

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-518808

(P2013-518808A)

(43) 公表日 平成25年5月23日(2013.5.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47 ZNA	4C076
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	4C084
A61K 9/08 (2006.01)	A61K 9/08	4H045
A61K 47/42 (2006.01)	A61K 47/42	
A61K 9/19 (2006.01)	A61K 9/19	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-529917 (P2012-529917)	(71) 出願人	595148888
(86) (22) 出願日	平成22年9月17日 (2010. 9. 17)		ストライカー コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成24年4月20日 (2012. 4. 20)		STRYKER CORPORATION
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/049229		アメリカ合衆国ミシガン州49002, カ
(87) 国際公開番号	W02011/035094		ラマズー, エアヴェー・ブルヴァード
(87) 国際公開日	平成23年3月24日 (2011. 3. 24)		2825
(31) 優先権主張番号	61/243, 383	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成21年9月17日 (2009. 9. 17)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨形成タンパク質のpHを制御するための緩衝液

(57) 【要約】

本発明は、pH安定化されたTGF-スーパーファミリータンパク質及び骨形成タンパク質を含むシステインノットタンパク質の処方物を提供する。特に、本発明は、ある緩衝液が、TGF-スーパーファミリータンパク質及び骨形成タンパク質を含むシステインノットタンパク質の安定性を増強するという観察結果に関する。特に、本明細書中で開示されるのは、処方物のpHを安定化させるためにグリシルグリシン及び酒石酸緩衝液を用いて調製された液体及び凍結乾燥処方物である。

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
骨形成タンパク質及び水性グリシルグリシン緩衝液を含む溶液。
- 【請求項 2】
前記骨形成タンパク質が、BMP - 2、BMP - 4、BMP - 5、BMP - 6、BMP - 7、GDF - 5、GDF - 6 及び GDF - 7 から選択される、請求項 1 記載の溶液。
- 【請求項 3】
前記溶液の pH が約 2.5 ~ 約 4.0 である、請求項 1 記載の溶液。
- 【請求項 4】
前記溶液の pH が、約 2.8 ~ 約 3.5 である、請求項 1 記載の溶液。 10
- 【請求項 5】
前記溶液の pH が、約 2.8 ~ 約 3.2 である、請求項 1 記載の溶液。
- 【請求項 6】
前記緩衝液が、約 1 mM ~ 約 100 mM のグリシルグリシン濃度を有する、請求項 1 記載の溶液。
- 【請求項 7】
前記緩衝液が、約 2 mM ~ 約 20 mM のグリシルグリシン濃度を有する、請求項 1 記載の溶液。
- 【請求項 8】
前記緩衝液が、約 5 mM ~ 約 15 mM のグリシルグリシン濃度を有する、請求項 1 記載の溶液。 20
- 【請求項 9】
前記緩衝液が、約 10 mM のグリシルグリシン濃度を有する、請求項 1 記載の溶液。
- 【請求項 10】
40 で 6 ヶ月間の貯蔵に際して、pH が約 0.2 pH 単位を超えて変化しない、請求項 1 記載の溶液。
- 【請求項 11】
40 で 36 ヶ月の貯蔵に際して、pH が約 0.2 pH 単位を超えて変化しない、請求項 1 記載の溶液。
- 【請求項 12】
前記骨形成タンパク質の濃度が約 1 mg / mL ~ 約 20 mg / mL である、請求項 1 記載の溶液。 30
- 【請求項 13】
前記タンパク質の濃度が約 0.1 mg / mL ~ 約 20 mg / mL である、請求項 1 記載の溶液。
- 【請求項 14】
前記タンパク質の濃度が約 0.1 mg / mL ~ 約 1 mg / mL である、請求項 1 記載の溶液。
- 【請求項 15】
前記タンパク質の濃度が約 0.1 mg / mL ~ 約 40 mg / mL である、請求項 1 記載の溶液。 40
- 【請求項 16】
リオプロテクタントをさらに含む、請求項 1 記載の溶液。
- 【請求項 17】
前記リオプロテクタントが糖である、請求項 16 記載の溶液。
- 【請求項 18】
前記リオプロテクタントが、マンニトール、ラクトース、スクロース及びトレハロース並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 16 記載の溶液。
- 【請求項 19】
前記リオプロテクタントがトレハロースである、請求項 18 記載の溶液。 50

- 【請求項 20】
前記トレハロースが約 1% ~ 約 15% (w/v) の量で存在する、請求項 19 記載の溶液。
- 【請求項 21】
前記トレハロースが約 3% ~ 約 9% の量で存在する、請求項 20 記載の溶液。
- 【請求項 22】
酸化防止剤をさらに含む、請求項 1 記載の溶液。
- 【請求項 23】
前記酸化防止剤が、メチオニン、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m-クレゾール及びチオグリセロールからなる群から選択される、請求項 22 記載の溶液。 10
- 【請求項 24】
請求項 1 記載の溶液を凍結乾燥するステップを含む方法により製造される固体組成物。
- 【請求項 25】
(i) 骨形成タンパク質；及び
(ii) グリシルグリシン、グリシルグリシン塩、又はそれらの組み合わせを含む、固体組成物。
- 【請求項 26】
前記グリシルグリシン塩がグリシルグリシン HCl である、請求項 25 記載の固体組成物。 20
- 【請求項 27】
リオプロテクタントをさらに含む、請求項 25 記載の固体組成物。
- 【請求項 28】
前記リオプロテクタントが糖である、請求項 27 記載の固体組成物。
- 【請求項 29】
前記リオプロテクタントが、マンニトール、ラクトース、スクロース、トレハロース、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 27 記載の固体組成物。
- 【請求項 30】
前記リオプロテクタントがトレハロースである、請求項 29 記載の固体組成物。
- 【請求項 31】
骨形成タンパク質のトレハロースに対する比が、約 $7 \times 10^{-5} : 1$ ~ 約 $1.3 : 1$ (w/w) である、請求項 30 記載の固体組成物。 30
- 【請求項 32】
骨形成タンパク質のグリシルグリシン、グリシルグリシン塩、又はそれらの組み合わせに対する比が、約 $8 \times 10^{-4} : 1$ ~ 約 $310 : 1$ (w/w) である、請求項 25 記載の固体組成物。
- 【請求項 33】
酸化防止剤をさらに含む、請求項 25 記載の固体組成物。
- 【請求項 34】
前記酸化防止剤が、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m-クレゾール、チオグリセロール及びメチオニンからなる群から選択される、請求項 33 記載の固体組成物。 40
- 【請求項 35】
骨形成タンパク質及び水性酒石酸緩衝液を含む溶液。
- 【請求項 36】
前記骨形成タンパク質が、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、GDF-5、GDF-6 及び GDF-7 から選択される、請求項 35 記載の溶液。
- 【請求項 37】
前記溶液の pH が約 2.5 ~ 約 4.0 である、請求項 35 記載の溶液。
- 【請求項 38】 50

- 前記溶液の pH が約 2.8 ~ 約 3.5 である、請求項 35 記載の溶液。
- 【請求項 39】
前記溶液の pH が約 2.8 ~ 約 3.2 である、請求項 35 記載の溶液。
- 【請求項 40】
前記緩衝液が約 1 mM ~ 約 100 mM の酒石酸濃度を有する、請求項 35 記載の溶液。
- 【請求項 41】
前記緩衝液が約 2 mM ~ 約 20 mM の酒石酸濃度を有する、請求項 35 記載の溶液。
- 【請求項 42】
前記緩衝液が約 5 mM ~ 約 15 mM の酒石酸濃度を有する、請求項 35 記載の溶液。
- 【請求項 43】 10
前記緩衝液が約 10 mM の酒石酸濃度を有する、請求項 35 記載の溶液。
- 【請求項 44】
40 で 6 ヶ月間の貯蔵に際して、pH が約 0.2 pH 単位を超えて変化しない、請求項 35 記載の溶液。
- 【請求項 45】
40 で 36 ヶ月間の貯蔵に際して、pH が約 0.2 pH 単位を超えて変化しない、請求項 35 記載の溶液。
- 【請求項 46】
前記骨形成タンパク質の濃度が約 0.01 mg/mL ~ 約 40 mg/mL である、請求項 35 記載の溶液。 20
- 【請求項 47】
前記タンパク質の濃度が約 1 mg/mL ~ 約 20 mg/mL である、請求項 35 記載の溶液。
- 【請求項 48】
前記タンパク質の濃度が約 0.1 mg/mL ~ 約 1 mg/mL である、請求項 35 記載の溶液。
- 【請求項 49】
前記タンパク質の濃度が約 0.1 mg/mL ~ 約 20 mg/mL である、請求項 35 記載の溶液。
- 【請求項 50】 30
リオプロテクタントをさらに含む、請求項 35 記載の溶液。
- 【請求項 51】
前記リオプロテクタントが糖である、請求項 50 記載の溶液。
- 【請求項 52】
前記リオプロテクタントが、マンニトール、ラクトース、スクロース、トレハロース、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 51 記載の溶液。
- 【請求項 53】
前記リオプロテクタントがトレハロースである、請求項 52 記載の溶液。
- 【請求項 54】
前記トレハロースが約 1% ~ 約 15% (w/v) の量で存在する、請求項 53 記載の溶液。 40
- 【請求項 55】
前記トレハロースが約 9% の量で存在する、請求項 54 記載の溶液。
- 【請求項 56】
酸化防止剤をさらに含む、請求項 35 記載の溶液。
- 【請求項 57】
前記酸化防止剤が、メチオニン、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m-クレゾール、及びチオグリセロールからなる群から選択される、請求項 56 記載の溶液。
- 【請求項 58】 50

請求項 3 5 記載の溶液を凍結乾燥するステップを含む方法により製造される固体組成物。

【請求項 5 9】

(i) 骨形成タンパク質 ; 及び

(i i) 酒石酸、酒石酸塩又はそれらの組み合わせ

を含む、固体組成物。

【請求項 6 0】

リオプロテクタントをさらに含む、請求項 5 9 記載の固体組成物。

【請求項 6 1】

前記リオプロテクタントが糖である、請求項 6 0 記載の固体組成物。 10

【請求項 6 2】

前記リオプロテクタントが、マンニトール、ラクトース、スクロース、トレハロース、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 6 1 記載の固体組成物。

【請求項 6 3】

前記リオプロテクタントがトレハロースである、請求項 6 2 記載の固体組成物。

【請求項 6 4】

骨形成タンパク質のトレハロースに対する比が、約 $7 \times 10^{-5} : 1 \sim$ 約 $1.3 : 1$ (w / w) である、請求項 6 3 記載の固体組成物。

【請求項 6 5】

骨形成タンパク質の酒石酸、酒石酸塩、又はその組み合わせに対する比が、約 $7 \times 10^{-4} : 1 \sim$ 約 $270 : 1$ (w / w) である、請求項 6 4 記載の固体組成物。 20

【請求項 6 6】

酸化防止剤を更に含む、請求項 5 9 記載の固体組成物。

【請求項 6 7】

前記酸化防止剤が、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m - クレゾール、チオグリセロール及びメチオニンからなる群から選択される、請求項 6 6 記載の固体組成物。

【請求項 6 8】

骨形成タンパク質、水性緩衝液、並びにプロリン、グリシン、バリン、イソロイシン、及びロイシンからなる群から選択される安定剤を含む溶液。 30

【請求項 6 9】

前記安定剤がプロリンを含む、請求項 6 8 記載の溶液。

【請求項 7 0】

(i) 骨形成タンパク質 ;

(i i) グリシルグリシン塩又は酒石酸塩 ; 及び

(i i) プロリン、グリシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリンの塩、グリシンの塩、バリンの塩、イソロイシンの塩、又はロイシンの塩からなる群から選択される化合物

を含む、固体組成物。

【請求項 7 1】 40

前記化合物がプロリン又はプロリンの塩である、請求項 7 0 記載の固体組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2009年9月17日に提出された米国仮特許出願第61/243,383号(その内容は、参照することによって本明細書中に組み込まれる)の優先権および利益を主張する。

【0002】

本発明は、骨形成タンパク質組成物のpHを安定化させるための組成物に関する。 50

【背景技術】

【0003】

骨形成タンパク質（BMP）のファミリーを含む、システインノットタンパク質及びTGF-スーパーファミリータンパク質の溶液及び凍結乾燥処方物の安定性は、処方物のpHに依存する。これらのタンパク質は塩基性であり、中性緩衝液に添加すると、pHが増加する。低濃度のこれらのタンパク質の添加は、結果としての処方物のpHに著しい影響を及ぼさない。しかし、処方物中のこれらのタンパク質の濃度が増加するにつれ、処方物のpHが増加し、それによりこれらの処方物の安定性が低下する。したがって、処方物を望ましいpHに戻すために、HClなどの強酸を添加する。pHを所望の範囲に戻すために必要な体積を減少させるために、強酸を使用する。しかし、HClを添加すると処方物のイオン強度が増大し、これによりこれらの安定性が低下する。したがって、BMPを含む、システインノットタンパク質及びTGF-スーパーファミリータンパク質のpHをより良好に制御する新規方法及び組成物を特定する必要がある。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、ある緩衝液が、骨形成タンパク質（BMP）のファミリーを含む、システインノットタンパク質及びTGF-スーパーファミリータンパク質の処方物、特に液体又は溶液処方物及び凍結乾燥処方物の安定性を増強するという発見に基づく。特に、塩基性であるこれらのタンパク質をある緩衝液に高濃度で添加すると、緩衝液のpHが増加する。特に治療計画におけるBMPの最適使用に対するこれまでの限定要因は、 3.0 ± 0.2 を超えるpHを有する液体溶液BMP処方物及び 3.5 を超えるpHを有する凍結乾燥BMP処方物が、長期間安定ではなく、変性及び凝集を受けやすいことである。乳酸ナトリウムなどの従来技術の緩衝剤の使用は、処方物中のBMP濃度が限定され、これらの処方物中のBMPの安定性も限定される。なぜなら、pHを安定化させるために強酸を添加しなければならず、これにより処方物のイオン強度が増大するからである。本発明により、当業者は、治療指標で使用するための種々のさらに高度に濃縮されかつ安定なBMP処方物を調製することが可能になる。さらに、本発明は、製造プロセス中のpHのさらなる制御を可能にし、これにより製造されるBMP処方物のロット間のさらなる均一性を提供する、さらに確固とした製造プロセスを提供する。

20

30

【0005】

一態様では、本発明は、骨形成タンパク質及び水性グリシルグリシン緩衝液を含む溶液を想定する。一実施形態によれば、骨形成タンパク質は、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、GDF-5、GDF-6、又はGDF-7のうちいずれかであり得る。好ましい実施形態では、BMPはBMP-7である。溶液のpHは、約 $2.5 \sim 4.0$ 、さらに好ましくは約 $2.8 \sim 3.5$ 、なおいっそう好ましくは約 $2.8 \sim 3.2$ の範囲であり得る。グリシルグリシン緩衝液は、約 $1 \text{ mM} \sim 100 \text{ mM}$ 、約 $2 \text{ mM} \sim 20 \text{ mM}$ 、さらには約 $5 \text{ mM} \sim 15 \text{ mM}$ 、又は約 10 mM の濃度を有し得る。溶液中の骨形成タンパク質濃度は、約 $0.01 \text{ mg/mL} \sim 40 \text{ mg/mL}$ 、約 $0.1 \text{ mg/mL} \sim 1 \text{ mg/mL}$ 、又は約 $0.1 \text{ mg/mL} \sim 20 \text{ mg/mL}$ 、又は約 $1 \text{ mg/mL} \sim 20 \text{ mg/mL}$ であり得る。一実施形態によれば、溶液のpHは $5 \sim 40$ で6ヶ月間、又は36ヶ月もの貯蔵に際して約 0.2 pH 単位を超えて変化しない。

40

【0006】

溶液は、リオプロテクタント、たとえば、マンニトール、マンノース、ラクトース、スクロース、若しくはトレハロースなどの糖、又はこれらの糖の任意の組み合わせも含み得る。別の実施形態では、リオプロテクタントは、好ましくは、マンニトール、マンノース、又はトレハロースである。たとえば、トレハロースは、約 $1\% \sim 15\%$ （w/v）、又は約 $3\% \sim 10\%$ （w/v）の量で含まれ得る。好ましい実施形態では、トレハロースは 9% （w/v）を超えない。

50

【0007】

溶液は酸化防止剤も含み得る。たとえば、酸化防止剤は、メチオニン、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m-クレゾール、EDTA、メタ重硫酸ナトリウム、又はチオグリセロールであり得る。好ましい実施形態では、酸化防止剤はメチオニンである。さらに別の実施形態では、溶液は酸化防止剤を含まない。

【0008】

別の態様では、本発明は、骨形成タンパク質及びグリシルグリシン、グリシルグリシン塩、又はグリシルグリシ及びグリシルグリシン塩の組み合わせを含む固体組成物を想定する。さらなる実施形態では、グリシルグリシン塩はグリシルグリシンHClである。固体組成物は、リオプロテクタント、たとえば、糖を含み得る。糖は、マンニトール、ラクトース、スクロース、若しくはトレハロース又はこれらの糖の任意の組み合わせであり得る。たとえば、糖はトレハロースであり得、これは、たとえば、骨形成タンパク質のトレハロースに対する比が約 $7 \times 10^{-5} : 1$ (w/w) ~ 約 $1.3 : 1$ (w/w) で含まれ得る。骨形成タンパク質のグリシルグリシン、グリシルグリシン塩、グリシルグリシンHCl又はグリシルグリシ及びグリシルグリシン塩の組み合わせに対する比は、たとえば、約 $8 \times 10^{-4} : 1$ (w/w) ~ 約 $300 : 1$ (w/w) であり得る。固体組成物は、酸化防止剤も含み得る。酸化防止剤は、たとえば、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m-クレゾール、チオグリセロール、及びメチオニンであり得る。好ましい実施形態では、酸化防止剤はメチオニンである。

10

【0009】

固体組成物は、界面活性剤も含み得る。たとえば、一実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート20、ポリソルベート80、又はポロキサマー407のうちの1つである。界面活性剤は、約 $0.001\% \sim 0.5\%$ (w/w) の範囲で存在し得る。好ましい実施形態では、界面活性剤は約 0.01% (w/w) のポリソルベート20である。一実施形態では、組成物は界面活性剤を含まない。

20

【0010】

固体組成物は、骨形成タンパク質及びグリシルグリシンの溶液を凍結乾燥することによって調製することができる。一実施形態では、凍結乾燥された組成物はマンニトールを含まない。

【0011】

さらに別の態様では、本発明は、骨形成タンパク質及び水性酒石酸緩衝液を含む溶液を想定する。一実施形態では、骨形成タンパク質は、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、GDF-5、GDF-6、又はGDF-7のうちのいずれかであり得る。好ましい実施形態では、BMPはBMP-7である。溶液のpHは、約 $2.5 \sim 4.0$ 、さらに好ましくは約 $2.8 \sim 3.5$ 、なおいっそう好ましくは約 $2.8 \sim 3.2$ の範囲であり得る。酒石酸緩衝液は、約 $1 \text{ mM} \sim 100 \text{ mM}$ 、約 $2 \text{ mM} \sim 20 \text{ mM}$ 、さらには約 $5 \text{ mM} \sim 15 \text{ mM}$ 、又は約 10 mM の濃度を有し得る。溶液中の骨形成タンパク質濃度は、約 $0.01 \text{ mg/mL} \sim 40 \text{ mg/mL}$ 、約 $1 \text{ mg/mL} \sim 20 \text{ mg/mL}$ 、約 $0.1 \text{ mg/mL} \sim 1 \text{ mg/mL}$ 、又は約 $0.1 \text{ mg/mL} \sim 20 \text{ mg/mL}$ である。一実施形態では、溶液のpHは、液体処方物中、凍結乾燥物として、又は凍結乾燥物から調製される再構成された溶液として、約 0.2 pH 単位を超えて変化しない。

30

40

【0012】

酒石酸の発明の場合、溶液は、リオプロテクタント、たとえば、マンニトール、ラクトース、スクロース、若しくはトレハロースなどの糖、又はこれらの糖の任意の組み合わせも含み得る。たとえば、トレハロースは、約 $1\% \sim 15\%$ (w/v)、又は $3\% \sim 10\%$ (w/v) の量で含まれ得る。好ましい実施形態では、トレハロースは 9% (w/v) を超えない。溶液は酸化防止剤も含み得る。たとえば、酸化防止剤は、メチオニン、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m-クレゾール、又はチオグリセロールであり得る。好ましい実施形態では、酸化防止剤はメチオニンである。さらに別の実

50

施形態では、溶液は酸化防止剤を含まない。固体組成物は、界面活性剤も含み得る。たとえば、一実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート 20、ポリソルベート 80、又はポロキサマー 407 である。界面活性剤は、たとえば、約 0.001% ~ 0.5% (w/w) の範囲で存在する。好ましい実施形態では、界面活性剤は約 0.01% (w/w) のポリソルベート 20 である。一実施形態では、組成物は界面活性剤を含まない。

【0013】

関連する態様では、本発明は、骨形成タンパク質並びに酒石酸、酒石酸塩、又は酒石酸及び酒石酸塩の組み合わせを含む固体組成物を想定する。酒石酸及び/又は酒石酸塩は、(+) 酒石酸 (右旋性酒石酸としても知られる)、(-) 酒石酸 (左旋性酒石酸としても知られる)、それらの組み合わせ (ラセミ酸としても知られる)、及び右旋性酒石酸の立体異性体 (メソ酒石酸としても知られる) をはじめとする酒石酸塩の任意のエナンチオマー又は立体異性体を含み得る。好ましい実施形態では、酒石酸は、(+) 酒石酸、すなわち右旋性酒石酸である。固体組成物はリオプロテクタント、たとえば糖を含み得る。糖は、マンニトール、ラクトース、スクロース、若しくはトレハロース又はこれらの糖の任意の組み合わせであり得る。たとえば、糖はトレハロースであり得、これは、たとえば骨形成タンパク質のトレハロースに対する比が約 $7 \times 10^{-5} : 1$ (w/w) ~ 約 1.3 : 1 (w/w) で含まれ得る。骨形成タンパク質の酒石酸、酒石酸塩、又は酒石酸及び酒石酸塩の組み合わせに対する比は、たとえば、約 $7 \times 10^{-4} : 1$ ~ 約 270 : 1 (w/w) であり得る。好ましい実施形態では、この比は、約 0.07 : 1 ~ 約 13 : 1 (w/w) (タンパク質対酒石酸、酒石酸塩、又は酒石酸及び酒石酸塩の組み合わせ) である。固体組成物は、酸化防止剤も含み得る。酸化防止剤は、たとえば、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m-クレゾール、チオグリセロール、及びメチオニンであり得る。固体組成物は、ポリソルベート 20、ポリソルベート 80、ポロキサマー 188、又はポロキサマー 407 などの界面活性剤も含み得る。界面活性剤は、約 0.001% ~ 0.5% (w/w) の範囲で存在し得る。好ましい実施形態では、界面活性剤は約 0.01% (w/w) のポリソルベート 20 である。別の実施形態では、組成物は界面活性剤を含まない。

10

20

【0014】

固体組成物は、骨形成タンパク質及び酒石酸の溶液を凍結乾燥することによって調製することができる。一実施形態では、凍結乾燥組成物はマンニトールを含まない。

30

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図 1】図 1 は、実施例 2 に記載するような、酒石酸 (1)、グリシルグリシン (2)、リンゴ酸 (3)、乳酸 (4)、アスパラギン酸 (5)、又はコハク酸 (6) のいずれか及び 9% のトレハロースを含む溶液の pH に対して BMP-7 (mg/mL) の濃度をプロットした線グラフである。

【図 2】図 2 は、実施例 3 で記載するような、グリシルグリシン pH 3.1 (1)、乳酸塩 pH 3.5 (2)、酒石酸塩 pH 3.1 (3)、乳酸塩 + 10 mM の NaCl pH 3.1 (4)、及び乳酸塩 + 10 mM の NaCl、20 mM のメチオニン pH 3.1 (5) の存在下での経時的な BMP-7 の凝集率 (%) をプロットした線グラフである。

40

【図 3A】図 3A は、40 で保持した 1 mg/mL の BMP-7 の凍結乾燥処方物の経時的な凝集率 (%) をプロットした線グラフである。

【図 3B】図 3B は、40 で保持した 16 mg/mL の BMP-7 の凍結乾燥処方物の経時的な凝集率 (%) をプロットした線グラフである。

【図 4】図 4 は、10 mM のグリシルグリシン、10 mM の乳酸塩又は 10 mM の酒石酸塩を含む 1 mg/mL の BMP-7 の凍結乾燥処方物の経時的な凝集率 (%) をプロットした線グラフである。

【図 5】図 5 は、成熟ヒト BMP-7 (配列番号 1) のアミノ酸配列である。

【図 6】図 6 は、成熟ヒト BMP-2 (配列番号 2) のアミノ酸配列である。

【図 7】図 7 は、成熟ヒト BMP-6 (配列番号 3) のアミノ酸配列である。

50

【図 8】図 8 は、成熟ヒト BMP - 4 (配列番号 4) のアミノ酸配列である。

【図 9】図 9 は、成熟ヒト BMP - 5 (配列番号 5) のアミノ酸配列である。

【図 10】図 10 は、成熟ヒト GDF - 5 (配列番号 6) のアミノ酸配列である。

【図 11】図 11 は、成熟ヒト GDF - 6 (配列番号 7) のアミノ酸配列である。

【図 12】図 12 は、成熟ヒト GDF - 7 (配列番号 8) のアミノ酸配列である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

BMP 等の TGF - スーパーファミリータンパク質を含む液体の又は再構成されたシステインノットファミリータンパク質の安定性は、処方物の pH 及びイオン強度に依存し、所望の pH 範囲は 3.0 ± 0.2 である。低濃度のこれらのタンパク質、すなわち 2 mg/mL 未満の添加は、結果として得られる処方物の pH に有意な影響を及ぼさない。しかし、これらのタンパク質の濃度が増大するにつれ、すなわち、 2 mg/mL を超えると、処方物の pH は、例えば 3.4 を超える pH に増大する。増大したイオン強度でこれらのタンパク質は不安定であるので、pH で観察される増加を軽減するために用いることができる緩衝剤及び pH 調節酸の濃度には制限がある。

10

【0017】

本出願者等は、驚くべきことに、そして意外にも、これらのタンパク質処方物、例えば BMP を含むものを、水性グリシルグリシン緩衝液又は酒石酸緩衝液を用いて調製することにより、タンパク質を添加した後に強酸を添加することによって、処方物の pH を低下させる必要がなくなることを見出した。

20

【0018】

更に広い BMP 濃度範囲全体にわたって pH を制御する緩衝剤を選択する利点には、処方物の pH を、HCl などの強酸、又は NaOH などの強塩基で調節する必要を排除又は軽減することなど、製造プロセス操作が少ないことが含まれる。これにより、処方物のイオン強度を低下させることによって BMP 製剤の安定性が増強され、BMP タンパク質の変性及び/又は凝集が減少し、そして BMP の安定な凍結乾燥製剤について可能な濃度範囲が増加する。

【0019】

BMP を含む処方物を、適切な pH 3.0 ± 0.2 で調製するのが重要である。なぜなら、タンパク質の BMP ファミリーのメンバーは、生理的条件下で、すなわち生理的 pH、特に約 1 mg/mL を超える濃度で本質的に不溶性であるからである。したがって、pH を制御して、処方物中の必要な量の BMP タンパク質の溶解度を保証することが必要である。

30

【0020】

処方物

本発明による処方物には、これに限定されるものではないが、再構成された凍結乾燥物などの溶液(液体形態)並びに、これらに限定されるものではないが、凍結乾燥形態、ゲル、マイクロカプセル化粒子、及びペーストなどの固体形態が含まれる。ゲル、ペースト、又は粒子と組み合わせて用いられる再構成された凍結乾燥物から調製される液体処方物、凍結乾燥物、及び液体溶液の組み合わせも、本発明により想定される。

40

【0021】

たとえば、本発明による一実施形態では、処方物は、水性緩衝液及び BMP タンパク質を含む溶液である。たとえば、緩衝剤は、グリシルグリシン、酒石酸、リンゴ酸、乳酸、アスパラギン酸、又はコハク酸であり得る。好ましい実施形態では、緩衝剤はグリシルグリシンであり、別の好ましい実施形態では、緩衝剤は酒石酸である。別の実施形態では、緩衝剤は、グリシルグリシン、酒石酸、リンゴ酸、乳酸、アスパラギン酸、又はコハク酸の 2 以上の組み合わせである。たとえば、一実施形態では、緩衝剤はグリシルグリシン及び酒石酸である。

【0022】

さらに別の実施形態では、グリシルグリシン緩衝剤は、約 1 mM ~ 約 100 mM 、さら

50

に好ましくは約 2 mM ~ 約 20 mM、なおいっそう好ましくは約 5 mM ~ 約 15 mM の濃度を有し、そしてなおいっそう好ましくは、グリシルグリシン緩衝剤の濃度は約 10 mM である。

【0023】

別の実施形態によれば、液体溶液処方物は、安定剤をさらに含む。たとえば、安定剤は、プロリン、グリシン、バリン、イソロイシン、又はロイシンであり得る。好ましい一実施形態では、安定剤はプロリンであり、一方、さらに別の実施形態では、安定剤は、プロリン、グリシン、バリン、イソロイシン、又はロイシンの 2 以上の組み合わせである。

【0024】

一実施形態によれば、BMP は BMP - 7 である。別の実施形態によれば、BMP は、BMP - 2、BMP - 4、BMP - 5、BMP - 6、又は BMP - 9 である。別の実施形態によれば、BMP は、GDF - 5、GDF - 6、又は GDF - 7 である。処方物中の BMP 濃度は、たとえば、約 0.01 mg/mL ~ 約 40 mg/mL である。さらに別の実施形態では、BMP タンパク質の濃度は、約 1 mg/mL ~ 約 20 mg/mL である。BMP の好ましい濃度は約 0.1 mg/mL ~ 約 1 mg/mL であり；BMP のさらに好ましい濃度は約 0.1 mg/mL ~ 約 20 mg/mL であり；BMP の最も好ましい濃度は約 0.1 mg/mL ~ 約 1 mg/mL である。

10

【0025】

さらに別の実施形態では、処方溶液の pH は、約 2.5 ~ 約 4.0、さらに好ましくは約 2.8 ~ 約 3.5、そしてなお一層好ましくは約 2.8 ~ 約 3.2 である。

20

【0026】

別の実施形態では、本明細書中で開示される本発明の液体処方物の凍結乾燥により、固体処方物を得る。

【0027】

別の実施形態では、処方物は、緩衝剤及び BMP タンパク質の溶液から誘導される固体形態である。たとえば、緩衝剤は、グリシルグリシン、酒石酸塩、リンゴ酸塩、乳酸塩、アスパラギン酸塩、コハク酸塩、又はグリシルグリシン、酒石酸塩、リンゴ酸塩、乳酸塩、アスパラギン酸塩、若しくはコハク酸塩の塩であり得る。好ましい実施形態では、緩衝剤は、グリシルグリシン又はグリシルグリシンの塩である。更に別の好ましい実施形態では、緩衝剤は酒石酸塩である。

30

【0028】

別の実施形態によれば、固体処方物は安定剤を含む。たとえば、安定剤は、プロリン、グリシン、バリン、イソロイシン、又はロイシンであり得る。好ましい一実施形態では、安定剤はプロリンである。さらに別の実施形態では、安定剤は、プロリン、グリシン、バリン、イソロイシン、又はロイシンのうちの 2 以上の組み合わせである。

【0029】

一実施形態によれば、BMP は BMP - 7 である。別の実施形態によれば、BMP は、BMP - 2、BMP - 4、BMP - 5、BMP - 6、又は BMP - 9 である。別の実施形態によれば、BMP は、GDF - 5、GDF - 6、又は GDF - 7 である。

【0030】

一実施形態では、BMP の緩衝剤に対する比は、約 $7.7 \times 10^{-4} : 1$ ~ 約 310 : 1 (w/w) である。たとえば、BMP のグリシルグリシン塩に対する比は、約 $7.7 \times 10^{-4} : 1$ ~ 約 310 : 1 (w/w) である。たとえば、BMP の酒石酸又は塩に対する比は、約 $6.7 \times 10^{-4} : 1$ ~ 約 270 : 1 である。

40

【0031】

別の実施形態では、液体又は固体形態処方物は、リオプロテクタントをさらに含む。一実施形態では、リオプロテクタントは糖である。たとえば、糖は、マンニトール、ラクトース、スクロース、若しくはトレハロース、又はこれらの糖の 2 以上の組み合わせであり得る。好ましい実施形態では、糖はトレハロースである。糖を約 1% ~ 約 15% (w/v) の量で、さらに好ましくは約 3% ~ 約 10% (w/v) で、液体形態の本発明の処方物

50

に添加することができる。好ましい実施形態では、糖は9% (w/v) を超えない。別の実施形態では、糖は、固体形態の処方物中、約 $1 : 7 \times 10^{-5}$ の約 $1 : 1.3$ (w/w) (糖 : BMP) の量で存在する。

【0032】

さらに別の実施形態では、液体又は固体形態処方物は、酸化防止剤をさらに含む。たとえば、酸化防止剤は、メチオニン、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m-クレゾール、又はチオグリセロールであり得る。好ましい酸化防止剤はメチオニンである。

【0033】

下記表1は、本発明にしたがって作製することができる種々のグリシルグリシン緩衝液の成分を示す。グリシルグリシン緩衝剤は、グリシルグリシン、グリシルグリシン-HCl、グリシルグリシン塩、又はそれらの組み合わせから構成される。処方物の成分、特にトレハロースの百分率を調節して、目標の容量オスモル濃度を得ることができる。

10

【0034】

【表1】

表1 グリシルグリシン処方物

成分	範囲	好ましい値	BMP : 成分比 (低)	BMP : 成分比 (高)
BMP	0.01~40 mg/mL	0.1~1 mg/mL 又は 1~20 mg/mL	N/A	N/A
グリシルグリシン*	1~100mM (0.13~13 mg/mL)	10mM (1.3 mg/mL)	7.7×10^{-4} (mg/mg)	308 (mg/mg)
トレハロース	3~14% (w/v) (30~140 mg/mL)	9% (w/v) (90 mg/mL)	7.1×10^{-5} (mg/mg)	1.3 (mg/mg)
メチオニン	0~100mM (0~15 mg/mL)	20mM, 3mg/mL	6.7×10^{-4} (mg/mg)	N/A (値は、 40/0mg /mgであり 得る)
ポリソルベート20	0~0.5% (w/v) (0~5 mg/mL)	0.01% (w/v)	0.02 (mg /mg)	N/A (値は、 40/0mg /mgであり 得る)
重量オスモル 濃度**	N/A	300±30 mOsm/kg	N/A	N/A

20

30

下記表2は、本発明にしたがって作製することができる種々の酒石酸塩緩衝液の成分を示す。処方物の成分、特にトレハロースの百分率を調節して、目標の重量オスモル濃度を得ることができる。

【0035】

【表 2】

表 2 酒石酸塩処方物

成分	範囲	好ましい値	BMP : 成分比 (低)	BMP : 成分比 (高)
BMP	0.01~40 mg/mL	0.1~1 mg/mL 又は 1~20 mg/mL	N/A	N/A
酒石酸*	1~100mM (0.15~15 mg/mL)	10mM (1.5 mg/mL)	6.7×10^{-4} (mg/mg)	267 (mg/mg)
トレハロース	3~14% (w/v) (30~140 mg/mL)	9% (w/v) (90 mg/mL)	7.1×10^{-5} (mg/mg)	1.3 (mg/mg)
メチオニン	0~100mM (0~15 mg/mL)	20mM、 3mg/mL	6.7×10^{-4} (mg/mg)	N/A
ポリソルベート20	0~0.5% (w/v) (0~5 mg/mL)	0.01% (w/v)	0.02 (mg/mg)	N/A
重量オスモル 濃度**	N/A	300±30 mOsm/kg	N/A	N/A

10

20

本発明の処方物の予想外の利点のうちの1つは、処方物が時間をわたってそれらの安定性を維持することである。たとえば、本発明による溶液処方物を40で6ヶ月間貯蔵する場合、pHは約0.2pH単位を超えて変化しない。

【0036】

骨形成タンパク質

BMPは、本発明の組成物の好ましい例示的タンパク質である。BMPは、TGF-スーパーファミリーに属する。TGF-スーパーファミリータンパク質は、6つの保存されたシステイン残基により特徴付けられるサイトカインである。ヒトゲノムは、TGF-スーパーファミリータンパク質をコード化する約42のオープンリーディングフレームを含む。TGF-スーパーファミリータンパク質は、配列類似性及びそれらが活性化特定のシグナリング経路に基づいて、BMPサブファミリー及びTGF-サブファミリーに少なくとも分類することができる。BMPサブファミリーには、これらに限定されるものではないが、BMP-2、BMP-3(オステオゲニン)、BMP-3b(GDF-10)、BMP-4(BMP-2b)、BMP-5、BMP-6、BMP-7(骨形成タンパク質-1又はOP-1)、BMP-8(OP-2)、BMP-8B(OP-3)、BMP-9(GDF-2)、BMP-10、BMP-11(GDF-11)、BMP-12(GDF-7)、BMP-13(GDF-6、CDMP-2)、BMP-15(GDF-9)、BMP-16、GDF-1、GDF-3、GDF-5(CDMP-1、MP-52)、及びGDF-8(ミオスタチン)が含まれる。本発明に関して、好ましいスーパーファミリータンパク質としては、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6及びBMP-7、並びにGDF-5、GDF-6、及びGDF-7、並びにMP-52が挙げられる。特に好ましいタンパク質としては、BMP-2、BMP-7並びにGDF-5、GDF-6、及びGDF-7が挙げられる。最も好ましい例示的BMPは、ヒトBMP-7である。さらに、ヒト集団の異なるメンバー間ではBMP配列において対立遺伝子変異があり、今までに見いだされ、特徴づけられたBMP間では種間変動がある。本明細書中で用いられる場合、「BMPサブファミリー」、「BMP」、「BMPリガンド」及びその文法的に同等の語句は、特に別段の記載がない限り、BMPサブファミリーのメンバーを指す。本明細書中で開示されるBMPサブファミリーのメンバーのいずれかは、本発明による処方物中に含まれ得る。

30

40

【0037】

50

TGF - サブファミリーには、これらに限定されるものではないが、TGF (たとえば、TGF - 1、TGF - 2、及びTGF - 3)、アクチビン(たとえば、アクチビンA)及びインヒビン、マクロファージ阻害サイトカイン - 1 (MIC - 1)、ミューラ - 阻害物質、抗ミューラ - ホルモン、及びグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) が含まれる。本明細書中で用いられる場合、「TGF - サブファミリー」、「TGF - 」、
「TGF - リガンド」及びそれらの文法的に同等の語句は、特に別段の記載がない限り、TGF - サブファミリーのメンバーを指す。

【0038】

次に、TGF - スーパーファミリーは、システインノットサイトカインスーパーファミリーのサブセットである。システインノットサイトカインスーパーファミリーの更なるメンバーとしては、これらに限定されるものではないが、血小板由来成長因子 (PDGF)、血管内皮成長因子 (VEGF)、胎盤成長因子 (PIGF)、ノギン、ニューロトロフィン (BDNF、NT3、NT4、及び NGF)、ゴナドトロピン、フォロトロピン、ルトロピン、インターロイキン - 17、及びコアグロゲンが挙げられる。

【0039】

これらの配列、並びにそれらの化学的及び物理的特性を開示する刊行物としては次のものが挙げられる：BMP - 7及びOP - 2 (米国特許第5,011,691号；米国特許第5,266,683号；Ozkaynak et al., EMBO J., 9, pp. 2085 - 2093 (1990)；OP - 3 (WO94/10203 (PCT/US93/10520))、BMP - 2、BMP - 4、(WO88/00205；Wo
zney et al. Science, 242, pp. 1528 - 1534 (1988))、BMP - 5及びBMP - 6、(Celeste et al., PNAS, 87, 9843 - 9847 (1990))、Vgr - 1 (Lyons et al., PNAS, 86, pp. 4554 - 4558 (1989))；DPP (P
adgett et al. Nature, 325, pp. 81 - 84 (1987))；Vg - 1 (Weeks, Cell, 51, pp. 861 - 867 (1987))；BMP - 9 (WO95/33830 (PCT/US95/07084))；BM
P - 10 (WO94/26893 (PCT/US94/05290))；BMP - 11 (WO94/26892 (PCT/US94/05288))；BMP - 12 (WO95/16
035 (PCT/US94/14030))；BMP - 13 (WO95/16035 (PC
T/US94/14030))；GDF - 1 (WO92/00382 (PCT/US91/
04096))及びLee et al. PNAS, 88, pp. 4250 - 42
54 (1991)；GDF - 8 (WO94/21681 (PCT/US94/03019))；GDF - 9 (WO94/15966 (PCT/US94/00685))；GDF - 1
0 (WO95/10539 (PCT/US94/11440))；GDF - 11 (WO96/
01845 (PCT/US95/08543))；BMP - 15 (WO96/36710
(PCT/US96/06540))；MP - 121 (WO96/01316 (PCT/E
P95/02552))；GDF - 5 (CDMP - 1、MP52) (WO94/15949
(PCT/US94/00657))及びWO96/14335 (PCT/US94/12
814)及びWO93/16099 (PCT/EP93/00350))；GDF - 6 (CDMP - 2、BMP13) (WO95/01801 (PCT/US94/07762))
及びWO96/14335及びWO95/10635 (PCT/US94/14030))；GDF - 7 (CDMP - 3、BMP12) (WO95/10802 (PCT/US9
4/07799))及びWO95/10635 (PCT/US94/14030))。前記刊行物は、参照することにより本明細書中に組み込まれる。

【0040】

本明細書中で用いられる場合、「TGF - スーパーファミリーメンバー」又は「TGF - スーパーファミリータンパク質」とは、形質転換成長因子 - (TGF -)スーパーファミリーのメンバーとして当業者等に公知のタンパク質を意味する。構造的に、そのようなタンパク質は、疎水性シグナル配列、数百のアミノ酸のN末端プロ領域、並びに

10

20

30

40

50

可変 N 末端領域と、保存された 6 又は 7 シス테인骨格を有する特徴的なシス테인モチーフを有する約 100 のアミノ酸を含む高度に保存された C 末端領域とを含む成熟ドメインを含む大きな前駆体ポリペプチド鎖として発現されるホモダイマー又はヘテロダイマーである。これらの構造的に関連するタンパク質は、種々の発生事象に關与することが確認されている。

【0041】

「形態形成タンパク質」という用語は、真の形態発生活性を有するタンパク質の TGF - スーパーファミリーに属するタンパク質を指す。例えば、そのようなタンパク質は、前駆細胞を誘導して増殖及び/又は局所環境キューに応じて、軟骨、骨、腱、靭帯、神経又は他の種類の分化組織の形成に至る分化経路における事象のカスケードを開始することができる。したがって、本発明で有用な形態形成タンパク質は、異なる環境において異なって挙動できる。ある実施形態では、本発明の形態形成タンパク質は、ホモダイマー種又はヘテロダイマー種であり得る。

10

【0042】

「骨形成タンパク質(OP)」という用語は、軟骨及び/又は骨を形成するように前駆細胞を誘導することもできる形態形成タンパク質を指す。骨は、膜性骨又は軟骨性骨であり得る。ほとんどの骨形成タンパク質は、BMPサブファミリーのメンバーであり、したがってBMPでもある。しかし、逆は真ではない可能性がある。本発明によれば、DNA配列相同性又はアミノ酸配列同一性により同定されるBMPは、機能的バイオアッセイにおいて骨形成タンパク質となる明らかな骨形成又は軟骨形成活性も有するはずである。適切なバイオアッセイは、当該技術分野で周知であり；特に有用なバイオアッセイは、異所性骨形成アッセイである（例えば、米国特許第5,011,691号；米国特許第5,266,683号を参照）。

20

【0043】

BMPは、長いプロドメイン、1以上の切断部位、及び成熟ドメインを含むプロタンパク質として天然に発現される。このプロタンパク質は次いで細胞機構によってプロセッシングされて、ダイマー成熟BMP分子を生成する。プロドメインは、BMPの正しいフォールディング及びプロセッシングを援助すると考えられる。さらに、全てではないが幾つかのBMPで、プロドメインは成熟ドメインを非共有結合することができ、シャペロン、並びに阻害剤として作用することができる（例えば、Thies et al. (2001) Growth Factors, 18:251-259）。

30

【0044】

構造的に、BMPは、ダイマーシス테인ノットタンパク質である。各BMPモノマーは、複数の分子内ジスルフィド結合を含む。さらなる分子間ジスルフィド結合は、ほとんどのBMPにおける二量体化を媒介する。BMPはホモダイマーを形成することができる。いくつかのBMPはヘテロダイマーを形成することができる。

【0045】

BMPシグナル伝達は、BMPダイマーが2つのI型及び2つのII型セリン/トレオニンキナーゼ受容体を結合する場合に開始される。I型受容体としては、これらに限定されるものではないが、ALK-1、ALK-2 (ActRIa又はActRIとも呼ばれる)、ALK-3 (BMPRIaとも呼ばれる)、及びALK-6 (BMPRIbとも呼ばれる)が挙げられる。II型受容体としては、これらに限定されるものではないが、ActRIIa (ActRIIとも呼ばれる)、ActRIIb、及びBMPRIIが挙げられる。ヒトゲノムは、7つのI型及び5つのII型受容体を含む受容体セリン/トレオニンキナーゼファミリーの12のメンバーを含み、これらは全てTGF - シグナリングに關与する (Manning et al., 2002、その開示は参照することによって本明細書中に組み込まれる)。BMP結合後、II型受容体はI型受容体をリン酸化し、I型受容体は転写因子のSmadファミリーのメンバーをリン酸化し、そしてSmadは核にトランスロケーションし、多くの遺伝子の発現を活性化する。

40

【0046】

50

BMPはまた、これらに限定されるものではないが、BAMBI (BMP及びアクチビン膜結合阻害剤)、BMPER (BMP結合内皮細胞前駆体由来の調節物質)、セルベルス、コルジン (cordin)、コルジン様、ダン (Dan)、ダンテ (Dante)、フォリスタチン、フォリスタチン関連タンパク質 (FSRP)、エクトジン (ectodin)、グレムリン (gremlin)、ノギン、ダン及びセルベルスに関連するタンパク質 (PRDC)、スクレロスチン、スクレロスチン様、及び子宮感作関連遺伝子 - 1 (USAG-1)をはじめとする阻害剤、可溶性受容体、及び囷 (decoy) 受容体とも相互作用する。さらに、BMPは、補助受容体と相互作用することができ、例えばBMP-2及びBMP-4は補助受容体DRAGON (Samad et al. (2005) J. Biol. Chem., 280:14122-14129)、並びに硫酸ヘパリン及びヘパリンなどの細胞外マトリックス成分を結合する (Irie et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 308: 858-865)。

【0047】

本明細書中で想定されるように、「BMP」という用語は、DNA相同性及びアミノ酸配列同一性に基づいて定義されるタンパク質のTGF-スーパーファミリーのBMPサブファミリーに属するタンパク質を指す。本発明によれば、タンパク質は、BMPサブファミリーを特徴づける保存されたC末端のシステインリッチなドメイン内の既知BMPサブファミリーメンバーと少なくとも50%のアミノ酸配列同一性を有する場合にBMPサブファミリーに属する。BMPサブファミリーのメンバーは、全体的に50%未満のDNA又はアミノ酸配列同一性を有し得る。本明細書中で用いられる場合、「BMP」という用語はさらに、天然に存在する骨形成タンパク質のアミノ酸配列変異体、ドメイン交換変異体、並びにトランケーション及び活性フラグメントであるタンパク質、並びにBMP-2/7; BMP-4/7; BMP-2/6; BMP-2/5; BMP-4/7; BMP-4/5; 及びBMP-4/6ヘテロダイマーなどの2つの異なるモノマーBMPペプチドから形成されるヘテロダイマータンパク質を指す。好適なBMP変異体及びヘテロダイマーには、US2006/0235204; WO07/087053; WO05/097825; WO00/020607; WO00/020591; WO00/020449; WO05/113585; WO95/016034及びWO93/009229で記載されているものが含まれる。

【0048】

一実施形態によれば、本発明による処方物において用いられるBMPは、対応する野生型BMPタンパク質配列と、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を維持し得る。

【0049】

一実施形態によれば、本発明による処方物で使用されるBMPは、対応する野生型BMPタンパク質配列のC末端領域の保存されたシステインドメインと少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を維持し得る。

【0050】

「対応する野生型タンパク質」により、修飾されたBMPの野生型バージョンを意味する。たとえば、修飾されたBMPが修飾されたBMP-7であるならば、対応する野生型BMPは野生型BMP-7である。

10

20

30

40

50

【0051】

2つのアミノ酸配列又は2つの核酸の同一性(%)を決定するために、最適比較目的で配列を整列させる(たとえば、第2アミノ酸又は核酸配列との最適アラインメントのために、第1アミノ酸又は核酸配列の配列中にギャップを導入することができる)。2つの配列間の同一性(%)は、配列が共有する同じ位置の数の関数である(すなわち、%相同性 = 同じ位置の数 / 位置の合計数 × 100)。2つの配列間の同一性(%)の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。2つの配列の比較のために用いられる数学的アルゴリズムの好ましい非限定的例は、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77で記載されているようにして変更された、Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLAST及びXBLASTプログラム中に組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラム、スコア = 100、ワード長 = 12で実施することができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラム、スコア = 50、ワード長 = 3で実施することができる。比較目的でギャップ付アラインメントを得るために、Gapped BLASTをAltschul et al., (1997) Nucleic Acids Research 25(17):3389-3402で記載されているようにして用いることができる。BLAST及びGapped BLASTプログラムを利用する場合、各プログラムのデフォルトパラメータ(たとえば、XBLAST及びNBLAST)を用いることができる。

【0052】

治療用途

固体形態の本発明のBMP処方物を、ヒトなどの哺乳動物患者中に移植して、種々の状態を治療することができる。本発明のBMP処方物を、固体、ゲル若しくはペースト形態で移植することができるか、又はゲル、ペースト若しくは液体形態で患者に注射することができる。

【0053】

本発明のBMP処方物は多種多様な状態を治療するために有用である。たとえば、BMPを含む処方物を用いて、外傷又は炎症性疾患に起因するかどうかにかかわらず、軟骨変性をはじめとする骨格の障害を治療することができる。たとえば、本発明の処方物によって治療可能な疾患としては、関節リウマチ(RA)及び変形性関節症(OA)、並びに全身性紅斑性狼瘡(SLE)及び強皮症などの自己免疫疾患が挙げられる。

【0054】

本発明のBMP処方物は、骨格の疾患又は傷害を治療するために有効に用いることができる。たとえば、処方物を用いて、開放骨折又は閉鎖骨折などの骨折を治療することができる。閉鎖骨折の治療に関して、処方物を好ましくは骨折部位で注射する。開放骨折、重大なサイズ欠陥又は持続性偽関節に関して、処方物を外科的移植により骨折部位で投与することができる。どちらの場合も、処方物を単独、或いは好適な担体、マトリックス又は足場、たとえば骨セメント、リン酸カルシウム材料、ゲル材料若しくはコラーゲンマトリックスとの組み合わせで投与することができる。好適な担体、マトリックス及び足場には、米国特許第6,919,308号;第6,949,251号;及び第7,041,641号で開示されているものが含まれる。

【0055】

好ましい実施形態では、本発明のBMP処方物を用いて、軟骨退化又は軟骨欠損の原因となる疾患又は傷害を治療することができる。たとえば、処方物を軟骨欠損部位、たとえば変性椎間板、又は腱、靭帯若しくは半月板をはじめとする他の線維軟骨組織に適用することができる。そのような方法は、米国特許第6,958,149号に記載されている。本発明の処方物はまた、公開されたPCT出願WO05/115438に記載されている

ように、関節軟骨、たとえば膝、肘、腰、又は肩を含む滑膜性の連結等の関節の内層（*lining*）の欠損又は変性を治療するために用いることもできる。この実施形態では、処方物を、好ましくは関節の滑膜腔中に注射する。別の実施形態では、本発明の処方物を用いて、関節における関節軟骨欠損部位、たとえば軟骨欠損又は骨軟骨欠損を治療する。そのような関節軟骨欠損は、変形性関節症若しくは関節リウマチなどの疾患経過の結果であり得るか、又は関節の傷害のためであり得る。この実施形態では、処方物を関節腔中に注射することができるか、又は外科的に移植することができる。たとえば、処方物を欠陥内に単独或いは1以上のさらなる活性剤、支持マトリックス若しくは足場、又は骨髄間質細胞と組み合わせる配置することができる。処方物を、場合によって好適な被膜、たとえば筋肉弁又は生体吸収性（*bioresorbable*）膜、たとえばコラーゲン膜で覆うことができる。

10

【0056】

当業者には理解されるように、治療組成物において記載される化合物の濃度は、これらに限定されるものではないが、投与される薬剤の投薬量及び投与経路をはじめとする多くの因子によって変わるであろう。投与される薬剤の好ましい投薬量はまた、これらに限定されるものではないが、疾患の種類及び程度、組織損失又は欠損、特定の患者の全体的な健康状態、選択された化合物の相対的な生物学的有効性、化合物の処方、処方物中の賦形剤の存在及び種類、並びに投与経路をはじめとする変数に依存する可能性が高い。本発明を個体に提供することができ、この場合、典型的な用量は、1日につき体重1kgあたり約10ng~約1gの範囲であり；好ましい用量範囲は、体重1kgあたり約0.1mg~100mgであり、さらに特に好ましい投薬量範囲は10~1000µg/用量である。特に好ましい実施形態では、10~1000µgのBMP-7の投与量を変形性関節症にかかった個体に投与する。

20

【0057】

さらに、後述するように、タンパク質処方物、好ましくは本発明のBMP処方物を用いて、非骨格組織の疾患又は傷害を治療することができる。本発明によってさらに想定されるように、BMPは哺乳動物における骨形態形成及び、骨又は骨軟骨とは異なる種々の組織の組織形態形成の発生カスケードを誘導することができる。この形態発生活性は、前駆細胞の増殖及び分化を誘導する能力、並びに骨、軟骨、非ミネラル化骨格又は結合組織、及び他の成体組織の形成をもたらす事象の進行を通して分化型表現型を支持し、維持する能力を含む。

30

【0058】

たとえば、代謝性骨疾患において骨量の損失を防止する及び/又は骨量を増加させるための治療をするためにBMPを用いることができる。骨形成タンパク質を用いた代謝性骨疾患における骨量の損失を防止する及び/又は骨量を増加させるための治療の一般的な方法は、米国特許第5,674,844号で開示され、その開示は参照することによって本明細書中に組み込まれる。本発明のBMPを、歯周組織再生のために使用することができる。骨形成タンパク質を用いた歯周組織再生のために一般的な方法は、米国特許第5,733,878号に開示され、その開示は、参照することによって本明細書中に組み込まれる。BMPを肝臓再生に用いることができる。骨形成タンパク質を用いた肝臓再生のための一般的な方法は、米国特許第5,849,686号に開示され、その開示は、参照することによって本明細書中に組み込まれる。BMPを慢性腎不全の治療に用いることができる。骨形成タンパク質を用いた慢性腎不全の治療のための一般的な方法は、米国特許第6,861,404号に開示され、その開示は、参照することによって本明細書中に組み込まれる。中枢神経系虚血又は外傷後の機能的回復を強化するために、BMPを用いることができる。骨形成タンパク質を用いて中枢神経系虚血又は外傷後の機能回復を強化するための一般的な方法は、米国特許第6,407,060号に開示され、その開示は、参照することによって本明細書中に組み込まれる。樹状突起成長を誘導するためにBMPを用いることができる。骨形成タンパク質を用いて樹状突起成長を誘導するための一般的な方法は、米国特許第6,949,505号で開示され、その開示は、参照することによって本明細書中に組

40

50

み込まれる。神経細胞接着を誘導するためにBMPを用いることができる。骨形成タンパク質を用いて神経細胞接着を誘導するための一般的な方法は、米国特許第6,800,603号で開示され、その開示は、参照することによって本明細書中に組み込まれる。パーキンソン病の治療及び予防のためにBMPを用いることができる。骨形成タンパク質を用いてパーキンソン病を治療及び予防するための一般的な方法は、米国特許第6,506,729号に開示され、その開示は、参照することによって本明細書中に組み込まれる。

【0059】

別の例として、BMPはまた、象牙質形成を誘導するためにも用いることができる。今日まで、歯髄組織の傷害に対する予測不可能な反応は、歯科学における基本的臨床問題である。さらに別の例として、BMPは、中枢神経系(CNS)修復に対して再生効果を誘導することができ、これはラット脳穿刺モデルを用いて評価することができる。

10

【実施例】

【0060】

実施例1 グリシルグリシン緩衝液及び酒石酸緩衝液は、BMPの増大する濃度でBMP処方物のpHを安定化させる。

【0061】

緩衝液が高濃縮BMP処方物で観察されるpHの増加を軽減する可能性を評価するために、例示的BMP、BMP-7を用いて6種類の緩衝液を試験した：酒石酸(pKa 2.98、4.34)、グリシルグリシン(pKa 3.14)、リンゴ酸(pKa 3.40)、乳酸(pKa 3.86)、アスパラギン酸(pKa 3.90)、及びコハク酸(pKa 4.21)。

20

【0062】

各緩衝液を10mMの濃度で調製し、必要に応じて1NのHCl又は1NのNaOHでpHを調節して、最終pH3.0を得た。各緩衝液はまた、9%のトレハロースを含んでいた。50mMの酢酸中BMP-7(1.6mg/mL)を10mg/mLまで濃縮し、次いで6種類の緩衝液のそれぞれに透析した。透析後、各緩衝液中のタンパク質濃度は15~16mg/mLであった。室温でのタンパク質の濃度及びpHを各緩衝液について測定した。その後、タンパク質溶液のそれぞれをそれらの各緩衝液で8mg/mL及び1mg/mLまで希釈した。室温でのpH及びタンパク質濃度を希釈濃度のそれぞれで測定した。BMP-7濃度の関数としてのpHの結果を図1に示す。

30

【0063】

図1に示されるように、リンゴ酸、乳酸、アスパラギン酸、及びコハク酸の緩衝液について、BMP-7の濃度が増加するにつれ、pHにおいて望ましくない増加が観察される。対照的に、酒石酸又はグリシルグリシンの緩衝液では、BMP-7の濃度が増加するにつれて有意な増加は観察されない。したがって、BMP-7を緩衝液に添加することに起因するpHの増加を軽減するために、酒石酸又はグリシルグリシンのいずれかを緩衝剤として用いることができる。

【0064】

実施例2 グリシルグリシン緩衝液及び酒石酸緩衝液は凝集を軽減することによって長時間にわたりBMP液体処方物に安定性を付与する

40

液体安定性研究を実施して、例示的BMPであるBMP-7と、10mMのグリシルグリシン(pH3.1)、10mMの酒石酸塩(pH3.1)、10mMの乳酸塩(pH3.5)、10mMの乳酸塩と10mMのNaCl(pH3.1)、及び10mMの乳酸塩と10mMのNaCl及び20mMのメチオニン(pH3.1)の緩衝液を使用し、BMP処方物中のタンパク質凝集を評価した。凝集をはじめとするタンパク質における変化を最小限に抑える処方物は、凍結乾燥製剤の改善された安定性及びコンシステンシーを提供する。BMP-7濃度は16mg/mLであった。処方物を加速された安定性条件下、40で4週間保持した。液体処方物におけるBMP-7の凝集率(%)をサイズ排除クロマトグラフィーにより測定し、結果を図2に示す。

【0065】

50

図2に示すように、pH 3.1でグリシルグリシン緩衝液を含む処方物は、4週間にわたって最低の凝集増加率を示し、このことは、グリシルグリシンが試験した他の緩衝液よりも高い安定性をBMP-7処方物に付与することを示す。

【0066】

実施例3 グリシルグリシン緩衝液及び酒石酸緩衝液は凝集を減少させることによって長時間にわたりBMP凍結乾燥処方物に安定性を付与する。

【0067】

凍結乾燥液体並びに凍結乾燥BMP及び緩衝液処方物の両方の加速された安定性試験を実施して、例示的BMPであるBMP-7を用い、10mMのグリシルグリシンHCl (pH 3.1)、10mMの酒石酸塩 (pH 3.1)、10mMの乳酸塩 (pH 3.1)、10mMの乳酸塩と10mMのNaCl (pH 3.1)、並びに10mMの乳酸塩と10mMのNaCl及び20mMのメチオニン (pH 3.1)の緩衝液を含む処方物中で、BMPの凝集を評価した。BMP-7濃度は、1mg/mL又は16mg/mLのいずれかであった。液体安定性研究用の処方物をバイアル中に分注し、そして40℃で2ヶ月間保持するか、又は凍結乾燥し、40℃で6ヶ月間保持した。

10

【0068】

図3Aに示すように、乳酸塩とメチオニン及びグリシルグリシンを含むBMP-7処方物は、6ヶ月、1mg/mLで、これらの処方緩衝液について最低の凝集率を有していた。図3Bで示すように、16mg/mLで、試験した全ての緩衝液についてタンパク質凝集において増加が観察された。最低の凝集は、酒石酸塩を含む処方物中で見られた。この実施例は、10mMの乳酸塩を含む処方物と比較して、10mMのグリシルグリシン、9%のトレハロースを含むBMP-7処方物、pH 3.0及び10mMの酒石酸塩、9%のトレハロースを含むBMP-7処方物、pH 3.0に関連して改善された安定性を示した。

20

【0069】

実施例4 グリシルグリシン及び酒石酸緩衝液処方物からのBMPは生物学的活性を有する。

【0070】

40℃で6ヶ月間保持されたBMP及びグリシルグリシン緩衝液又は酒石酸緩衝液の溶液からのBMPが、ラット骨肉腫細胞系ROS 17/2.8においてアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を誘導する能力を分析する。例示的BMPであるBMP-7を9ポイント用量反応において3連で試験する。特に、ROS 17/2.8細胞を96ウェル組織培養プレート中に蒔く。グリシルグリシン溶液又は酒石酸溶液からのBMPを以下の投薬量：6000、2000、666、222、74、24、8、2、及び0.9ng/mLで細胞に添加し、そして48時間インキュベートする。細胞をその後溶解させ、BMP-7がALP活性を誘導する効力を試料の平均光学密度 (OD) の非線形回帰から誘導されたEC50に基づいて評価する。グリシルグリシン溶液及び酒石酸溶液からの例示的BMPであるBMP-7はどちらも強力な生物学的活性を示す。

30

【0071】

実施例5 グリシルグリシン緩衝液を含むBMP処方物

BMP、例えばBMP-7を用いた透析、タンジェンシャルフロー濾過、又は限外濾過/ダイアフィルトレーション (UF/DF) プロセスにより緩衝液交換を実施することにより、本発明による処方物を調製する。10mLの透析緩衝液中100mgのBMP-7を300mLの10mMのグリシルグリシン緩衝液、9%のトレハロース、及び20mMのメチオニン (pH 3.0 ± 0.2) に対して透析する (透析緩衝液を3回替える)。500mLの10mMのグリシルグリシン-HCl溶液 (pH 2.6) を210mLの10mMのグリシルグリシン (pH 5.7) と混合することにより、グリシルグリシン緩衝液を調製する。BMP-7の結果としての濃度を、透析緩衝液を用いて1mg/mL (約100mL) に調節し、0.01%のポリソルベート20又は0.01%のポリソルベート80を添加する (最終pH 3.0 ± 0.2)。同様に、約10mL ~ 1000mLの透析

40

50

緩衝液中約 100 mg ~ 10 g の BMP - 7 を UF / DF により約 10 × 体積の 10 mM のグリシルグリシン緩衝液に対して交換する。トレハロース、メチオニン、及び / 又はポリソルベート 20 などのさらなる処方物の構成成分を所望の量まで添加する。処方緩衝液を用いて処方物を所望の濃度まで希釈し、最終処方物の pH は 3.0 ± 0.2 である。

【0072】

実施例 6 酒石酸緩衝液を含む BMP 処方物

BMP、例えば BMP - 7 を用いた透析又はタンジェンシャルフロー濾過により緩衝液交換を実施することによって、本発明による処方物を調製する。10 mL の透析緩衝液中 100 mg の BMP - 7 を 300 mL の 10 mM の酒石酸緩衝液、9 % のトレハロース、及び 20 mM のメチオニン (pH 3.0 ± 0.2) に対して透析する (透析緩衝液を 3 回交換する)。840 mL の 10 mM の酒石酸溶液を 310 mL の 10 mM の酒石酸カリウムナトリウム (pH 7.2) と混合することによって酒石酸緩衝液を調製する。透析緩衝液を用いて BMP の結果としての濃度を 1 mg / mL (約 100 mL) に調節し、0.01 % のポリソルベート 20 又は 0.01 % のポリソルベート 80 を最終 pH 3.0 ± 0.2 で添加する。同様に、約 10 mL ~ 1000 mL 中約 100 mg ~ 約 10 g の BMP - 7 を UF / DF により約 10 × 体積の 10 mM の酒石酸塩緩衝液に対して交換する。トレハロース、メチオニン、及び / 又はポリソルベート 20 などのさらなる処方物の構成成分を所望の量まで添加する。処方緩衝液を用いて処方物を所望の濃度まで希釈し、最終処方物の pH は 3.0 ± 0.2 である。

10

【0073】

実施例 7 酒石酸緩衝液及びトレハロースを含む BMP 処方物

本明細書中で示されるように、グリシルグリシン及び酒石酸塩は、BMP - 7 処方物の pH を乳酸塩よりも更に有効に制御し、製剤の処方において有利であり得る。グリシルグリシン及び酒石酸塩中の凍結乾燥された BMP - 7 の安定性を評価するために、長期凍結乾燥安定性研究を開始した。

20

【0074】

3 ロットの BMP - 7 を、10 mM の乳酸塩、9 % のトレハロース、pH 3.0 中；10 mM のグリシルグリシン、9 % のトレハロース、pH 3.0 中；又は 10 mM の酒石酸塩、9 % のトレハロース、pH 3.0 中のいずれかで 1 mg / mL にて処方した。全処方物の pH を 3.0 ± 0.2 以内に制御した。処方した製剤を凍結乾燥し、長期安定性研究を 5 又は 30 で開始した。3 ロットの安定性を 2、6、及び 9 ヶ月にわたって評価した。

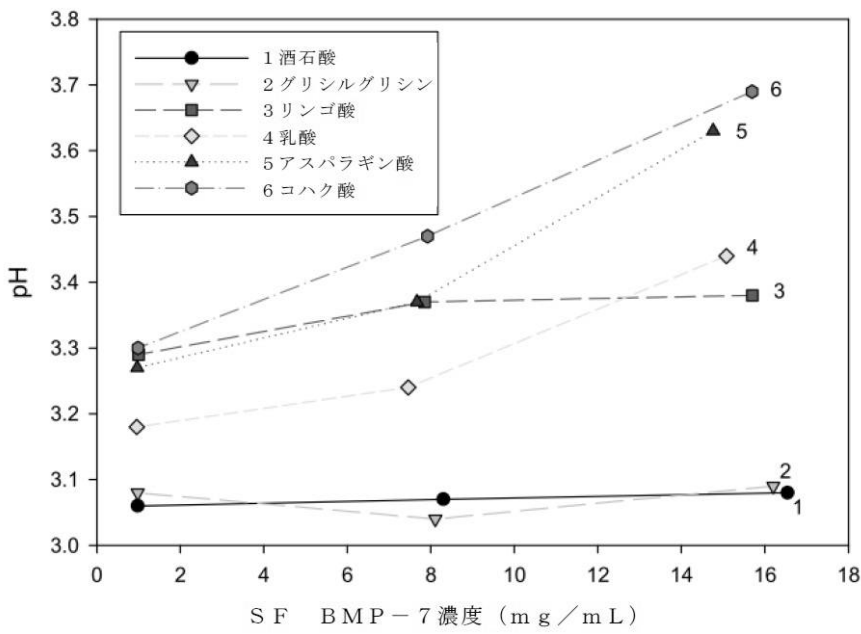
30

【0075】

乳酸塩を含む処方物における BMP - 7 凝集は、当初はグリシルグリシン又は酒石酸塩中よりも高かった。処方物のいずれについても 5 で凝集に関連する変化はなかった。30 で全ての処方物について凝集が増加し、最低の凝集は、グリシルグリシンを含む処方物について観察された (図 4 を参照)。結果は、10 mM のグリシルグリシン又は 10 mM の酒石酸塩を含む BMP - 7 処方物が、10 mM の乳酸塩での緩衝と比較して、凍結乾燥製剤の安定性を改善できることを示唆する。

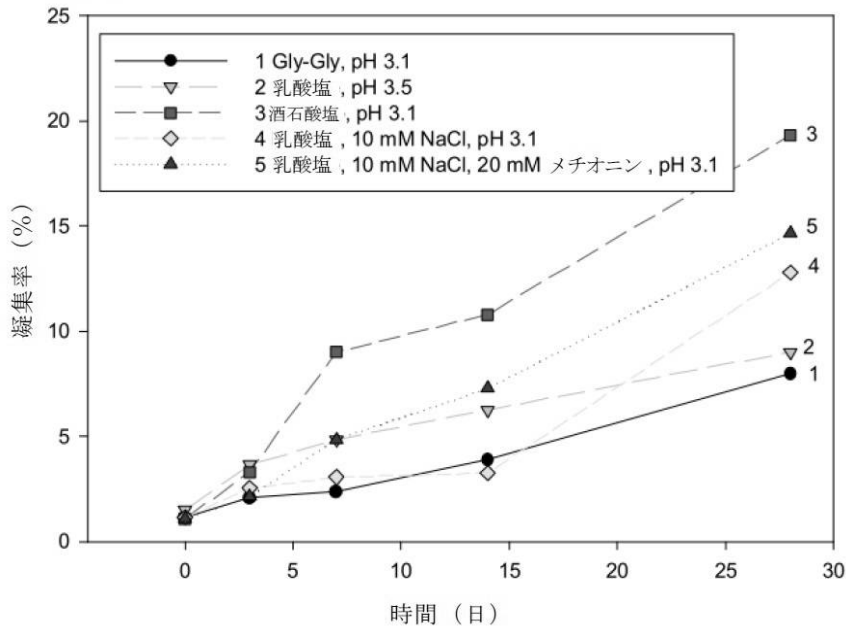
【 図 1 】

【 図 1 】



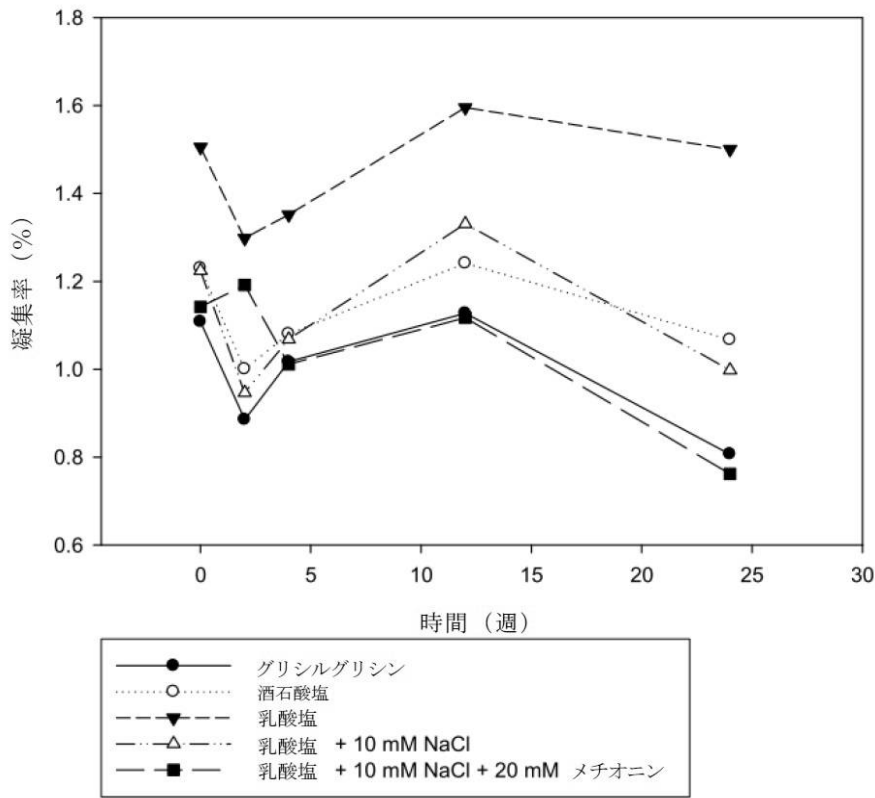
【 図 2 】

【 図 2 】



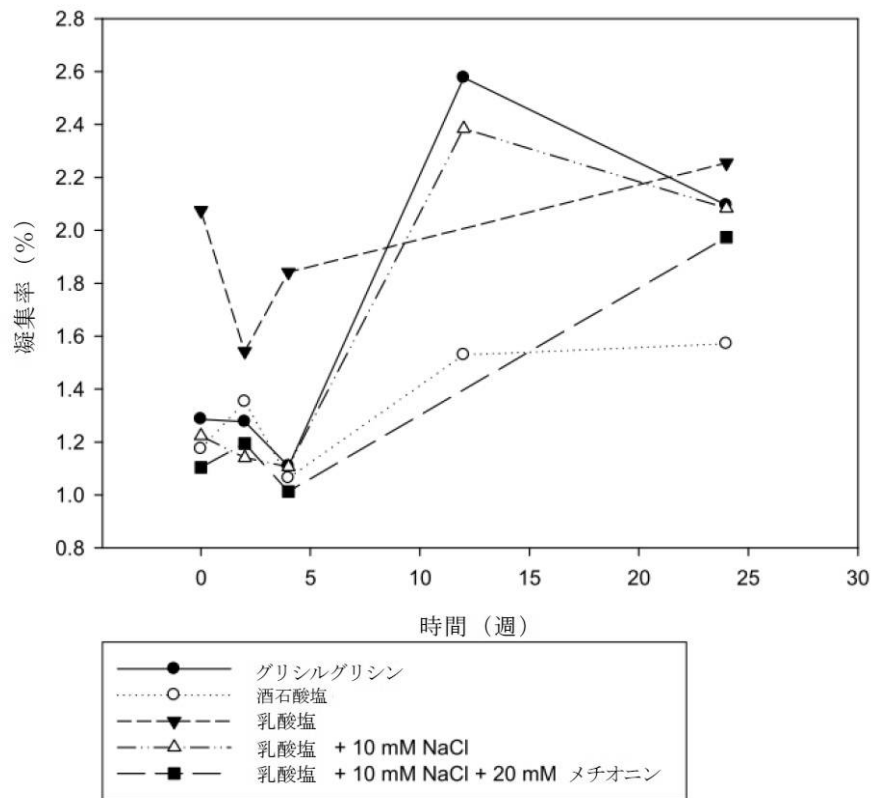
【 図 3 A 】

【 図 3 A 】



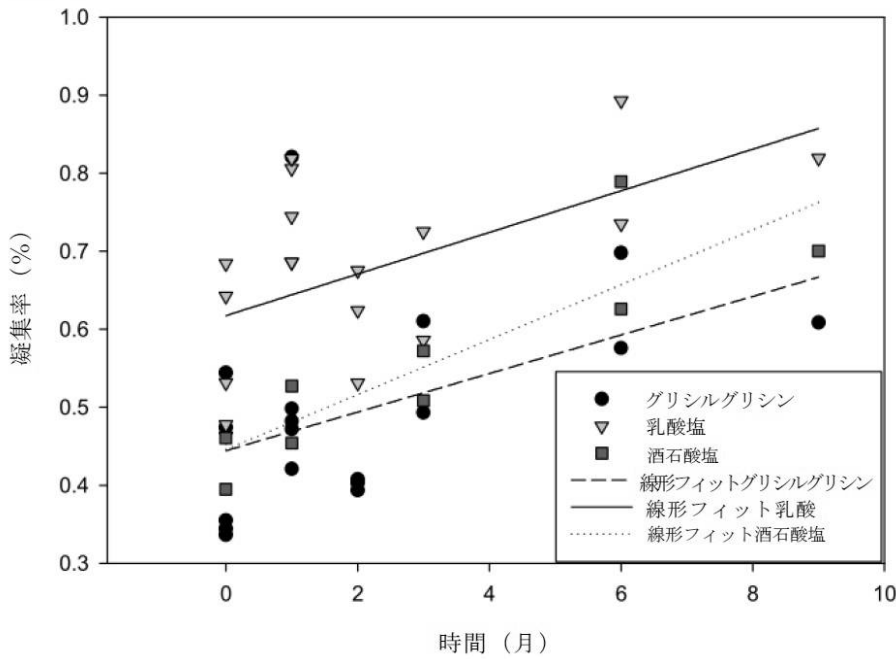
【 図 3 B 】

【 図 3 B 】



【 図 4 】

【 図 4 】



【 図 5 】

【 図 5 】

成熟ヒトBMP-7 (配列番号1):

```

      10      20      30      40
STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK

      50      60      70      80
HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAYYCEGE CAFPLNSYMN

      90      100     110     120
ATNHAIVQTL VHFINPETVP KPCCAPTQLN AISVLYFDDS

      130
SNVILKKYRN MVVRACGCH

```

【 図 6 】

【 図 6 】

成熟ヒトBMP-2 (配列番号2):

```

      10      20      30      40
QAKHKQRKRL KSSCKRHPLY  VDFSDVGWND WIVAPPGYHA

      50      60      70      80
FYCHGECPPF LADHLNSTNH  AIVQTLVNSV NSKIPKACCV

      90      100     110
PTELSAISML YLDENEKVVL  KNYQDMVVEG CGCR

```

【 図 7 】

【 図 7 】

成熟ヒトBMP-6 (配列番号3) :

```

      10          20          30          40          50
SASSRRRQQS  RNRSTQSQDV  ARVSSASDYN  SSELKTACRK  HELYVSFQDL

      60          70          80          90          100
GWQDWIIAPK  GYAANYCDGE  CSFPLNAHMN  ATNHAIVQTL  VHLMNPEYVP

      110         120         130
KPCCAPTKLN  AISVLYFDDN  SNVILKKYRN  MVVRACGCH

```

【 図 8 】

【 図 8 】

成熟ヒトBMP-4 (配列番号4) :

```

      10          20          30          40
SPKHHSQRAR  KKNKNCRRHS  LYVDFSDVGW  NDWIVAPPGY

      50          60          70          80
QAFYCHGDCP  FPLADHLNST  NHAIVQTLVN  SVNSSIPKAC

      90          100         110
CVPTELSAIS  MLYLDEYDKV  VLKNYQEMVV  EGCGR

```

【 図 9 】

【 図 9 】

成熟ヒトBMP-5 (配列番号5) :

```

      10          20          30          40          50
NQNRNKSSSH  QDSSRMSSVG  DYNTSEQKQA  CKKHELYVSF  RDLGWQDWII

      60          70          80          90          100
APEGYAAFYC  DGECSFPLNA  HMNATNHAIV  QTLVHLMFPD  HVPKPCCAPT

      110         120         130
KLNAISVLYF  DDSSNVILKK  YRNMVVRSCG  CH

```

【 図 10 】

【 図 10 】

成熟ヒトGDF-5 (配列番号6) :

```

      10          20          30          40
APLATRQGKR  PSKNLKARCS  RKALHVNFKD  MGWDDWIIAP

      50          60          70          80
LEYEAFHCEG  LCEFPLRSHL  EPTNHAVIQT  LMNSMDPEST

      90          100         110         120
PPTCCVPTRL  SPISILFIDS  ANNVVYKQYE  DMVVESCGCR

```

【 図 1 1 】

【 図 1 1 】

成熟ヒトGDF-6（配列番号7）：

```

      10          20          30          40          50
TAFASRHGKR  HGKKSRLRCS  KKPLHVNFKK  LGWDDWIIAP  LEYEAYHCEG

      60          70          80          90          100
VCDPFLRSHL  EPTNHAIQIT  LMNSMDPGST  PPSCCVPTKL  TPISILYIDA

      110         120
GNNVVYKQYE  DMVVEGCGCR

```

【 図 1 2 】

【 図 1 2 】

成熟ヒトGDF-7（配列番号8）：

```

      10          20          30          40          50
TALAGTRTSQ  GSGGGAGRGH  GRRGRSRCSR  KPLHVDFKEL  GWDDWIIAPL

      60          70          80          90          100
DYEAYHCEGL  CDFPLRSHLE  PTNHAIQITL  LNSMAPDAAP  ASCCVPARLS

      110         120
PISILYIDAA  NNVVYKQYED  MVVEACGCR

```

【 配列表 】

2013518808000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成24年5月16日(2012.5.16)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】0 0 1 4

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 0 0 1 4 】

固体組成物は、骨形成タンパク質及び酒石酸の溶液を凍結乾燥することによって調製することができる。一実施形態では、凍結乾燥組成物はマンニトールを含まない。

したがって、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目 1)

骨形成タンパク質及び水性グリシルグリシン緩衝液を含む溶液。

(項目 2)

上記骨形成タンパク質が、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、GDF-5、GDF-6及びGDF-7から選択される、項目1記載の溶液。

(項目 3)

上記溶液のpHが約2.5～約4.0である、項目1記載の溶液。

(項目 4)

上記溶液のpHが、約2.8～約3.5である、項目1記載の溶液。

(項目 5)

上記溶液のpHが、約2.8～約3.2である、項目1記載の溶液。

(項目 6)

上記緩衝液が、約1mM～約100mMのグリシルグリシン濃度を有する、項目1記載の溶液。

(項目 7)

上記緩衝液が、約2mM～約20mMのグリシルグリシン濃度を有する、項目1記載の

溶液。

(項目 8)

上記緩衝液が、約 5 m M ~ 約 1 5 m M のグリシルグリシン濃度を有する、項目 1 記載の溶液。

(項目 9)

上記緩衝液が、約 1 0 m M のグリシルグリシン濃度を有する、項目 1 記載の溶液。

(項目 1 0)

4 0 で 6 ヶ月間の貯蔵に際して、p H が約 0 . 2 p H 単位を超えて変化しない、項目 1 記載の溶液。

(項目 1 1)

4 0 で 3 6 ヶ月の貯蔵に際して、p H が約 0 . 2 p H 単位を超えて変化しない、項目 1 記載の溶液。

(項目 1 2)

上記骨形成タンパク質の濃度が約 1 m g / m L ~ 約 2 0 m g / m L である、項目 1 記載の溶液。

(項目 1 3)

上記タンパク質の濃度が約 0 . 1 m g / m L ~ 約 2 0 m g / m L である、項目 1 記載の溶液。

(項目 1 4)

上記タンパク質の濃度が約 0 . 1 m g / m L ~ 約 1 m g / m L である、項目 1 記載の溶液。

(項目 1 5)

上記タンパク質の濃度が約 0 . 1 m g / m L ~ 約 4 0 m g / m L である、項目 1 記載の溶液。

(項目 1 6)

リオプロテクタントをさらに含む、項目 1 記載の溶液。

(項目 1 7)

上記リオプロテクタントが糖である、項目 1 6 記載の溶液。

(項目 1 8)

上記リオプロテクタントが、マンニトール、ラクトース、スクロース及びトレハロース並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される、項目 1 6 記載の溶液。

(項目 1 9)

上記リオプロテクタントがトレハロースである、項目 1 8 記載の溶液。

(項目 2 0)

上記トレハロースが約 1 % ~ 約 1 5 % (w / v) の量で存在する、項目 1 9 記載の溶液。

(項目 2 1)

上記トレハロースが約 3 % ~ 約 9 % の量で存在する、項目 2 0 記載の溶液。

(項目 2 2)

酸化防止剤をさらに含む、項目 1 記載の溶液。

(項目 2 3)

上記酸化防止剤が、メチオニン、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m - クレゾール及びチオグリセロールからなる群から選択される、項目 2 2 記載の溶液。

(項目 2 4)

項目 1 記載の溶液を凍結乾燥するステップを含む方法により製造される固体組成物。

(項目 2 5)

(i) 骨形成タンパク質 ; 及び

(i i) グリシルグリシン、グリシルグリシン塩、又はそれらの組み合わせを含む、固体組成物。

(項目26)

上記グリシルグリシン塩がグリシルグリシンHClである、項目25記載の固体組成物。

(項目27)

リオプロテクタントをさらに含む、項目25記載の固体組成物。

(項目28)

上記リオプロテクタントが糖である、項目27記載の固体組成物。

(項目29)

上記リオプロテクタントが、マンニトール、ラクトース、スクロース、トレハロース、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、項目27記載の固体組成物。

(項目30)

上記リオプロテクタントがトレハロースである、項目29記載の固体組成物。

(項目31)

骨形成タンパク質のトレハロースに対する比が、約 7×10^{-5} : 1 ~ 約1.3 : 1 (w/w)である、項目30記載の固体組成物。

(項目32)

骨形成タンパク質のグリシルグリシン、グリシルグリシン塩、又はそれらの組み合わせに対する比が、約 8×10^{-4} : 1 ~ 約310 : 1 (w/w)である、項目25記載の固体組成物。

(項目33)

酸化防止剤をさらに含む、項目25記載の固体組成物。

(項目34)

上記酸化防止剤が、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m-クレゾール、チオグリセロール及びメチオニンからなる群から選択される、項目33記載の固体組成物。

(項目35)

骨形成タンパク質及び水性酒石酸緩衝液を含む溶液。

(項目36)

上記骨形成タンパク質が、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、GDF-5、GDF-6及びGDF-7から選択される、項目35記載の溶液。

(項目37)

上記溶液のpHが約2.5 ~ 約4.0である、項目35記載の溶液。

(項目38)

上記溶液のpHが約2.8 ~ 約3.5である、項目35記載の溶液。

(項目39)

上記溶液のpHが約2.8 ~ 約3.2である、項目35記載の溶液。

(項目40)

上記緩衝液が約1mM ~ 約100mMの酒石酸濃度を有する、項目35記載の溶液。

(項目41)

上記緩衝液が約2mM ~ 約20mMの酒石酸濃度を有する、項目35記載の溶液。

(項目42)

上記緩衝液が約5mM ~ 約15mMの酒石酸濃度を有する、項目35記載の溶液。

(項目43)

上記緩衝液が約10mMの酒石酸濃度を有する、項目35記載の溶液。

(項目44)

40で6ヶ月間の貯蔵に際して、pHが約0.2pH単位を超えて変化しない、項目35記載の溶液。

(項目45)

40で36ヶ月間の貯蔵に際して、pHが約0.2pH単位を超えて変化しない、項目35記載の溶液。

(項目46)

上記骨形成タンパク質の濃度が約0.01mg/mL～約40mg/mLである、項目35記載の溶液。

(項目47)

上記タンパク質の濃度が約1mg/mL～約20mg/mLである、項目35記載の溶液。

(項目48)

上記タンパク質の濃度が約0.1mg/mL～約1mg/mLである、項目35記載の溶液。

(項目49)

上記タンパク質の濃度が約0.1mg/mL～約20mg/mLである、項目35記載の溶液。

(項目50)

リオプロテクタントをさらに含む、項目35記載の溶液。

(項目51)

上記リオプロテクタントが糖である、項目50記載の溶液。

(項目52)

上記リオプロテクタントが、マンニトール、ラクトース、スクロース、トレハロース、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、項目51記載の溶液。

(項目53)

上記リオプロテクタントがトレハロースである、項目52記載の溶液。

(項目54)

上記トレハロースが約1%～約15%(w/v)の量で存在する、項目53記載の溶液。

(項目55)

上記トレハロースが約9%の量で存在する、項目54記載の溶液。

(項目56)

酸化防止剤をさらに含む、項目35記載の溶液。

(項目57)

上記酸化防止剤が、メチオニン、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m-クレゾール、及びチオグリセロールからなる群から選択される、項目56記載の溶液。

(項目58)

項目35記載の溶液を凍結乾燥するステップを含む方法により製造される固体組成物。

(項目59)

(i) 骨形成タンパク質；及び

(ii) 酒石酸、酒石酸塩又はそれらの組み合わせを含む、固体組成物。

(項目60)

リオプロテクタントをさらに含む、項目59記載の固体組成物。

(項目61)

上記リオプロテクタントが糖である、項目60記載の固体組成物。

(項目62)

上記リオプロテクタントが、マンニトール、ラクトース、スクロース、トレハロース、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、項目61記載の固体組成物。

(項目63)

上記リオプロテクタントがトレハロースである、項目62記載の固体組成物。

(項目64)

骨形成タンパク質のトレハロースに対する比が、約 $7 \times 10^{-5} : 1$ ～約1.3:1(w/w)である、項目63記載の固体組成物。

(項目65)

骨形成タンパク質の酒石酸、酒石酸塩、又はその組み合わせに対する比が、約 7×10^{-4} : 1 ~ 約 270 : 1 (w/w) である、項目64記載の固体組成物。

(項目66)

酸化防止剤を更に含む、項目59記載の固体組成物。

(項目67)

上記酸化防止剤が、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m-クレゾール、チオグリセロール及びメチオニンからなる群から選択される、項目66記載の固体組成物。

(項目68)

骨形成タンパク質、水性緩衝液、並びにプロリン、グリシン、バリン、イソロイシン、及びロイシンからなる群から選択される安定剤を含む溶液。

(項目69)

上記安定剤がプロリンを含む、項目68記載の溶液。

(項目70)

(i) 骨形成タンパク質；

(ii) グリシルグリシン塩又は酒石酸塩；及び

(iii) プロリン、グリシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリンの塩、グリシンの塩、バリンの塩、イソロイシンの塩、又はロイシンの塩からなる群から選択される化合物を含む、固体組成物。

(項目71)

上記化合物がプロリン又はプロリンの塩である、項目70記載の固体組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

骨形成タンパク質及び水性グリシルグリシン緩衝液を含む溶液。

【請求項2】

前記骨形成タンパク質が、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、GDF-5、GDF-6及びGDF-7から選択される、請求項1記載の溶液。

【請求項3】

前記溶液のpHが約2.5~約4.0である、請求項1記載の溶液。

【請求項4】

前記溶液のpHが、約2.8~約3.5である、請求項1記載の溶液。

【請求項5】

前記溶液のpHが、約2.8~約3.2である、請求項1記載の溶液。

【請求項6】

前記緩衝液が、約1mM~約100mMのグリシルグリシン濃度を有する、請求項1記載の溶液。

【請求項7】

前記緩衝液が、約2mM~約20mMのグリシルグリシン濃度を有する、請求項1記載の溶液。

【請求項8】

前記緩衝液が、約5mM~約15mMのグリシルグリシン濃度を有する、請求項1記載の溶液。

【請求項 9】

前記緩衝液が、約 10 mM のグリシルグリシン濃度を有する、請求項 1 記載の溶液。

【請求項 10】

40 で 6 ヶ月間の貯蔵に際して、pH が約 0.2 pH 単位を超えて変化しない、請求項 1 記載の溶液。

【請求項 11】

40 で 36 ヶ月の貯蔵に際して、pH が約 0.2 pH 単位を超えて変化しない、請求項 1 記載の溶液。

【請求項 12】

前記骨形成タンパク質の濃度が約 1 mg/mL ~ 約 20 mg/mL である、請求項 1 記載の溶液。

【請求項 13】

前記タンパク質の濃度が約 0.1 mg/mL ~ 約 20 mg/mL である、請求項 1 記載の溶液。

【請求項 14】

前記タンパク質の濃度が約 0.1 mg/mL ~ 約 1 mg/mL である、請求項 1 記載の溶液。

【請求項 15】

前記タンパク質の濃度が約 0.1 mg/mL ~ 約 40 mg/mL である、請求項 1 記載の溶液。

【請求項 16】

リオプロテクタントをさらに含む、請求項 1 記載の溶液。

【請求項 17】

前記リオプロテクタントが糖である、請求項 16 記載の溶液。

【請求項 18】

前記リオプロテクタントが、マンニトール、ラクトース、スクロース及びトレハロース並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 16 記載の溶液。

【請求項 19】

前記リオプロテクタントがトレハロースである、請求項 18 記載の溶液。

【請求項 20】

前記トレハロースが約 1% ~ 約 15% (w/v) の量で存在する、請求項 19 記載の溶液。

【請求項 21】

前記トレハロースが約 3% ~ 約 9% の量で存在する、請求項 20 記載の溶液。

【請求項 22】

酸化防止剤をさらに含む、請求項 1 記載の溶液。

【請求項 23】

前記酸化防止剤が、メチオニン、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m-クレゾール及びチオグリセロールからなる群から選択される、請求項 22 記載の溶液。

【請求項 24】

請求項 1 記載の溶液を凍結乾燥するステップを含む方法により製造される固体組成物。

【請求項 25】

(i) 骨形成タンパク質；及び
(ii) グリシルグリシン、グリシルグリシン塩、又はそれらの組み合わせを含む、固体組成物。

【請求項 26】

前記グリシルグリシン塩がグリシルグリシン HCl である、請求項 25 記載の固体組成物。

【請求項 27】

リオプロテクタントをさらに含む、請求項 25 記載の固体組成物。

【請求項 28】

前記リオプロテクタントが糖である、請求項 27 記載の固体組成物。

【請求項 29】

前記リオプロテクタントが、マンニトール、ラクトース、スクロース、トレハロース、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 27 記載の固体組成物。

【請求項 30】

前記リオプロテクタントがトレハロースである、請求項 29 記載の固体組成物。

【請求項 31】

骨形成タンパク質のトレハロースに対する比が、約 $7 \times 10^{-5} : 1 \sim$ 約 $1.3 : 1$ (w/w) である、請求項 30 記載の固体組成物。

【請求項 32】

骨形成タンパク質のグリシルグリシン、グリシルグリシン塩、又はそれらの組み合わせに対する比が、約 $8 \times 10^{-4} : 1 \sim$ 約 $310 : 1$ (w/w) である、請求項 25 記載の固体組成物。

【請求項 33】

酸化防止剤をさらに含む、請求項 25 記載の固体組成物。

【請求項 34】

前記酸化防止剤が、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m-クレゾール、チオグリセロール及びメチオニンからなる群から選択される、請求項 33 記載の固体組成物。

【請求項 35】

骨形成タンパク質及び水性酒石酸緩衝液を含む溶液。

【請求項 36】

前記骨形成タンパク質が、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、GDF-5、GDF-6 及び GDF-7 から選択される、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 37】

前記溶液の pH が約 2.5 ~ 約 4.0 である、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 38】

前記溶液の pH が約 2.8 ~ 約 3.5 である、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 39】

前記溶液の pH が約 2.8 ~ 約 3.2 である、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 40】

前記緩衝液が約 1 mM ~ 約 100 mM の酒石酸濃度を有する、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 41】

前記緩衝液が約 2 mM ~ 約 20 mM の酒石酸濃度を有する、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 42】

前記緩衝液が約 5 mM ~ 約 15 mM の酒石酸濃度を有する、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 43】

前記緩衝液が約 10 mM の酒石酸濃度を有する、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 44】

40 で 6 ヶ月間の貯蔵に際して、pH が約 0.2 pH 単位を超えて変化しない、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 45】

40 で 36 ヶ月間の貯蔵に際して、pH が約 0.2 pH 単位を超えて変化しない、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 46】

前記骨形成タンパク質の濃度が約 $0.01 \text{ mg/mL} \sim$ 約 40 mg/mL である、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 47】

前記タンパク質の濃度が約 1 mg/mL ~ 約 20 mg/mL である、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 48】

前記タンパク質の濃度が約 0.1 mg/mL ~ 約 1 mg/mL である、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 49】

前記タンパク質の濃度が約 0.1 mg/mL ~ 約 20 mg/mL である、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 50】

リオプロテクタントをさらに含む、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 51】

前記リオプロテクタントが糖である、請求項 50 記載の溶液。

【請求項 52】

前記リオプロテクタントが、マンニトール、ラクトース、スクロース、トレハロース、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 51 記載の溶液。

【請求項 53】

前記リオプロテクタントがトレハロースである、請求項 52 記載の溶液。

【請求項 54】

前記トレハロースが約 1% ~ 約 15% (w/v) の量で存在する、請求項 53 記載の溶液。

【請求項 55】

前記トレハロースが約 9% の量で存在する、請求項 54 記載の溶液。

【請求項 56】

酸化防止剤をさらに含む、請求項 35 記載の溶液。

【請求項 57】

前記酸化防止剤が、メチオニン、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、 m -クレゾール、及びチオグリセロールからなる群から選択される、請求項 56 記載の溶液。

【請求項 58】

請求項 35 記載の溶液を凍結乾燥するステップを含む方法により製造される固体組成物。

【請求項 59】

(i) 骨形成タンパク質；及び

(ii) 酒石酸、酒石酸塩又はそれらの組み合わせ

を含む、固体組成物。

【請求項 60】

リオプロテクタントをさらに含む、請求項 59 記載の固体組成物。

【請求項 61】

前記リオプロテクタントが糖である、請求項 60 記載の固体組成物。

【請求項 62】

前記リオプロテクタントが、マンニトール、ラクトース、スクロース、トレハロース、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 61 記載の固体組成物。

【請求項 63】

前記リオプロテクタントがトレハロースである、請求項 62 記載の固体組成物。

【請求項 64】

骨形成タンパク質のトレハロースに対する比が、約 $7 \times 10^{-5} : 1$ ~ 約 $1.3 : 1$ (w/w) である、請求項 63 記載の固体組成物。

【請求項 65】

骨形成タンパク質の酒石酸、酒石酸塩、又はその組み合わせに対する比が、約 $7 \times 10^{-4} : 1$ ~ 約 $270 : 1$ (w/w) である、請求項 64 記載の固体組成物。

【請求項 6 6】

酸化防止剤を更に含む、請求項 5 9 記載の固体組成物。

【請求項 6 7】

前記酸化防止剤が、アスコルビン酸、ベンジルアルコール、グルタチオン、m - クレゾール、チオグリセロール及びメチオニンからなる群から選択される、請求項 6 6 記載の固体組成物。

【請求項 6 8】

(i) 骨形成タンパク質；

(i i) グリシルグリシン塩又は酒石酸塩；及び

(i i) プロリン、グリシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリンの塩、グリシンの塩、バリンの塩、イソロイシンの塩、又はロイシンの塩からなる群から選択される化合物

を含む、固体組成物。

【請求項 6 9】

前記化合物がプロリン又はプロリンの塩である、請求項 6 8 記載の固体組成物。

【手続補正書】

【提出日】平成25年1月23日(2013.1.23)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2013518808000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 international application No
 PCT/US2010/049229

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/435 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MURAKAMI NARUMICHI ET AL: "Repair of segmental defects in rabbit humeri with titanium fiber mesh cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and a synthetic polymer", JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, vol. 62, no. 2, November 2002 (2002-11), pages 169-174, XP9141410, ISSN: 0021-9304	68,69
A		1-67,70,71
A	WO 01/78687 A1 (PEPTRON INC [KR]; LEE HEE YONG [KR]; LEE HYE SUK [KR]; KIM JUNG SOO [K]) 25 October 2001 (2001-10-25) whole document and in particular claims 12 and 15	1-71
	----- -/-- -----	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 November 2010		Date of mailing of the international search report 01/12/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ury, Alain

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/049229

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 374 905 A1 (ETHICON INC [US]) 2 January 2004 (2004-01-02) whole document and in particular claims 3 and 8 -----	1-71
A	EP 1 348 450 A2 (ETHICON INC [US]) 1 October 2003 (2003-10-01) whole document and in particular claims 3, 8 and 17 -----	1-71
A	WO 00/23123 A1 (SYNTHES AG [CH]; SYNTHES USA [US]; GOGOLEWSKI SYLWESTER [CH]) 27 April 2000 (2000-04-27) whole document and in particular claims 3 and 11 -----	1-71
A	SCHWENDEMAN S: "recent advances in the stabilization of proteins encapsulated in injectable PLGA delivery systems", CRITICAL REVIEWS IN THERAPEUTIC DRUG CARRIER SYSTEMS, BEGELL HOUSE PUBLISHING INC, US, vol. 19, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 73-98, XP008108131, ISSN: 0743-4863 the whole document -----	1-71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/049229

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0178687	A1	25-10-2001	AU 4477001 A	30-10-2001
			EP 1187602 A1	20-03-2002
			US 2003026844 A1	06-02-2003
EP 1374905	A1	02-01-2004	AU 2003204723 A1	15-01-2004
			CA 2433244 A1	25-12-2003
			CN 1481781 A	17-03-2004
			DE 60313533 T2	10-01-2008
			ES 2286388 T3	01-12-2007
			KR 20040002677 A	07-01-2004
			US 2003236310 A1	25-12-2003
			EP 1348450	A2
			CA 2423990 A1	29-09-2003
			CN 1494924 A	12-05-2004
			US 2003185871 A1	02-10-2003
WO 0023123	A1	27-04-2000	AT 229350 T	15-12-2002
			AU 746591 B2	02-05-2002
			AU 1154599 A	08-05-2000
			CA 2346651 A1	27-04-2000
			DE 69810165 D1	23-01-2003
			DE 69810165 T2	17-07-2003
			DK 1123081 T3	24-03-2003
			EP 1123081 A1	16-08-2001
			ES 2185227 T3	16-04-2003
			HK 1039074 A1	07-03-2003
			JP 2002527208 T	27-08-2002
			US 6461632 B1	08-10-2002
			ZA 9906601 A	23-10-2000

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K	47/10 (2006.01)	A 6 1 K	47/10
A 6 1 K	47/18 (2006.01)	A 6 1 K	47/18
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/22
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/26
A 6 1 K	47/20 (2006.01)	A 6 1 K	47/20
A 6 1 K	47/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/12
A 6 1 P	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/00
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ハイル, デイビッド

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 5 8 1, ウェストボロー, ウォーカー ストリート
2 1

(72) 発明者 ストロマイヤー, グレグ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 0, ニュートン, ヘーリック ロード 6 5

Fターム(参考) 4C076 AA09 AA12 AA30 BB32 CC09 DD37 DD43 DD51 DD55 DD59

DD60 DD67 EE41 FF63

4C084 AA03 BA01 BA21 DB60 MA17 MA28 MA43 MA67 NA03 ZA96

ZB08

4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA34 GA45