

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6084987号
(P6084987)

(45) 発行日 平成29年2月22日 (2017. 2. 22)

(24) 登録日 平成29年2月3日 (2017. 2. 3)

(51) Int. Cl.	F 1
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 47/06 (2006. 01)	A 6 1 K 47/06
A 6 1 K 9/10 (2006. 01)	A 6 1 K 9/10

請求項の数 14 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2014-552660 (P2014-552660)	(73) 特許権者	512086242
(86) (22) 出願日	平成25年1月22日 (2013. 1. 22)		ノバリック ゲーエムベーハー
(65) 公表番号	特表2015-504082 (P2015-504082A)		ドイツ国 ハイデルベルク 6 9 1 2 0
(43) 公表日	平成27年2月5日 (2015. 2. 5)		イム ノイエンハイマー フェルド 5 1
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/051163		5
(87) 国際公開番号	W02013/110621	(74) 代理人	100133503
(87) 国際公開日	平成25年8月1日 (2013. 8. 1)		弁理士 関口 一哉
審査請求日	平成27年12月18日 (2015. 12. 18)	(72) 発明者	バーンハルド グンター
(31) 優先権主張番号	12152159.5		ドイツ国 ドッゼンハイム 6 9 2 2 1
(32) 優先日	平成24年1月23日 (2012. 1. 23)		シュリースハイマーシュトラッセ 1 9
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	バスチャン タイジンガー
			ドイツ国 マンハイム 6 8 2 3 9 ツア
			ヴァルダウ 2 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セミフッ素化アルカンに基づく安定化タンパク質組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物活性化合物および液体ビヒクルを含む組成物であって、前記液体ビヒクルが、式：
R F R H

(式中、R F は、4 から 1 2 個の炭素原子を有する直鎖状全フッ素化炭化水素セグメントであり、R H は、4 から 8 個の炭素原子を有する直鎖状アルキル基である) で表されるセミフッ素化アルカンを含み；前記生物活性化合物が、少なくとも 1, 5 0 0 D a の分子量を有するポリペプチドおよびタンパク質から選択される、治療剤もしくは診断剤またはワクチンであり、懸濁液の形態である、組成物。

【請求項 2】

前記ポリペプチドまたはタンパク質が、2, 0 0 0 D a の分子量を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記生物活性化合物が、分解および／または凝集に感受性がある、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記生物活性化合物が、単ドメインタンパク質または 2 ドメインタンパク質である、請求項 1 から 3 の何れかに記載の組成物。

【請求項 5】

前記生物活性化合物がインスリンである、請求項 1 から 4 の何れかに記載の組成物。

10

20

【請求項 6】

前記セミフッ素化アルカンが、F 4 H 5、F 4 H 6、F 4 H 8、F 6 H 4、F 6 H 6、F 6 H 8 および F 6 H 1 0 から選択される、請求項 1 から 5 の何れかに記載の組成物。

【請求項 7】

水を含まない、請求項 1 から 6 の何れかに記載の組成物。

【請求項 8】

医薬としての使用のための、請求項 1 から 7 の何れかに記載の組成物。

【請求項 9】

前記医薬が皮下、皮膚、筋肉内または局所注射による非経口投与のためのものである、請求項 8 に記載の医薬としての使用のための組成物。

10

【請求項 10】

前記医薬が、患者の眼、耳、肺、皮膚または鼻への局所投与のためのものである、請求項 8 に記載の医薬としての使用のための組成物。

【請求項 11】

少なくとも 1, 5 0 0 D a の分子量を有するポリペプチドまたはタンパク質から選択される生物活性治療剤もしくは診断剤またはワクチンを含む組成物を調製する方法であって、式：

R F R H

(式中、R F は、4 から 1 2 個の炭素原子を有する直鎖状全フッ素化炭化水素セグメントであり、R H は 4 から 8 個の炭素原子を有する直鎖状アルキル基である)

20

で表される懸濁液を形成するためのセミフッ素化アルカンを含む液体ビヒクル中に前記生物活性ポリペプチドまたはタンパク質を組み込む工程を含む、方法。

【請求項 12】

前記ポリペプチドまたはタンパク質が、少なくとも 2, 0 0 0 D a の分子量を有する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記生物活性ポリペプチドまたはタンパク質が、分解および／または凝集に感受性がある、請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記組成物が化学的におよび／または物理的に安定化されている、請求項 11 から 13 の何れかに記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ペプチドおよびタンパク質組成物、特に、治療または診断用途のためのポリペプチドまたはタンパク質の製剤処方物として有用である組成物の分野におけるものである。

【背景技術】

【0002】

バイオテクノロジー分野で多くの新たな前進および進展があったことにより、以前には処置不可能または不治であった疾患を標的とするペプチドおよびタンパク質に基づく新しいクラスの治療用生物医薬品が近年出現してきた。

40

【0003】

しかし、それらの経口バイオアベイラビリティが低く、一般にインビボでの半減期が短いため、これまでに開発されたタンパク質およびポリペプチド治療薬の多くの送達方法が、殆ど非経口経路に限定されている。現在認可されているヒトモノクローナル抗体（急速に成長してきた標的化治療薬のクラス）は全て、注射による投与が必要である。例えば、関節リウマチを処置するために最初に適応となったヒトモノクローナル抗体であるアダリムマブ（H u m i r a（商標）、A b b o t t から市販されている）は、プレフィルドシリンジの形態で与えられる。現在市販されている経口、粘膜用または吸入治療用組成物

50

は数種類のみであり、これらの多くは、比較的低い分子量のポリペプチド剤のみを組み込んでいる。吸入経路により送達されるより高い分子量のタンパク質治療剤の例はドルナーゼアルファ（Pulmozyme（商標）、Rocheより販売）であり、これは、嚢胞性線維症の処置に用いられる組み換えヒトデオキシリボヌクレアーゼ I の溶液である。

【0004】

タンパク質およびポリペプチドの真の分子サイズおよび複雑性、ならびにそれらの構造の完全性が損なわれることを通じてそれらの活性喪失が比較的容易に起こることから、これらのタイプの治療薬の加工、処方および送達には困難が伴う。

【0005】

タンパク質の生物学的活性は、その独自の三次元構造；その二次および三次構造により決定される。タンパク質を包含するペプチド鎖成分間の、水素結合、静電相互作用、ファンデルワールス力、疎水性相互作用および共有結合などの内部相互作用の特異的かつ均衡のとれた組み合わせは、そのネイティブ状態において折り畳まれたタンパク質の最終的構造に寄与するものである。これらの相互作用に対する僅かな変化が、タンパク質の構造の完全性に大きな影響を及ぼす可能性があり得る。タンパク質の詳細な生物学的機能は、他の関連する巨大分子および／または小分子とのその特異的な相互作用に基づく。結果的に、基本的な三次元特性が多少なりとも崩壊した場合、タンパク質の特異性、したがって治療上の有効性が失われる。

【0006】

ネイティブタンパク質構造の喪失は、多くの分解経路を通じて起こり得る。凝集は、ネイティブタンパク質単量体の自己会合または非ネイティブオリゴマーへの部分的に折り畳まれていないタンパク質の会合などの非共有結合事象を通じて起こり得る。タンパク質劣化および凝集はまた、架橋ジスルフィド結合の形成および／または交換、ペプチド結合加水分解、脱アミド化または酸化などの共有の不可逆的化学的事象を通じて起こり得る。これらの現象の増加は、タンパク質の固有の特徴だけでなく、凍結融解サイクル、pH、タンパク質濃度、イオン強度、脱安定化する化学添加物の存在、乾燥度および機械的ストレス因子、例えばキャビテーションまたはせん断などのような関連ストレス状態（これらは全て、ネイティブの折り畳まれたタンパク質構造に負の影響を与え得る）を含め、温度などの多くの物理化学的環境条件にも依存する。

【0007】

このようなオリゴマー形態への、高分子量であることが多い形態へのタンパク質の会合は、タンパク質またはポリペプチド治療薬の、処方、送達および長期保存において重大な問題をもたらす。凝集は、活性のあるタンパク質薬物の喪失につながり得、投薬は信頼できない無効なものとなる。液体処方物において、不溶性であり得る凝集体は、沈殿し、流動性を妨げ得る大きな微粒子を形成し得、これは非経口適用にとって非常に不利である。さらに、タンパク質凝集体は毒性を示し得、望ましくない免疫原性反応を誘発し得る（Rosenberg, A. S., AAPS J, 2006, 8, E501）。したがって、タンパク質またはポリペプチド液体処方物に対して選択される媒体の特徴は、実用性および処方物の寿命に大きな影響を及ぼし得る。

【0008】

水性環境は、タンパク質構造および生物活性の維持に対して殆どの例において重要であることが知られている。すなわち、水分子は、折り畳みに必須であるかまたはそれに対する原動力でさえあり得、および／または酵素活性に直接関与し得る。一方で、水性媒体は、水相の組成物の性質および様々なパラメーター、例えば pH およびイオン強度などに依存して悪影響も有し得る。水は、可塑剤として作用するか、またはアミド結合の加水分解性切断などにおけるように、反応媒体に、ならびに直接的に反応の成分になり得る。したがって、タンパク質治療薬を処方する分野において実質的に使用されてきた方法は、凍結乾燥（フリーズドライ）またはタンパク質を噴霧乾燥して固形粉末状にすることである。この場合、水の除去によって、立体構造的柔軟性および他の分子と相互作用するためのタンパク質巨大分子の拡散運動性が制限され、したがって凝集の可能性が低下する。その結

10

20

30

40

50

果、多くの水性ベースの処方物と比べて、乾燥状態のタンパク質を用いると、実質的により長期の保存が実行可能となる。

【0009】

しかし、注目すべきは、タンパク質分解および凝集が、凍結乾燥そのものの過程に極めて容易に起こり得、これらの事象の発生を抑えるために、凍結乾燥過程を開発するための時間の投入およびコストが必然的に非常に高くなる、ということである。水-水素結合 (water hydrogen-bonding) 効果の喪失を相殺するように働く、糖類、ポリオールなどのさらなる安定化剤が凍結乾燥前の組成物に添加されることも多い。このような賦形剤は、凍結乾燥過程に有用である一方で、例えば結晶化を介した相分離によって、長期にわたる乾燥状態でのタンパク質安定性に不利であり得る。最終的な処方物中に存在しなければならないいくつかの成分に加えて、他の凍結乾燥後の安定化賦形剤も、タンパク質のより長い品質保持期間を支えるために含まれる必要があり得る。

10

【0010】

また、水の除去にもかかわらず、乾燥状態のタンパク質組成物は、温度などの外界環境要因および脱アミド化または酸化など、水が重要な試薬ではない化学分解反応の影響が避けられない。温度上昇の結果、運動性が向上し、結果的にタンパク質間反応の可能性が大きくなり、したがって多くの凍結乾燥タンパク質はそれでもなお、常に冷蔵条件下で保存しなければならない。また、処方物の pH および等張性を、凍結乾燥過程に対してより影響を受け易くするために添加される賦形剤は、最終的な乾燥状態のタンパク質に対して安定化するようなものではないことがある。水分の導入は懸案事項であり得、乾燥固形形態のタンパク質に対する保存手段（ならびに材料）に対しても特別な注意を払わなければならない。

20

【0011】

さらに、実際の投与前の追加的な工程として水性媒体中での凍結乾燥タンパク質の再構成が必要であり、これには不適切な操作／投与および不純物混入のリスクがある。水性媒体の pH または温度が最適でないかまたは適正な再水和のための時間が短すぎる場合、再構成工程それ自体がタンパク質凝集を誘発し得る。したがって、適切な再構成媒体の処方も考慮し、正しく開発する必要がある。全体的に、経済的な観点から、液体処方物と比較して、非常に長い時間、多大な努力および経費が凍結乾燥タンパク質の過程および処方物の開発に費やされている (Wang, W., Int. J. Pharm., 2000, 203, 1)。

30

【0012】

担体媒体としての有機溶媒の使用は、タンパク質治療薬を処方するための別の選択肢である。しかし、注目すべきは、このような溶媒が、タンパク質構造に対して必ずしも安定化効果を有するわけではなく、場合によってはむしろ逆となるということである。例えば、DMSO または DMF などの極性が強い溶媒およびメタノールまたはエタノールなどのアルコールは、より高い濃度で、多くの場合、三次構造の喪失に至り得る内部アミド水素結合との競合により、変性剤として作用し得、二次構造の比率さえも変化し得、非ネイティブ構造になる可能性がある (Stevenson, C. L., Curr. Pharm. Biotech., 2000, 1, 165)。結果的に、このような溶媒は、タンパク質治療薬の長期保存に理想的ではないことがある。同様にこれらのタイプの溶媒の生理学的耐容性は低い可能性があり、(このような溶媒系におけるその溶解状態にも依存する) タンパク質の放出および吸着に関してさらに熟慮する必要がある。

40

【0013】

水性媒体中のタンパク質治療用処方物は、単純に溶液形態で利用可能であることが多い。一方で、有機溶媒を用いる処方物は、タンパク質の溶媒極性および物理的性質に依存して、このような媒体中でのタンパク質の全般的な不溶性または部分的溶解性ゆえ、さらなる考慮が必要である。疎水性有機溶媒および水不溶 (凍結乾燥) タンパク質の組み合わせから、通常、分散液または懸濁液が生成される。このような場合、懸濁液の長期的な物理的安定性も、タンパク質そのものの長期安定性ととも、処方物開発中の重要な検討事項

50

である。非経口用途のためのタンパク質またはポリペプチドに対する懸濁液担体としての油および脂質などの非極性溶媒の使用が報告されているが、長時間にわたる生理的温度でのこれらの担体の安定性には疑問がある（Knepp, V. M. ら、Pharm. Res. 1998, 15, 1090）。さらに、これらの化合物は、注射部位の疼痛として副作用を引き起こし得る。また、油および脂質は、治療剤の放出を強く遅延させる傾向がある。これは、より長期の持続放出またはデポー型の注射用処方物をもたらすための有用な特徴であり得るが、より迅速で直接的なバイオアベイラビリティが望ましい場合はそうではない。

【0014】

ポリマーに基づく組成物も記載されており、ポリマー成分としてポリビニルピロリドンおよび溶媒としてラウリル乳酸塩（またはラウリルアルコール）を含む、例えば、移植可能な装置との併用に適切なタンパク質またはペプチド剤の粘性のある非水性懸濁液処方物が報告されている（US7258869およびEP1152749）。このような組成物は、このような治療剤の持続放出に適切であることが示唆される。

【0015】

タンパク質、ポリペプチドおよび他の生物活性剤の非水性液体担体として全フッ素化合物も使用されてきた。例えば、US6458376は、オリゴペプチドおよびタンパク質増殖因子を含む治療用／診断用化合物が少なくとも1つの界面活性剤の存在下でパーフルオロカーボン中に懸濁している、眼科適用（局所的に適用される点眼薬）に対して提案される組成物を記載する。しかし、タンパク質またはペプチド治療用化合物を含有する組成物中での使用に適切であり得る特定の界面活性剤の選択の対象における言及はなく、これらの処方物中でのこのような特定の化合物の長期的な化学的および物理的安定性に関して検討されていない。

【0016】

EP0939655（およびUS6730328）は、非水性、疎水性、非反応性のビヒクル、例えば鉱物油、パーフルオロデカリン、メトキシフルオラン、パーフルオロトリブチルアミンまたはテトラデカンなどがタンパク質、タンパク質化合物および核酸を含む懸濁液組成物に使用される、熱安定性処方物を開示する。この処方物は、投与の非経口、経皮、粘膜用、経口および腸内法ならびに長期連続投与および埋め込み型装置を介した送達のためのそれらの使用のために提案される。しかし、これらの懸濁液組成物が物理的に安定であり続けることができるか、すなわち均一に分散または長時間の後に再分散可能であるかについては開示されなかった。これらのタイプの組成物の実際の組織適合性も明らかにされていない。

【0017】

US2010/0008996は、活性物質を患者の肺胞膜／肺領域に輸送するための担体としてSFAを吸入または点滴によって使用することに言及している。より詳細には、この文献は、肺膜から血流への輸送を促進するための、SFA中で十分な溶解性を示し、分子のサイズが1から0.1nmの範囲である活性物質のミセルコロイド溶液を教示する。これは、吸入または点滴に有用であるとして記載されている、小分子薬、イブプロフェン、 α -トコフェロール、パルミチン酸レチノール、5-フルオロウラシル、プロモヘキシン、オセルタミビルおよびアンプロキシソールのSFAに基づく組成物を開示する。対照的に、より大きい分子、例えばタンパク質などの活性物質またはSFAに可溶性ではない活性物質の具体的な組成物は何ら開示していない。

【0018】

WO2011/073134は同様に、場合によってはエタノールなどの共溶媒の存在下での、シクロスポリン、セミフッ素化アルカン中で分子量が1202.61である環状ポリペプチドを含む溶液を開示する。懸濁液およびエマルションも任意の代替物として言及されている一方で、このようなタイプの組成物の具体的な開示はない。

【0019】

Kociokら（Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol

10

20

30

40

50

o 1 2005, 243, 345-358) は、乳化されたある種の小胞サイズのタンパク質小滴によって、細胞膜接着を通じたマクロファージ活性化が支持され得るか否かを調べた。この目的のために、この著者らは、ポリカーボネートフィルター膜を通じた PBS 溶液へのセミフッ素化アルカンの噴出によって水性連続相中で F6H8 の乳化小滴（単層小胞と呼ばれる）を調製した。ヒト血清アルブミン（HSA）が血中好中球活性化に影響があるか否かを判定するために、HSA を水性 PBS 溶液に含めることによって、一部の小滴を HSA で被覆した。

【0020】

本発明の目的は、現在知られている処方物に関連する制限および短所を克服する新規タンパク質またはポリペプチド組成物を導入することである。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0021】

【特許文献1】米国特許第7258869号明細書

【特許文献2】欧州特許第1152749号明細書

【特許文献3】米国特許第6458376号明細書

【特許文献4】欧州特許第0939655号明細書

【特許文献5】米国特許第6730328号明細書

【特許文献6】米国特許出願公開第2010/0008996号明細書

【特許文献7】国際公開第2011/073134号パンフレット

20

【非特許文献】

【0022】

【非特許文献1】Rosenberg, A. S., AAPS J, 2006, 8, E501

【非特許文献2】Wang, W., Int. J. Pharm., 2000, 203, 1

【非特許文献3】Stevenson, C. L., Curr. Pharm. Biotech. h., 2000, 1, 165

【非特許文献4】Knepp, V. M. ら、Pharm. Res. 1998, 15, 1090

【非特許文献5】Kociok ら、Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 2005, 243, 345-358

30

【発明の概要】

【0023】

第一の態様において、本発明は、式：RFRH、（式中、RFは、4から12個の炭素原子を有する直鎖状全フッ素化炭化水素セグメントであり、RHは、4から8個の炭素原子を有する直鎖状アルキル基である）のセミフッ素化アルカンを含む液体ビヒクル中の生物活性ポリペプチドまたはタンパク質の新規組成物を提供する。

【0024】

本生物活性ポリペプチドまたはタンパク質は、好ましくは、少なくとも約1,500 Da、特に少なくとも約2,000 Daの分子量を有し、分散液または懸濁液を生じさせるなどのために組成物に組み込まれる。本ポリペプチドまたはタンパク質は、好ましくは治療剤もしくは診断剤またはワクチンである。

40

【0025】

本生物活性化合物は、好ましくは分解および／または凝集に感受性があるポリペプチドまたはタンパク質である。セミフッ素化アルカンの使用によって、他の有機溶媒と比較して、インスリンなどのタンパク質のより安定な分散液または懸濁液が得られることを本発明者らは見出した。合わせて、セミフッ素化アルカンがこのような化合物において顕著な安定化効果を有すること、およびインスリンなどの感受性のあるタンパク質が凝集および／または分解を通じた生物活性の喪失なくかなりの高温にも供され得ることも裏付けられた。

50

【0026】

特に有用なセミフッ素化アルカンは、本明細書中で以下に定義されるような用語法に従い、F4H5、F4H6、F4H8、F6H4、F6H6、F6H8およびF6H10からなる群から選択される。これらのセミフッ素化アルカンは、組織にとって非常に相容性がよく、医薬組成物において必要とされ得る広範なさらなる賦形剤を溶解することが可能であり、おそらくそれらの固有の両親媒性ゆえに、ポリペプチドおよびタンパク質との医薬的に有利な分散液または懸濁液を生じさせる。

【0027】

ある態様において、本発明のタンパク質またはポリペプチド組成物は、室温で、およびさらに高温（例えば37℃前後または生理的温度）でも、化学的および物理的に安定であり、それによりタンパク質またはペプチド剤の生物活性が保持され、治療剤の凝集は僅かである。さらなる態様において、本発明におけるタンパク質またはポリペプチド懸濁液組成物はまた、単分散のままでもあり、および／または高温（例えば37℃前後または生理的温度）での保存後も容易に再分散し得る。

【0028】

さらに、本発明は、このような組成物の医学的用途ならびに分解および／または凝集に感受性があるポリペプチドまたはタンパク質を安定化させるための方法を提供し、この方法は、上記で定義されるようなセミフッ素化アルカンを含む液体ビヒクル中にポリペプチドまたはタンパク質を組み込むことを含む。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】合計24時間にわたり様々な時間間隔で350nmで透過率を測定することによって、F6H8、パーフルオロデカリン（PFD）、パーフルオロオクタン（PFO）およびオクタン（OCT）中のヒトインスリン（HI）の懸濁液の濁度の保持を測光法で調べた。

【図2】オクタン中のα-キモトリプシン懸濁液とF6H8中のα-キモトリプシン懸濁液との透過率の比較である。

【図3】パーフルオロデカリン中のα-キモトリプシン懸濁液とF6H8中のα-キモトリプシン懸濁液との透過率の比較である。

【図4】パーフルオロオクタン中のα-キモトリプシン懸濁液とF6H8中のα-キモトリプシン懸濁液との透過率の比較である。

【図5】パーフルオロデカリン（PFD）、パーフルオロオクタン（PFO）およびオクタン（OCT）中のウシ血清アルブミン（BSA）の懸濁液とF6H8中のウシ血清アルブミン（BSA）との透過率の比較である。

【図6】PFD、PFOおよびOCT中のサケカルシトニン（sCT）の懸濁液とF6H8中のsCTの懸濁液との透過率の比較である。

【図7】F6H8中の1mg/mL試料におけるヒトインスリンのサイズ分布である。

【図8】F6H8中の10mg/mL試料におけるヒトインスリンのサイズ分布である。

【図9】F6H8中の1mg/mL試料におけるヒトカルシトニンのサイズ分布である。

【発明を実施するための形態】

【0030】

第一の態様において、本発明は、生物活性化合物および液体ビヒクルを含む組成物を提供する。本生物活性化合物は、ポリペプチドおよびタンパク質である治療剤もしくは診断剤またはワクチンから選択される。好ましくは、本ポリペプチドまたはタンパク質は、少なくとも約1,500Da、特に少なくとも約2,000Daの分子量を有する。本液体ビヒクルは、式RFRH（式中、RFは、4から12個の炭素原子を有する直鎖状全フッ素化炭化水素セグメントであり、RHは、4から8個の炭素原子を有する直鎖状アルキル基である）のセミフッ素化アルカンを含む。さらに、本生物活性化合物は、分散液または懸濁液を生じさせるなどのために、本組成物に組み込まれ、すなわち生物活性化合物は本液体ビヒクル中に分散または懸濁している。

【0031】

セミフッ素化アルカンは、医薬的な視点から非常に有利なビヒクルである。第一に、これらは実質的に無毒性であり、すなわち局所投与または注射後、様々なタイプのヒトおよび動物組織にとって耐容性が良好である。第二に、これらは化学的に不活性であり、製剤処方物の活性または不活性成分と有害な相互作用を殆ど示さない。第三に、これらは、おそらくそれらの固有の両親媒性の度合いゆえに、製剤処方物において有用である小分子の活性成分または多くの一般的な賦形剤など、広範な化合物を溶解させることが可能である。第四に、セミフッ素化アルカン中で可溶性ではないかまたは可溶性が非常に低い化合物（多くのポリペプチドおよびタンパク質など）を組み込む場合、これらは、非常に有用な物理的または医薬的特性を有する、すなわち固形の非分散性の沈殿物を形成する傾向が僅かであるかまたは全くない、分散液または懸濁液を形成する。

10

【0032】

本発明者らは、セミフッ素化アルカン中のタンパク質分散液および懸濁液が驚くほど安定であることを見出した。これらは、微細に分散し、均一なままであり、浮遊または沈殿が起こった場合、これは一般的にゆっくりと起こり、処方物を保持する容器（例えばバイアル）を振盪した後、患者または介護者が用量を取り出すための十分な時間がある。大型の再分散性に乏しい凝集体の形成は観察されず、浮遊または沈殿後、タンパク質粒子は穏やかに振盪することによって顕著な喪失なく容易に再分散し、それらの元の粒径分布をほぼ保持すると思われる。

【0033】

20

これは、他の化学的に不活性な液体ビヒクル、例えば米国特許第5,518,731号および米国特許第6,458,376号において医薬品のためのビヒクルとして提案されている、例えばパーフルオロカーボンなどとは明確に異なっている。本発明者らは、パーフルオロオクタンまたはパーフルオロデカリンなどの全フッ素化合物またはオクタンのような他の有機溶媒が液体ビヒクルとして使用される場合、懸濁液が著しくより不安定になる傾向があり、すなわちこれらが、分散相の、および連続相の相対密度に依存して、分散相の浮遊によってまたはその沈殿によって、非常に急速に分離することを見出した。これには、高密度であり、再分散性に乏しいものであり得る粒子凝集体の急速な形成を伴う。急速な浮遊または沈殿によって、不可能でないにせよ、的確で再現性のある投与が非常に困難になる。例えば、注射用または眼科用懸濁液が振盪後に非常に急速に沈殿する場合、満杯の容器（例えばバイアル）からの最初の投与は、振盪時にすぐに取り出さないと、容器を上下逆にしておかない限り、含有される薬物粒子数が意図した粒子数よりも少なくなり、容器を上下逆にしておくと、意図した薬物粒子量よりも多い量が投薬される。同じ容器がほぼ空であり、最後の用量が投薬されるとき、最初に薬物用量が低かった場合、体積あたりに取り出される薬物用量が高くなりすぎ、逆に最初に薬物用量が高かった場合、薬物用量が低くなりすぎることになる。

30

【0034】

さらに、全フッ素化担体またはオクタンのような他の有機溶媒中でのタンパク質の大型で再懸濁性に乏しい凝集体の形成は、皮下注射のために使用されるものなど、微小注射針の目詰まりを導く可能性がある。大型の粒子は、特に炎症過程において、体内で有害反応を誘導するリスクがある。

40

【0035】

全フッ素化合物またはオクタン中に懸濁した粒子は、ガラスバイアル容器および／または用量の取り出しのために使用される針－シリンジの壁に付着する傾向があることも認められた。これによっても精密な投与が妨げられることとなる。

【0036】

SFAに基づく懸濁液の有利な特性は、結果的に優れた医薬的な質および性能特性をもたらす。患者および／または介護者にとっての利便性のレベルが大きく向上する。より重要なこととして、投与の正確性すなわち投与の精密さおよび再現性が、他のタイプの医薬懸濁液を凌ぎ、大きく改善される。これは、より信頼性の高い治療効果をもたらし、過剰

50

投与の結果起こる有害な影響のリスクを低下させる。

【0037】

同時に、セミフッ素化アルカンは、ポリペプチドおよびタンパク質において顕著な安定化効果を有する。これらは、実質的にタンパク質凝集を防ぐかまたは阻害し、化学分解を顕著に低下させる。実際に、セミフッ素化アルカンに組み込まれた際に、一部の感受性タンパク質が、生物活性の喪失なく50℃などの高温に曝露され得る程度まで、安定化されることが分かった。本発明の要となる長所は、液体ビヒクルとして機能する、組成物中のセミフッ素化アルカンの存在によってもたらされる。セミフッ素化アルカンは、その水素原子の一部がフッ素で置換されている直鎖状または分岐状アルカンである。本発明で使用するセミフッ素化アルカン(SFA)において、1つの直鎖状非フッ素化炭化水素セグメントおよび1つの直鎖状全フッ素化炭化水素セグメントが存在する。したがって、これらの化合物は、一般式 $F(CF_2)_n(CH_2)_mH$ に従う。本発明によれば、 n は4から12の範囲から選択され、 m は4から8の範囲から選択される。

10

【0038】

SFAのために頻繁に使用される命名法によって、全フッ素化炭化水素セグメントはR_Fと名付けられ、非フッ素化セグメントはR_Hと名付けられる。あるいは、本化合物は、それぞれ F_nH_m および F_nH_m と呼ばれ得る(式中、 F は全フッ素化炭化水素セグメントを意味し、 H は非フッ素化セグメントを意味する)。さらにまた、 m は個々のセグメントの炭素原子数を定める。例えば、 F_3H_3 は、パーフルオロプロピルプロパンに対して使用される。さらに、このタイプの命名法は通常、直鎖状セグメントを有する化合物に対して使用される。したがって、別段の断りがない限り、 F_3H_3 が、2-パーフルオロプロピルプロパン、1-パーフルオロイソプロピルプロパンまたは2-パーフルオロイソプロピルプロパンではなく、1-パーフルオロプロピルプロパンを意味することを想定すべきである。

20

【0039】

本発明において有用であるSFAはまた、EP-A 9 6 5 3 3 4、EP-A 9 6 5 3 2 9およびEP-A 2 1 1 0 1 2 6にも記載されており、これらの文献の開示は本明細書中に組み込まれる。

【0040】

好ましいSFAとしては、特に化合物 F_4H_5 、 F_4H_6 、 F_4H_8 、 F_6H_4 、 F_6H_6 、 F_6H_8 および F_6H_{10} が挙げられる。本発明を実施するために特に好ましいのは、 F_4H_5 、 F_4H_6 、 F_6H_6 および F_6H_8 である。別の特に好ましい実施形態において、本発明の組成物は F_6H_8 を含む。

30

【0041】

場合によっては、本組成物は、複数のSFAを含み得る。例えば、ある一定の密度または粘度などの特定の標的特性を達成するためにSFAを組み合わせることは有用であり得る。SFAの混合物が使用される場合、その混合物が、 F_4H_5 、 F_4H_6 、 F_6H_4 、 F_6H_6 、 F_6H_8 および F_6H_{10} のうち少なくとも1つおよび特に F_4H_5 、 F_4H_6 、 F_6H_6 および F_6H_8 のうち1つを含むことがさらに好ましい。別の実施形態において、この混合物は、 F_4H_5 、 F_4H_6 、 F_6H_4 、 F_6H_6 、 F_6H_8 および F_6H_{10} から選択される少なくとも2つのメンバーおよび特に F_4H_5 、 F_6H_6 および F_6H_8 から選択される少なくとも2つのメンバーを含む。

40

【0042】

液体SFAは、化学的および生理学的に不活性であり、無色で安定である。それらの典型的な密度は1.1から1.7 g/cm³の範囲であり、それらの表面張力は、19 mN/mという低い値であり得る。RFRH型のSFAは水に不溶性であるが、またある程度両親媒性であり、非フッ素化セグメントのサイズ拡大と相関して親油性が向上する。

【0043】

RFRH型の液体SFAは、網膜を広げ、再付着させるために、硝子体置換術(vitreous humour substitute)の際の長期タンポナーデのために(

50

H. Meinertrら、European Journal of Ophthalmology, Vol. 10 (3), pp. 189-197, 2000)、および硝子体－網膜手術後の残存シリコン油のための洗浄溶液として、商業ベースで使用されている。実験的に、これらはまた、代用血液としても使用されてきた(H. Meinertrら、Biomaterials, Artificial Cells, and Immobilization Biotechnology, Vol. 21 (5), pp. 583-95, 1993)。これらの適用によって、生理学的に相容性が良好な化合物としてSFAが裏付けられた。一方で、SFAは、現在まで認可された薬剤製品において賦形剤として使用されたことはない。

【0044】

本発明の組成物は、ポリペプチドまたはタンパク質からなる群から選択される生物活性化合物を含む。ポリペプチドおよびタンパク質は、ペプチド結合によって互いに連結されるアミノ酸単位のポリマーに相当する。ポリペプチドとタンパク質とを区別するためによく使用されるサイズの境界は、若干根拠に欠けるものであり、これらの分子に対する2つの表現は、本発明において、相容れないものとして理解されるべきものではない。ポリペプチドはタンパク質とも呼ばれ得、逆にタンパク質はポリペプチドと呼ばれ得る。一般に、「ポリペプチド」という用語は、1本ポリマー鎖のみを指し、一方で「タンパク質」という表現は、非共有結合によって互いに連結される2以上のポリペプチド鎖も指し得る。好ましくは、本発明による生物活性化合物は、少なくとも約1,500Da、特に少なくとも約2,000Daの分子量を有するべきである。

【0045】

上記でより詳細に述べられるように、ポリペプチドおよびタンパク質の生物活性は、それらの一次化学構造、すなわちそれらのアミノ酸配列に依存するだけでなく、それらの二次及び三次構造、また多くの場合はそれらの四次構造にも依存する。しばしば、分解に対するポリペプチドまたはタンパク質の感受性もまた、その二次、三次構造に、また四次構造に関連する。本発明の恩恵を受けるポリペプチドおよびタンパク質は、化学的に不安定な化合物、例えば加水分解し易い化合物ならびにそれらの二次以上の構造を急速に喪失する、および／または変性する傾向を有する化合物の両方を含む。特に、本組成物は、分解および／または凝集に感受性があるポリペプチドまたはタンパク質を含む。

【0046】

このような感受性は一般に、安定化賦形剤(緩衝液など)を組み込む場合でも、個々の化合物が一般的な水性媒体中の液体処方物(例えば注射によって即時使用できる処方物)として処方し、通常の条件下で保存することができないことを意味する。したがって、(通常は少なくとも2年間の)許容可能な品質保持期間を有するようにするために、感受性化合物の製剤処方物は、冷蔵保存しなければならないか、またはこれらは、使用前にこれらが再構成される乾燥形態で提供されなければならない。特に、「感受性がある」とは、個々の化合物が、最適化された水性ビヒクル中で処方された場合、通常の条件下での1年未満の保存のうちに、その生物活性の少なくとも約5%を喪失することを意味する。

【0047】

好ましい実施形態において、本ポリペプチドまたはタンパク質は、治療用または診断用化合物またはワクチンである。本明細書中で使用される場合、治療用化合物は、疾患または状態を予防するか、疾患または状態の何らかの症状を緩和するか、何らかの疾患または状態を改善するか、疾患または状態の進行を遅延させるなどのために有用である化合物である。診断用化合物は、生物の状態を判定するために、または疾患、状態、症状もしくは患者の表現型を診断するために有用である。本治療用化合物は、患者に投与されねばならず、一方で診断剤は、具体的な場合に依存して、インビボまたはインビトロで使用され得る。疑義を避けるために、本治療用または診断用化合物は、治療的または診断的有効量で本発明の組成物に組み込まれる。

【0048】

本発明者らはまた、本生物活性化合物が、このクラスの治療剤および診断剤のための低

10

20

30

40

50

から中程度の範囲の分子サイズであるポリペプチドまたはタンパク質である場合、化学的または生物学的活性におけるセミフッ素化アルカンの安定化効果が非常に顕著であることも見出した。ある具体的な実施形態において、本生物活性剤の分子量は、約2,000から約100,000Daの範囲である。さらなる実施形態において、この分子量は、約1,000から約60,000Daの範囲である。さらなる実施形態において、これは、それぞれ約2,000から約60,000Da、または約5,000から約50,000Daの範囲である。一方で、分散液または懸濁液の物理的安定性および／または易再分散性の利点は、血清アルブミン（およそ67kDa）などの比較的大きい分子サイズのポリペプチドおよびタンパク質を用いて、または100,000Daを超えるタンパク質を用いても容易に得られる。さらなる具体的な実施形態において、本生物活性剤は、単ドメインタンパク質または2ドメインタンパク質である。これは、セミフッ素化アルカンの安定化効果がまた、1または2ドメインのみを有するこのようなタンパク質と組み合わせられると非常に顕著であるという本発明者らの発見に基づく。本明細書中で使用される場合、タンパク質ドメインは、タンパク質鎖の残りの部分とは幾分独立して、進化し、機能し、存在し得る小型の三次元構造を形成するタンパク質のアミノ酸配列の一部である。ドメインは、長さが実質的に変動し得るが、しかし、殆どの場合、これらは約25から約500アミノ酸単量体を含む。

10

【0049】

場合によっては、本生物活性剤は、酵素、ホルモンまたは増殖因子または構造タンパク質であり得る。本組成物は、患者において欠けている天然のホルモンを置き換えるかまたは補うように作用する治療用ホルモンを含み得る。本組成物は、場合によっては、複数の生物活性ポリペプチドまたはタンパク質をさらに含む得る。

20

【0050】

さらなる任意の実施形態において、本生物活性剤は、組み換え体であるタンパク質または天然由来起源であり得るタンパク質または合成ペプチドであり得る。本タンパク質は、タンパク質複合物または天然および／または内在性タンパク質の類似体でもあり得る。

【0051】

さらなる実施形態によれば、本組成物は、生物活性剤としてインスリン、特に組み換えヒトインスリンを含む。驚くべきことに、セミフッ素化アルカン中に分散させたインスリンは極めて安定であり、約50℃などのかなりの高温で保存しても凝集しないことが分かった。

30

【0052】

上述のように、本ポリペプチドまたはタンパク質は、分散液または懸濁液を生じさせるなどのために、本組成物中に組み込まれる。言い換えると、本ポリペプチドまたはタンパク質は、液体担体中に分散または懸濁している。液体担体中にタンパク質を分散させる際に懸濁液が生成されるか否かは、例えば担体中でのタンパク質の性質、その濃度および選択されるSFAに依存する。

【0053】

本明細書中で使用される場合、懸濁液は、あるタイプの分散液、すなわち少なくとも1つの連続（またはコヒーレント）相、および、連続相中に分散した少なくとも1つの不連続（または内部の）相を有する系として定義され得る。懸濁液中で、分散相は固相にある。本発明の実施において有用な懸濁液は、少なくとも生理的温度で液体である、つまり連続相が液体である。一般に、懸濁液はまた室温でも液体である。懸濁液の他に、分散液という用語は、タンパク質およびポリペプチドが液相中に微細分散しているコロイド系を含むと理解される。いくつかの実施形態において、本ポリペプチドまたはタンパク質はまた、少なくとも部分的に溶媒和される。

40

【0054】

ある特定の実施形態において、本組成物は、本生物活性ポリペプチドまたはタンパク質および1以上のSFAのみを含み、すなわち本組成物は、上記で定義されるような、生物活性ポリペプチドまたはタンパク質および1以上のSFAからなる。

50

【0055】

先行技術で公知のいくつかの他の懸濁液とは対照的に、本発明の処方物は、それらの物理的安定化のために、界面活性剤を必要としないか、または少量の界面活性剤しか必要としない。界面活性剤は刺激および局所毒性のかかなりの可能性を有するので、特に皮下または筋肉内注射により、または点眼による眼への投与の場合、これは大きな利点である。好ましい実施形態の1つによれば、本発明の組成物は実質的に界面活性剤不含である。さらなる実施形態において、界面活性剤または、複数の界面活性剤が組み込まれる場合、複数の界面活性剤の総量は、それぞれ、約10重量%を超えないか、特に約5重量%を超えないか、または好ましくは約2重量%を超えない。さらなる好ましい実施形態において、この量は、それぞれ、約1重量%を超えないか、または約0.5重量%を超えない。ここで、本明細書中に記載のようなSFAは、様々な程度の親油性を特徴とするフッ素化および非フッ素化アルキル（またはアルキレン）基を含むそれらの化学構造ゆえに、それらがある程度の両親媒性特性を保持するにもかかわらず、界面活性剤の範疇にあるとは理解されない。

10

【0056】

存在しないかまたは少量しか存在しない界面活性剤としては、様々なタイプの医薬組成物における賦形剤として、例えば、湿潤剤、乳化剤、分散剤、可溶化剤などとして一般に使用されるような、非イオン性、陽イオン性、陰イオン性および両性イオン界面活性剤が挙げられる。有用たり得るとみなされる界面活性剤の例としては、チロキサポール、ポロキサマー、例えばプルロニックF68LFまたはルトロールF68、プルロニックL-G2LFおよびプルロニックL62Dなど、ポリソルベート、例えばポリソルベート20およびポリソルベート80など、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ソルビタンエステル、ステアリン酸ポリオキシシル、レシチン、精製または合成リン脂質およびそれらの2以上の混合物が挙げられる。

20

【0057】

本発明の組成物は、例えば、液体ビヒクルの特性、例えば粘度などを改変するために、場合によっては非フッ素化有機液体を含み得る。このような他の液体は、グリセリド油、液体ワックスおよび流動パラフィンから選択される油または高度の生体適合性を示す有機溶媒または複数の液体賦形剤の混合物であり得る。

【0058】

1以上のSFAと併用され得る、有用たり得る油性賦形剤の例としては、トリグリセリド油（すなわち、ダイズ油、オリーブ油、ゴマ油、綿実油、ヒマシ油、スイートアーモンド油）、鉱物油（すなわち、ペトロラタムおよび流動パラフィン）、中鎖トリグリセリド（MCT）、油性脂肪酸、ミリスチン酸イソプロピル、油性脂肪アルコール、ソルビトールおよび脂肪酸のエステル、油性スクロースエステルまたは眼にとって生理学的に耐容性であるあらゆる他の油性物質が挙げられる。

30

【0059】

有用な可能性がある有機溶媒の例としては、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールおよびエタノールが挙げられる。共溶媒の濃度は、好ましくは、SFAまたはSFA混合物の濃度と比べて低くあるべきである。エタノールなどの有機溶媒が使用される場合、およそ5重量%を下回るレベルにこれを維持することが推奨される。より好ましくは、エタノールの含量は、約0.1から約2重量%であり、最も好ましくは、約1重量%を超えない。

40

【0060】

本組成物は、当然のことながら、必要に応じてまたは有用な場合は、さらなる医薬用賦形剤を含み得る。有用である可能性がある賦形剤としては、酸、塩基、抗酸化剤、安定化剤、共力剤、着色剤、増粘剤および、特定の場合での必要に応じて、保存料が挙げられる。しかし、一般に、本発明は、微生物学的に安定である非水性組成物を処方する手段を提供する。これは、SFAが通常は微生物が混入するようなものではないという事実ゆえである。それゆえに、充填しようとする保存料不含組成物を多用途容器に処方することが可

50

能である。保存料不含組成物は多くの患者にとって耐容性がより良好であり、最終製品のコストを低くすることができる。

【0061】

本発明の液体懸濁液は、従来の方法によって調製され得る。原則的には、活性成分を含む固形粒子は、SFAを含む液体ビヒクル中に分散し得る。あるいは、この粒子は、SFAに基づくビヒクルに対する制御条件下で、本活性成分の、典型的には有機の溶液（および場合によっては1以上の固形賦形剤）を添加することによって、現場で沈殿し得る。

【0062】

分散相の粒径は、粒子が液体ビヒクルと合わせられる前または後に調整され得る。好ましい実施形態の1つにおいて、既に適切に選択された粒径を有する活性成分粒子が提供される。このような選択粒径を有する粉末は、結晶工学による個々の化合物の合成から直接得られ得るか、または、合成後、ボールミル、ハンマーミル、ローラーミル、コロイドミル、ジェットミルなどの標準的な装置を用いる従来の破碎または粉碎方法によって得られ得る。懸濁液の調製後、粒径を縮小させるべき場合、超音波処理ならびに様々なタイプのホモジナイザー、例えばコロイドミルまたは高圧ホモジナイザーなどが使用され得る。

【0063】

本発明による懸濁液の優れた物理的特性により、これらの組成物は、患者の眼、耳、鼻もしくは肺への、または注射による非経口的な局所投与に対して特に有用となる。好ましい注射方式としては、皮膚、皮下、筋肉内および局所注射が挙げられる。最も好ましいのは皮下および筋肉内投与経路である。

【0064】

さらなる実施形態は、その主要な態様の一部において本発明を例示する次の実施例から明らかとなろう。

（実施例）

【実施例1】

【0065】

α -キモトリプシノーゲンAの安定化

α -キモトリプシノーゲンA (CHY) タンパク質の保存溶液から、凍結乾燥させた α -キモトリプシノーゲンA (CHY) のアリコートが入った30個のバイアルを用意した。10本のアリコートのそれぞれに、2.5 mLリン酸カリウム緩衝液 (PPB、50 mM、pH 8.0) を添加し、別の10本のアリコートのそれぞれに、2.5 mLのF6H8を添加した。残りの10個のバイアルを対照とした。これらのバイアルに窒素をパージし、穏やかに振盪し、50℃で保存した。所定の間隔で、バイアルを取り出し、それらの内容物を抽出し、円偏光二色性および酵素アッセイによって分析した。

【0066】

その結果、緩衝液中で保存した試料の酵素活性は、1日の保存時間後に既に劇的に低下したことが分かった。凝集塊が視認できた。対照的に、SFA試料は、数週間にわたり実質的に酵素活性を保持していた。実際に、F6H8中で保存されるCHYの生物活性は、対照バイアルでの生物活性と非常に類似していた。表1は、各被験試料について見出された単位/mLの酵素活性を示す。

円偏光二色性の結果に関して、F6H8中で保存されたCHYの試料は、全時点で対照と非常に類似していたが、一方で、PPS中で保存されたCHY試料は、顕著な変化を示し、このことからかなりの変性が示唆される。

【表 1】

保存日数	PPB中のCHY	F6H8中のCHY	CHY対照
1	0.9	19.0	21.4
7	1.3	21.9	22.2
14	0.0	11.0	12.0
28	0.4	14.8	16.9
42	0.2	9.1	7.9
56	0.6	13.0	12.4
80	0.3	8.4	10.5

10

【0067】

2. 5 mg のウシインスリンのアリコートに、2. 5 mL の F 6 H 8 または 2. 5 mL の高希釈含水塩酸（0. 0 4 M）の何れかを添加し、穏やかに振盪した。これらの試料に窒素または酸素の何れかをパージし、次いで、3 7 °C または 5 0 °C でそれぞれ保存した。所定の間隔で、バイアルを引き出し、それらの内容物を抽出し、円偏光二色性および H P L C アッセイによって分析した。

【実施例 2】

【0068】

20

ウシインスリンの安定化

その結果、含水塩酸中で保存した場合、インスリンが非常に不安定であったが、試料に窒素または酸素をパージしたか否かにかかわらず、F 6 H 8 中で保存した場合、両温度レベルで実質的に安定であったことが分かった。これは、両分析方法によって確認された。（回収したインスリンの％での）H P L C アッセイの結果を表 2（3 7 °C で保存）および表 3（5 0 °C で保存）に示す。

【表 2】

保存日数	気体	HCL中のインスリン	F6H8中のインスリン
0		94.0	84.8
1	Nitrogen	86.2	89.3
1	Oxygen	95.1	92.5
22	Nitrogen	1.5	84.9
22	Oxygen	1.5	91.5

30

【表 3】

保存日数	気体	HCL中のインスリン	F6H8中のインスリン
0		94.0	84.8
1	Nitrogen	1.1	87.9
1	Oxygen	2.2	88.8
16	Nitrogen	2.2	88.4
16	Oxygen	5.5	86.7
22	Nitrogen	2.5	95.4
22	Oxygen	2.7	92.3

40

【実施例 3】

【0069】

50

ヒトインスリン懸濁液の物理的安定性および再分散性

この一連の実験において、S F Aおよび他の非水性液体中のヒトインスリン（H I）懸濁液の物理的安定性および再分散性を評価した。上述のように、物理的安定性および特に再分散性の度合いは、例えば注射用または局所用医薬組成物に対する、懸濁液媒体の適切性を決定する重要な基準である。

【0070】

合計24時間にわたり様々な時間間隔で350nmで透過率を測定することによって、F6H8、パーフルオロデカリン（PFD）、パーフルオロオクタン（PFO）およびオクタン（OCT）中のヒトインスリン（H I）の懸濁液の濁度の保持を測光法で調べた（図1）。 10

【0071】

0.91mg/mLの濃度で各液体中にヒトインスリン（Sigma、12643）を懸濁させた。懸濁液を3秒間ボルテックス処理し、次いで氷中で5分間、浴内超音波処理を行った。超音波処理の直後、ピペットを介して懸濁液をストッパー付き3mL石英セルに移した。16時間にわたり、ある時間間隔で各懸濁液に対してUV分光光度計を使用して、350nmでの透過率を測定した。次に、10rpmおよび45度の角度に設定された試験管回転装置（Labinc）を用いて懸濁液を15分間再分散した。再分散後、さらに8時間にわたり透過率を測定した。350nmで測定した透過率データを、0.04M HCl、pH1.6中の0.91mg/mLヒトインスリンの溶液に対して正規化した。 20

【0072】

その結果、F6H8中に懸濁したヒトインスリンの場合、より非常にゆっくりと相分離が起こったことが認められた（図1）。全フッ素化溶媒およびオクタン中の試料と比較して、F6H8中のヒトインスリンの懸濁液の安定性がより高いことは、より長時間にわたり（%透過率値がより低いことと相関する）高い濁度レベルが保持されたことで明らかであった。対照的に、全フッ素化溶媒および炭化水素溶媒オクタン中の懸濁液は、透過率が急激に上昇することにより明らかになるように、急速に濁度が低下し、（例えば浮遊または沈殿によって）相分離を示した。最初に形成された懸濁液中でも、これらの溶媒の試料セル中で不均一性を目視で認めることができ、液体-気体界面に対するさらなる沈殿および/または浮遊が時間とともに急速に明白となった。 30

【0073】

開始時間から16時間後、F6H8中のヒトインスリンの再分散懸濁液はまた、その懸濁液が最初に形成されたときとほぼ同レベルの濁度を回復した。対照的に、パーフルオロデカリン、パーフルオロオクタンおよびオクタン懸濁液は、再分散後、同レベルの濁度を回復し得なかった。したがって、S F A中のタンパク質の懸濁液のみが医薬用途に対する確な物理的特性を示したが、PFD、PFOおよびOCT中の懸濁液は示さなかった。

【実施例4】

【0074】

α-キモトリプシン懸濁液の物理的安定性および再分散性

合計24時間にわたり様々な時間間隔で350nmで透過率を測定することによって、F6H8、パーフルオロデカリン（PFD）、パーフルオロオクタン（PFO）およびオクタン（OCT）中のα-キモトリプシン（CHY）の懸濁液の濁度の保持を測光法で調べた。 40

【0075】

2mg/mLの濃度で各溶媒中にα-キモトリプシン（Sigma、C4129）を懸濁させた。懸濁液を3秒間ボルテックス処理し、次いで氷上で5分間、浴内超音波処理を行った。超音波処理の直後、ピペットを介して懸濁液をストッパー付き3mL石英セルに移した。16時間にわたり、ある時間間隔で各懸濁液に対してUV分光光度計を使用して、350nmでの透過率を測定した。次に、10rpmおよび45度の角度に設定された試験管回転装置（Labinc）を用いて懸濁液を15から20分間再分散した。再分 50

散後、さらに8時間にわたり透過率を測定した。350nmでの透過率データを、リン酸カリウム緩衝液、50mM、pH8中の α -キモトリプシン(2mg/mL)の溶液に対して正規化した。

【0076】

パーフルオロデカリン(図3)、パーフルオロオクタン(図4)およびオクタン(図2)中の個々の懸濁液と比較して、F6H8中の α -キモトリプシン懸濁液の場合は最初からかなり低い値の透過率が観察され、このことから、SFA懸濁液の場合、この懸濁液の均一性が持続的であり、(例えば浮遊または沈殿による)相分離が遅延したことが示される。特に、オクタン中に懸濁した α -キモトリプシンは、石英セルの底部に急速に沈殿することが観察され、このことから、懸濁特性が非常に悪いかまたはない(ほぼ100%透過率)ことが示唆される。16時間にわたる静置後の再分散の後も、他の懸濁液の場合とは対照的に、その元の懸濁液の($t=0$ での)濁度をほぼ回復したという点で、F6H8中の α -キモトリプシンの懸濁液は明らかに他の懸濁液よりも優れていた。

10

【実施例5】

【0077】

ウシ血清アルブミン懸濁液の懸濁動態

実施例3および4と同様の方式で、2時間にわたり様々な時間間隔で350nmで透過率を測定することによって、F6H8、パーフルオロデカリン(PFD)、パーフルオロオクタン(PFO)およびオクタン(OCOT)中のウシ血清アルブミン(BSA)の懸濁動態を評価した。

20

【0078】

5mg/mLの濃度で各溶媒中にBSAを懸濁させた。懸濁液を3秒間ボルテックス処理し、次いで氷上で5分間、浴内超音波処理を行った。超音波処理の直後、ピペットを介して懸濁液をストッパー付き3mL石英セルに移した。2時間にわたり、ある時間間隔で各懸濁液に対してUV分光光度計を用いて350nmでの透過率を測定した。350nmでの透過率データを、リン酸ナトリウム緩衝液、pH7中のBSA溶液(5mg/mL)に対して正規化した。

【0079】

その結果、F6H8中のBSAの懸濁液は、透過率の初期レベルが最低であることが認められた(図5)。さらに、最初の試験間隔(5および10分)における透過率上昇は、SFAに基づく懸濁液の場合、これらの時点で既にそれらの停滞レベルにより近づいていた他の懸濁液の透過率上昇と比べると、比較的小さかった。医薬的な状況において、これらの相違によって、通常は数分以内に完遂される、例えば皮下注射によるこのようなSFA中のBSAの懸濁液を簡便に投薬するために利用可能である時間が延長される。

30

【実施例6】

【0080】

サケカルシトニン懸濁液の懸濁動態

2時間にわたり様々な時間間隔で350nmで透過率を測定することによって、F6H8、パーフルオロデカリン(PFD)、パーフルオロオクタン(PFO)およびオクタン(OCOT)中のサケカルシトニン(sCT)の懸濁液の濁度の保持を測光法で調べた。

40

【0081】

5mg/mLの濃度で各溶媒中にサケカルシトニンを懸濁させた。懸濁液を3秒間ボルテックス処理し、次いで氷上で5分間、浴内超音波処理を行った。超音波処理の直後、ピペットを介して懸濁液をストッパー付き3mL石英セルに移した。2時間にわたり、ある時間間隔で各懸濁液に対して、UV分光光度計を用いて350nmでの透過率を測定した。350nmでの透過率データを、リン酸緩衝食塩水、pH7.4中のサケカルシトニン(5mg/mL)の溶液に対して正規化した。

【0082】

F6H8中のsCTの懸濁液は、最低の透過率初期レベルを2時間にわたり有することが認められたが、このことによりまた、PFD、PFOおよびOCOT中の懸濁液と比較し

50

て、実質的に優れた懸濁液特性が示される（図6）。

【実施例7】

【0083】

F6H8中のヒトインスリンのサイズ分布

Nanostar（商標）Wyatt Technology DLS機器を用いて、F6H8中のヒトインスリン（Sigma Aldrich 10908）の試料の動的
光散乱（DLS）測定を行った。4 μ L使い捨てキュベットを用いて測定を行った。1 m
g/mLおよび10 mg/mLの濃度で試料を調製し、測定を行う前にろ過しなかった。

【0084】

両濃度の試料からの結果から、F6H8中でヒトインスリンの幾分かの溶媒和があり、
粒径がタンパク質の単量体型と相関する重要な画分があることが明らかとなった（図7－
1 mg/mL試料におけるヒトインスリンのサイズ分布（実験#1）および図8－10 m
g/mL試料におけるヒトインスリンのサイズ分布）。本発明者らは、SFAのタンパク
質溶媒和能が、有利な分散または懸濁特性に関与し、再分散可能ではない粗い凝集体の形
成を阻止すると考える。

【表4】

試料	平均半径 (nm)	% 質量単位ピーク
1 mg/mL, 実験 # 1	2.6	98.4
1 mg/mL, 実験 # 2	3.5	100
10 mg/mL	4.3	99.4

【実施例8】

【0085】

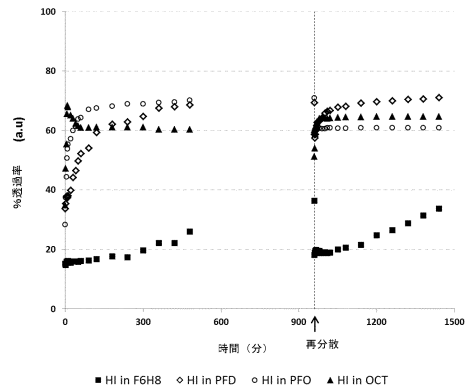
F6H8中でのヒトカルシトニンのサイズ分布

Nanostar（商標）Wyatt Technology DLS機器を用いて、
F6H8中のヒトカルシトニン（Bachem AG 4014409.00005）の
試料の動的光散乱（DLS）測定を行った。4 μ L使い捨てキュベットを用いて測定を行
った。1 mg/mLの濃度で試料を調製した。測定を行う前に、試料をろ過しなかった。

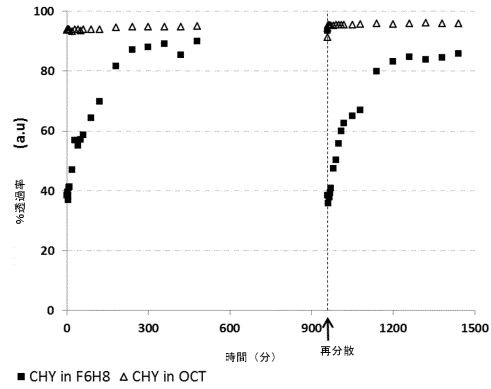
【0086】

この試料からの結果から、F6H8中でヒトカルシトニンの幾分かの溶媒和があり、粒
径がタンパク質の単量体型と相関する検出可能な画分があることが明らかとなった（図9
）。小さな凝集体も検出された。繰り返すが、SFAによるタンパク質の溶媒和が有利な
分散または懸濁特性に関与し、粗い不可逆的な凝集体の形成を阻止すると考えられる。

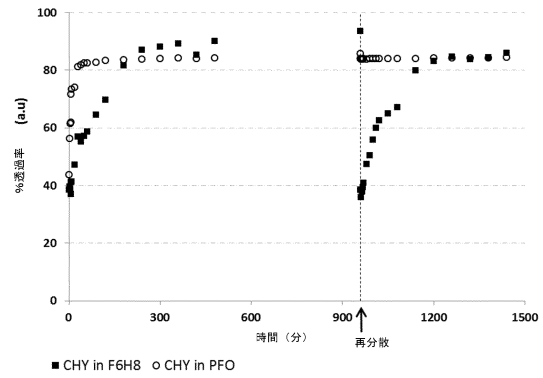
【図 1】



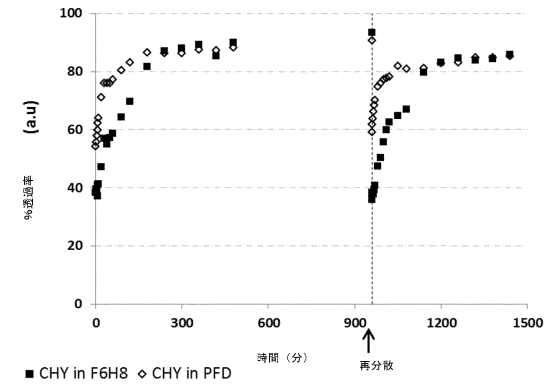
【図 2】



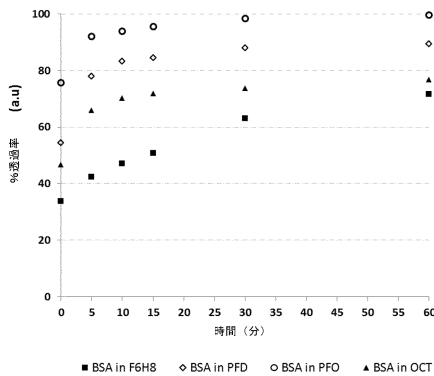
【図 3】



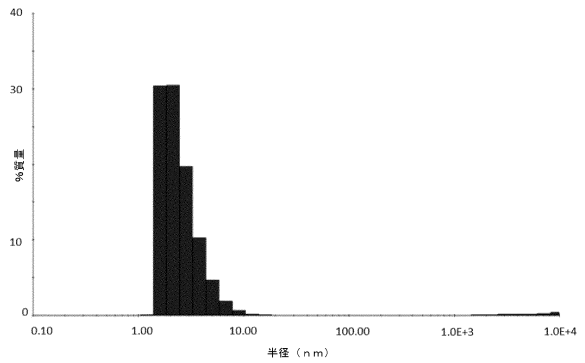
【図 4】



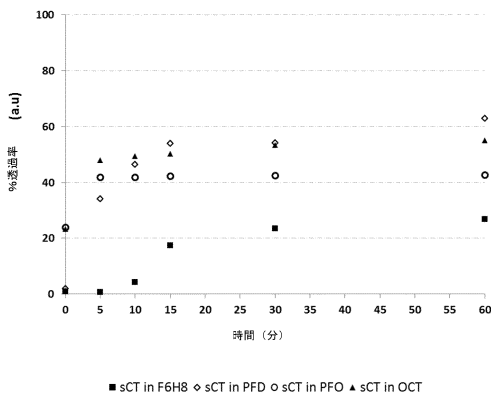
【図 5】



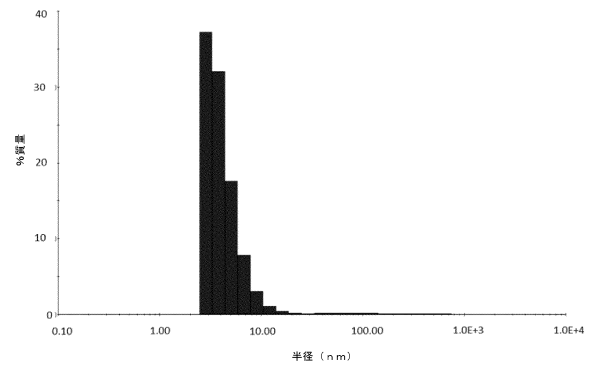
【図 7】



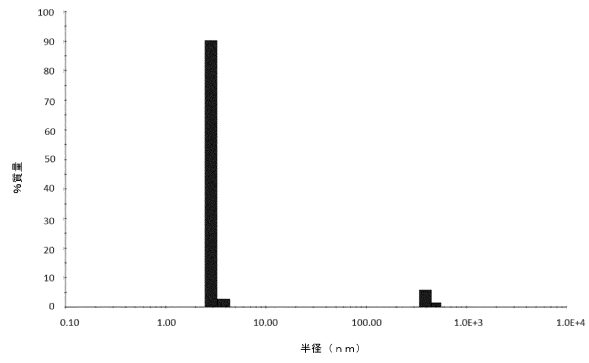
【図 6】



【図 8】



【図 9】



フロントページの続き

- (72)発明者 ゾンニャ タイジンガー
ドイツ国 マンハイム 68239 ツア ヴァルダウ 23
- (72)発明者 ディーター シェレー
スイス国 ラウフェン 4242 イム チャンボル 18
- (72)発明者 クライブ ウィルソン
イギリス国 グラスゴウ G33 1RF ロブロイストン、 ブライアクロフト 41
- (72)発明者 アンソニー ペティグリュ
ドイツ国 ハイデルベルグ 69120 グンドルフシュトラッセ 18
- (72)発明者 アネッテ フッティック
ドイツ国 ミュンヘン 81247 カルヴィンスキーシュトラッセ 41

審査官 金田 康平

- (56)参考文献 国際公開第2011/073134 (WO, A1)
特開2009-256353 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K38/00-38/58
A61K47/00-47/48
A61K 9/00- 9/72 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDr
eamII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)