有している凍結乾燥させた第ＶＩＩＩ因子組成物に対するヒスチジンの影響を詳細に試験するために行った。不可逆的な熱の流れ（Ｍａｄｕｌａｔｅｄ　ＤＳＣ，ｍＤＳＣ）を、冷却の間のこれらの充填剤の結晶化を検出するために使用した。結晶化の温度および結晶化の全熱量の両方を、結晶化発熱線を使用して決定した。暖化の間のＮａＣｌ共晶融解吸熱の出現を、ＮａＣｌの結晶化を検出するために使用した。ｍＤＳＣ中で、結晶化の程度を、全熱流シグナルを使用することによって、純粋なＮａＣｌ溶液の融解のエンタルピーに対する、処方物の融解のエンタルピーの比として決定した。さらに、Ｘ線回折分析を、凍結乾燥させた処方物中での結晶化の程度を決定するために行った。

【００５６】

２０ｍＭ未満のヒスチジン濃度は、グリシンの結晶化に対して有意な効果を有さなかったが、５０ｍＭのヒスチジンは、グリシンの結晶化の程度を減少させた。十分に規定されたＮａＣｌの結晶化の発熱線は、グリシンを含有している処方物の冷却の間には観察しなかった。しかし、加熱の間の共晶融解吸熱は、ＮａＣｌが、－５０℃未満への冷却、ならびに－３０℃、－３５℃、および－４０℃でのアニーリングの後で結晶化した（＞５０％）ことを示した。グリシンを含有している処方物中に５０ｍＭのヒスチジンを含むことによって、ＮａＣｌの結晶化は遅れた。結果として、アニーリング時間は、同等の結晶度を達成するためには、このような処方物については３倍に増大した。

【００５７】

しかし、グリシンを含有している処方物中でのＮａＣｌの結晶化に対する２０ｍＭのヒスチジンの影響は最少であった。凍結－乾燥実験においては、凍結乾燥させた塊の崩壊を、５０ｍＭのヒスチジンを含有しているグリシンを含有している処方物中で可視的に観察した。Ｘ線粉末回折データは、ヒスチジンを含有しているサンプル中のＮａＣｌの結晶度における減少を示した。マンニトールを含有している処方物中では、代表的には、８３％～９０％の塩化ナトリウムが、アニーリングを必要とすることなく、－４０℃と－５０℃との間での冷却の間に結晶化した。処方物に対して２０ｍＭのヒスチジンを含有することによって、冷却、アニーリングの間のＮａＣｌの結晶化を抑制した、これによって、ＮａＣｌの約４０％の結晶化を生じた。

【００５８】

従って、結晶化が可能な充填剤（例えば、グリシンまたはマンニトール）およびＮａＣｌを含有している処方物中では、ヒスチジンを含むことは、ＮａＣｌの結晶化の程度を減少させ得る。このことは、いくつかの場合においては、凍結乾燥の間に形成される塊の崩壊を導き得るが、このような処方物中での比較的低濃度のヒスチジンの使用はこの効果を

緩和し得る。それにもかかわらず、受容可能な塊が、３５ｍＭおよび５０ｍＭのヒスチジンの濃度で形成されている。ＨＥＰＥＳの使用がヒスチジンの同様の量よりも大きな程度にＴｇ’を低下させることが観察されているように、ヒスチジンはまた、マンニトールに基づく処方物、およびグリシンに基づく処方物中で、緩衝液としてＨＥＰＥＳを好み得る。

【００５９】

（実施例５）

多数の可能性のある第ＶＩＩＩ因子処方物（７個の候補の安定化剤および５個の充填剤を含む）の物理的な特徴を、別の実験において評価した。充填剤および安定化剤に加えて、以下の表８に列挙する全ての処方物（処方物１１を除く）は、１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、２００ｍＭのＮａＣｌ、０．０２％のＴｗｅｅｎ－８０、４ｍＭの$CaCl_2$を含有し、そしてｐＨ７．０であった。処方物１１は、１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、０．０２％のＴｗｅｅｎ－８０、および４ｍＭの$CaCl_2$を含有し、そしてこれもまた、ｐＨ７．０であった。全てのｐＨ測定を、室温で行った。

【００６０】

【表８】

表８

サンプル Ｉ．Ｄ.	増量剤	タンパク質安定剤
1	８％　マンニトール	２％　スクロース
2	８％　マンニトール	２％　トレハロース
3	８％　マンニトール	２％　ラフィノース
4	８％　マンニトール	２％　アルギニン
5	８％　マンニトール	２％　リジン
6	８％　マンニトール	２％　ソルビトール
7	８％　マンニトール	２％　グリセロール
8	４％　ヒドロキシエチルデンプン	２％　スクロース
9	８％　グリシン	２％　スクロース
１０	８％　グリシン	２％　トレハロース
１１	４００ｍＭ　ＮａＣｌ	２％　スクロース
１２	８％　アラニン	２％　スクロース

凍結－乾燥顕微鏡による崩壊温度の測定値、およびＤＳＣによる熱転移測定値を、凍結－乾燥の性状を推定するために使用した。ＤＳＣ、Ｘ線粉末回折、および偏光顕微鏡もまた、凍結乾燥させたサンプルの結晶度を決定するために使用した。再構成時間およびサンプルの出現もまた、評価した。これらの測定の全ての結果を以下の表９にまとめる。

【００６１】

【表９】

表9

サンプル I．D.	T_{pc} (℃)	T_c (℃)	T_g (℃)	再構成 (秒)	水分量 (%)	外見
1	−14	−10	54	64	n／c	エレガント
2	−20	−15	53	62	1．4	上部が部分的に塊状
3	−15	−10	54	77	1．7	エレガント
4	−	−	−	−	−	部分的に塊
5	−	−	−	−	−	塊状
6	n／c	n／c	＜10℃*	63	0．6	エレガント
7	−	−	＜10℃*	−	−	エレガント
8	−	−	86	49	0．7	エレガントであるが側部から縮む
9	−	−	54	22	0．8	エレガント
10	−	−	63	18	−	エレガント
11	−	−	66	11	0．4	エレガント（底に層状）
12	−	−	−	57	0．5	エレガント

*ソルビトールおよびグリセロールは、＜10℃でガラス転移を有する。ＤＳＣスキャンの範囲は、この範囲の温度を含まない。

n／c＝明らかではない

T_{pc}＝凍結－乾燥顕微鏡中で部分的に塊が生じる温度

T_c ＝凍結－乾燥顕微鏡中で全体の塊が生じる温度

T_g ＝ガラス転移温度

マンニトール：リジンを除いて、全ての処方物が、十分な物理的な出現を有することを示した。リジンは、マンニトールおよびグリシンの両方の結晶化を妨害した。これは、ガラス転移温度の低下、および凍結乾燥した塊の崩壊を生じた。

【００６２】

（実施例６）

上記の表８に記載する第ＶＩＩＩ因子組成物を、それらの安定性について評価するために、時間の長さを変化させて、－７０℃、２５℃、４０℃、および５０℃での保存中に配置した。第ＶＩＩＩ因子の活性レベルを、２週間後、１ヶ月後、２ヶ月後、および３ヶ月後に評価し、そして結果を以下の表１０にまとめる。サンプルのうちの２つ（１つは、充填剤としてマンニトールを使用し、そして安定化剤としてソルビトールを使用する、そして他方は、充填剤としてマンニトールを使用し、そして安定化剤としてグリセロールを使用する）は、低い安定性を示した。残りの処方物は全て、第ＶＩＩＩ因子を安定化させる能力を示した。

【００６３】

【表１０】

表 10

処方物の詳細	温度(℃)	示した日での最初の%				
		0	0.5	1	2	3
グリシン：スクロース	-70	100.00	97.43	101.71	99.89	97.97
	25	100.00				85.44
	40	100.00		79.87	71.52	63.06
	50	100.00	76.34	67.99	52.14	47.64
グリシン：トレハロース	-70	100.00	89.22	96.00	95.90	94.64
	25	100.00				83.17
	40	100.00		79.93	72.42	68.03
	50	100.00	80.97	64.28	57.60	50.92
マンニトール：トレハロース	-70	100.00	91.32	97.72	96.10	98.26
	25	100.00				85.79
	40	100.00		82.54	70.72	59.44
	50	100.00	66.16	65.51	48.81	52.06
マンニトール：スクロース	-70	100.00	100.45	100.56	105.47	99.22
	25	100.00				87.04
	40	100.00		85.59	80.78	55.42
	50	100.00	81.68	75.53	57.88	43.46

[表10]の続き

マンニトール:アルギニン	-70	100.00	102.26	105.53	103.72	105.08
	25	100.00				95.15
	40	100.00		91.53	80.93	69.19
	50	100.00	82.28	68.06	56.32	45.94
マンニトール:ラフィノース	-70	100.00	93.88	98.41	100.68	103.62
	25	100.00				83.13
	40	100.00		81.09	73.61	67.16
	50	100.00	71.69	68.52	54.25	47.11
マンニトール:グリセロール	-70					
	25					
	40					
	50					
マンニトール:ソルビトール	-70	100.00	104.06			
	25	100.00				
	40	100.00				
	50	100.00	32.73			
HES:スクロース	-70	100.00	102.74	103.03	100.90	
	25	100.00				
	40	100.00		76.89	77.47	
	50	100.00	71.47	67.40	30.02	
NaCl: スクロース	-70	100.00	88.54	88.44	95.58	
	25	100.00				
	40	100.00		71.56	58.30	
	50	100.00	52.71	37.90	30.34	
アラニン:スクロース	-70	100.00	109.78	109.67	108.96	
	25	100.00				
	40	100.00		92.99	73.03	
	50	100.00	83.25	74.91	57.65	
グリシン:ラフィノース	-70	100.00	111.57	114.51	105.25	
	25	100.00				
	40	100.00		89.20	82.10	
	50	100.00	93.21	72.22	53.24	

（実施例７）

実施例５および６に記載する実験の間の得た情報に基づいて、以下の表１１に示す賦形剤を有する候補の処方物をさらに開発することを決定した。

【００６４】

【表１１】

表 11

賦形剤	濃度
マンニトールまたはグリシン	6-9%
アルギニンまたはトレハロース	1-3%
tween 80	0.005-0.04%
NaCl	200-250 mM
CaCl2	3-5 mM
TRIS	20-30 mM
ヒスチジン塩HEPES	10-50 mM
グルタチオン	0.15-0.25 mg/ml

これらのパラメータに基づいて、以下の特異的処方物を開発した。

【００６５】

【表１２】

表 12

処方物 #1	処方物 #2	処方物 #3
10mM HEPES 20mM Tris 225mM NaCl 0.03% (v/v) Tween-80 8% (w/v) マンニトール 2% (w/v) トレハロース 0.2 mg/ml 還元されたグルタチオン 4 mM $CaCl_2$	10mM HEPES 20mM Tris 225mM NaCl 0.03% (v/v) Tween-80 8% (w/v) グリシン 2% (w/v) トレハロース 0.2 mg/ml 還元されたグルタチオン 4 mM $CaCl_2$	10mM HEPES 20mM Tris 225mM NaCl 0.03% (v/v) Tween-80 8% (w/v) マンニトール 2% (w/v) アルギニン 0.2 mg/ml 還元されたグルタチオン 4 mM $CaCl_2$

処方物 #4	処方物 #5
25mM ヒスチジン 20mM Tris 225mM NaCl 0.03% (v/v) Tween-80 8% (w/v) マンニトール 2% (w/v) トレハロース 0.2 mg/ml 還元されたグルタチオン 4 mM $CaCl_2$	25mM ヒスチジン 20mM Tris 225mM NaCl 0.03% (v/v) Tween-80 8% (w/v) グリシン 2% (w/v) トレハロース 0.2 mg/ml 還元されたグルタチオン 4 mM $CaCl_2$

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI	
A61K 47/34	***(2006.01)***	A61K	47/34
A61K 47/22	***(2006.01)***	A61K	47/22
A61K 47/20	***(2006.01)***	A61K	47/20
A61K 47/36	***(2006.01)***	A61K	47/36
A61P 7/04	***(2006.01)***	A61P	7/04
A61K 9/08	***(2006.01)***	A61K	9/08

(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72)発明者 マーク ベスマン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９１６０４, ステュディオ シティ, アーチ ドライブ ナンバー１３２ ４１５０
(72)発明者 エリック ブジョンソン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９１６０４, ステュディオ シティ, アパートメント ナンバー２０６, アーチ ドライブ ４１８５
(72)発明者 フェロツ ジャミール
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９１７２２, コヴィナ, エヌ. コンウェル アベニュー, １１６０
(72)発明者 ラメシュ カシ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９１７８９, ウォルナット, モッキングバード レーン ４３７
(72)発明者 マイケル ピカル
アメリカ合衆国 コネチカット ０６２５０, マンスフィールド センター, カヤ レーン ６３
(72)発明者 セルゲイ チェサロフ
アメリカ合衆国 コネチカット ０６２６９－２０９２, ストーズ, ユー－９２, フェアフィールド ロード ３７２, スクール オブ ファーマシー, ユニバーシティー オブ コネチカット
(72)発明者 ジョン カーペンター
アメリカ合衆国 コロラド ８０１２７, リトルトン, ダブリュー. ボウルズ ドライブ １２４７８

審査官 小森 潔

(56)参考文献 特開平１０－０６７６７９（ＪＰ, Ａ）
特表平０７－５０１５６０（ＪＰ, Ａ）
国際公開第９６／０２２１０７（WO, Ａ１）
特表平０８－５０９７４５（ＪＰ, Ａ）
特開平０１－１４９７３３（ＪＰ, Ａ）
特開平０１－１５７９１７（ＪＰ, Ａ）
特開平０５－３３１０７１（ＪＰ, Ａ）
特開平０９－０２５２４１（ＪＰ, Ａ）
特開平０８－０５３３６１（ＪＰ, Ａ）
特表平０８－５０４７８４（ＪＰ, Ａ）
特開平０２－１５７２３１（ＪＰ, Ａ）
特開昭６４－０７５４３１（ＪＰ, Ａ）
特開昭６１－２７１２２２（ＪＰ, Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　３８／４３
Ａ６１Ｋ　４７／００－４７／４８
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）