



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 38/58, 47/12, 47/26, 9/14</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/31386</p> <p>(43) 国際公開日 1998年7月23日(23.07.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00178</p> <p>(22) 国際出願日 1998年1月19日(19.01.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/20957 1997年1月20日(20.01.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ジャパンエナジー (JAPAN ENERGY CORPORATION)[JP/JP] 〒105 東京都港区虎ノ門2丁目10番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 古屋英之(FURUYA, Hideyuki)[JP/JP] 〒335 埼玉県戸田市新曽南3丁目17番35号 株式会社 ジャパンエナジー内 Saitama, (JP) 森田博之(MORITA, Hiroyuki)[JP/JP] 〒105 東京都港区虎ノ門2丁目10番1号 株式会社 ジャパンエナジー内 Tokyo, (JP) 高津幸孝(TAKATSU, Yukitaka)[JP/JP] 〒105 東京都港区芝大門1丁目16番3号 株式会社 エヌ・ケー・キューレックス内 Tokyo, (JP)</p>	<p>道渕浩世(MICHIBUCHI, Kose)[JP/JP] 〒520-02 滋賀県大津市本堅田3丁目31番25号 Shiga, (JP)</p> <p>谷川 誠(TANIGAWA, Makoto)[JP/JP] 〒520-02 滋賀県大津市堅田2丁目1番 Shiga, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, KR, NO, NZ, RU, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title: <b>METHOD FOR STABILIZING PEPTIDES AND FREEZE-DRIED MEDICINAL COMPOSITIONS CONTAINING PEPTIDES OBTAINED BY USING THE METHOD</b></p>		
<p>(54) 発明の名称 ペプチドの安定化方法および当該方法を用いたペプチド含有凍結乾燥医薬組成物</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>A method for elevating the stability of peptides containing the sequence -Asp-Gly- or -Asn-Gly- by preventing these sequences from changing into succinimide compounds or <math>\beta</math>-transition compounds with the passage of time; and freeze-dried medicinal compositions containing hirudin, having excellent stability, and obtained by using the above method. The method comprises adding an organic acid to the solution of the above peptide to regulate the pH value of the solution to 5 to 6.5 followed by freeze-drying. As the peptide, use may be made of disulfite hirudin, hirudin variants, etc. It is also possible to add sucrose, mannitol, etc., together with the organic acid.</p>		

(57) 要約

経時的に、-Asp-Gly-または-Asn-Gly-配列のスクシンイミド体またはβ転移体への変化を抑制することによって、この種の配列を含むペプチドの安定性を増大させるペプチドの安定化方法及びこの方法を利用した安定性に優れたヒルジン含有凍結乾燥医薬組成物を提供することを目的とする。

前記ペプチドの溶液に、有機酸を添加し、pH 5～6.5に調整した後、凍結乾燥することからなるペプチドの安定化方法。この方法を用いて得られる凍結乾燥医薬組成物。

ペプチドには、ディスルファトヒルジン、ヒルジン変異体等が用いられる、有機酸とともに白糖、マンニトール等を添加してもよい。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	TD	チャド
AC	オーストラリア	GB	英国	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GG	グジー	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GN	ギニア	MK	マケドニア	TR	トルコ
BE	ベルギー	GW	ギニア・ビサウ		マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BJ	ベナン	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	US	米国
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ベトナム
CA	カナダ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VU	ヴニエラ
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	NL	オランダ	VU	ヴニエラ
CG	コンゴ共和国	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CH	スイス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CI	コートジボアール	KG	キルギス	PL	ポーランド		
CM	カメルーン	KR	韓国	PT	ポルトガル		
CN	中国	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア		
CY	キプロス	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
CZ	チェコ	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
DE	ドイツ	LK	スリランカ	SI	スロベニア		
DK	デンマーク	LR	リベリア	SK	スロバキア		
EE	エストニア	LS	レソト	SL	シエラレオネ		
ES	スペイン						

## 明細書

ペプチドの安定化方法および当該方法を用いたペプチド含有凍結乾燥医薬組成物

### 技術分野

本発明は、そのアミノ酸配列中に、-Asp-Gly-または-Asn-Gly-配列を有し、当該-Asp-Gly-または-Asn-Gly-配列が、脱水反応または脱アミド化反応によりスクシンイミド体に変化し、さらに異性化反応により $\beta$ -転移体に変化するペプチド、特にヒスチジン又はヒスチジン変異体について、その変化を抑制するためのペプチドの安定化方法に関する。

また、本発明は、当該安定化方法を利用し前記変化が抑制されたペプチド含有凍結乾燥医薬組成物に関する。

### 背景技術

ヒルジンは、薬用ヒル（*Hirudo medicinalis*）の唾液線から分泌される抗血液凝固因子で、抗トロンビン作用が認められるため、ヒルジンはその変異体ともども、抗血液凝固用医薬品として開発されている。

これらのヒルジン或いはヒルジン変異体のほとんどは、-Asp-Gly-または-Asn-Gly-配列を含んでおり、時間の経過とともに、当該配列部分でスクシンイミド体に変化し、さらに $\beta$ -転移体に変化する。このため、生産ラインで十分に精製しても、保管中に、このスクシンイミド体または $\beta$ -転移体が生じ、純度が低下する。このスクシンイミド体または $\beta$ -転移体自体も抗トロンビン活性を有し（特開平5-310788号公報参照）、この変化によって生じる純度低下は、一般的には特には問題とはならないが、医薬品としてみた場合、好ましいものではなかった。そこで、ヒルジンの安定性を増加させることを課題として種々の試みがなされている。

例えば、ヒルジンの安定性を増すため、ヒルジンに、カルシウム及び／又はマグネシウムの水溶性塩を添加する方法（特開平7-267877号



ド溶液中に、前記有機酸に加えて1～500モルの白糖、さらに必要に応じて10～1000モルのマンニトールをディスルファトヒルジン又はヒルジン変異体1モルに対して添加したものである。

### 図面の簡単な説明

図1は、実験例6における40℃のインキュベーター内で3ヶ月間保存された凍結乾燥サンプルの液体クロマトグラフィーによるクロマトグラムを示す。図中の番号は処方番号である。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明の方法は、ペプチド中に-Asp-Gly-または-Asn-Gly-からなるアミノ酸配列を含み、当該配列が、経時的に、上記一般式(1)または(2)で表されるスクシンイミド体または $\beta$ -転移体へ変化するのを抑制できるものである。従って、Asp-GlyまたはAsn-Gly配列を有するペプチドであれば、全て本発明を適用することが可能であるが、特に、ディスルファトヒルジンHV-1(特開昭60-136597号公報参照)、HV-2

[Harvey et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 83 1084(1986)]、または配列番号1で表されるヒルジン変異体HV1C3(特開平4-173798号公報参照)、ヒト成長ホルモンあるいはリゾチーム等、なかでも特に、ヒルジン変異体HV1C3(配列表配列番号1)に好適である。また、前記のディスルファトヒルジンHV-1あるいはヒルジン変異体HV1C3を基に、そのアミノ酸配列に更に改変が加えられ、且つ-Asp-Gly-または-Asn-Gly-の配列は保持している種々のヒルジン変異体、例えば、欧州特許公開公報EP0625580A1に記載される、rHV-1-9(配列表配列番号2)、rHV-1-10(配列表配列番号3)、rHV-1-14(配列表配列番号4)、rHV-1-15(配列表配列番号5)、rHV-1-16(配列表配列番号6)、あるいは、国際公開公報WO92/15610に記載される、HV-17(配列表配列番号7)に対しても、同様に好適に適用できる。

本発明においては、先ず、上記ペプチドを、最終濃度において0.1～500 mMの濃度になるように、水に溶解し、これに、有機酸と必要に応じて水酸化ナトリウム等のアルカリ水溶液を加えて、pH 5～6.5に調整する。この場合の有機酸としては、医薬品添加物として許容される種々のカルボン酸類、例えば、一塩基酸である、酢酸、乳酸、二塩基酸あるいは三塩基酸である、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸等を用いることができる。特に、二塩基酸あるいは三塩基酸である、酒石酸、クエン酸等、あるいは、一塩基酸である、酢酸等が、ペプチドの安定性の向上効果に優れているために好ましい。より一般的には、当該カルボン酸の $\alpha$ 位炭素上に水酸基が置換した構造を内在するもの、即ち、 $C-CH(OH)-COOH$ の部分構造を有する鎖状のカルボン酸、特に、二塩基酸又は三塩基酸がより好ましい。尚、このペプチド溶液のpHが5未満、または6.5を越えた状態で凍結乾燥を行うと安定性が著しく損なわれる。

尚、上記ペプチドがディスルファトヒルジン又はヒルジン変異体の場合、上記pH 5～6.5の範囲に調整するためには、これらのヒルジン1 mMに対して5～100 mMの有機酸と必要により適量のアルカリ水溶液を加えるのが好ましく、これを凍結乾燥することにより、ヒルジン含有凍結乾燥医薬組成物とすることができる。また、この場合、有機酸のみを添加した状態で凍結乾燥したものは、綿状でふわふわした状態となり、製造および投与時の操作が煩雑となるため、有機酸とともに、賦形剤としてヒルジン1 mMに対して、1～500 mMの白糖、さらには、ヒルジン1 mMに対して、10～1000 mMのマニトールを加えることがより好ましい。この有機酸添加によるpHの調整、白糖の添加およびマニトールの添加は、特に順序は問わず、何れを先に添加しても良く、また同時に行っても良い。

上記のようにして調製されたペプチド溶液は等張性であることが好ましく、これを汎用の方法により凍結乾燥させる。この凍結乾燥生成物は、再溶解することにより、投与剤として直ちに使用することができる。

次に実験例を示して本発明の特徴を具体的に説明する。

なお、以下に述べる各実験例において、それぞれ医薬組成物に添加せしめる成分の含有量は、当該凍結乾燥医薬組成物の調製に用いるペプチド溶液、即ち、凍結乾燥を施す溶液中における濃度（最終濃度）により表記する。また、pH に関しても、凍結乾燥を施す溶液中における pH を意味する。

（実験例 1）

配列表配列番号 1 で示したアミノ酸配列を有するヒルジン変異体 H V 1 C 3 を 6 mg/ml (0.86 mM)、グリシンを 6.7 mg/ml (89 mM)、マンニトールを 33.5 mg/ml (184 mM) の濃度になるように精製水に溶解した。この溶液を 6 分割し、それぞれ 30 mM の酒石酸、リン酸、トリス緩衝液を用い、表 1 に示した pH に調整し、ペプチド溶液とした。これらの pH 調整後の液および無調整の液を 0.22  $\mu$ m のメンブランフィルターによりろ過し、ろ液を 6 ml ヴァイアルに 1 ml ずつ入れ、各 pH 毎に 50 本、合計 350 本を凍結乾燥した。

上記凍結乾燥サンプルを、50 °C のインキュベータ内で保存し、それぞれ、1、2、4、6、8 週間目に取り出し、1 ヴァイアルに 1 ml の精製水を加え、さらに 50 倍に希釈した液につき、表 2 の条件の液体クロマトグラフィーにより、ヒルジン変異体 H V 1 C 3 のピーク面積百分率を測定し、インキュベータ内で保存する前の当初の凍結乾燥サンプル中のヒルジン変異体 H V 1 C 3 に対する残存百分率として求め、その結果を表 1 に示した。

表 1

調整 pH	pH 調整剤	残 存 百 分 率 (%)				
		1 週目	2 週目	4 週目	6 週目	8 週目
4.5	酒石酸	98.0	97.7	95.4	94.7	93.4
5.5	酒石酸	98.6	98.7	97.5	96.5	97.0
6.0	リン酸	98.4	96.4	95.1	94.5	93.6
7.0	リン酸	99.0	97.3	93.3	92.7	90.0
7.0	トリス 緩衝液	95.7	92.0	86.8	72.0	70.3
8.0	トリス 緩衝液	81.9	58.0	—	—	—

表 2

検 出 器：紫外分光光度計
カ ラ ム：YMC Protein-RP (内径 7.5 mm、長さ 25 cm)
カラム温度：30℃
移 動 相：A トリフルオロ酢酸水溶液 (0.2 vol%)
B トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液 (0.2 vol%)
移動相勾配：試料注入後 40 分間で移動相 B の割合を 17% から 27% へと 10% 直線的に増加させる。
流 速：1.0 ml/min

上記の結果から、pH 5～6.5 に調整した後、凍結乾燥すると、安定性が優れていることが分かる。

(実験例 2)

ヒルジン変異体 HV1C3 を 6 mg/ml (0.86 mM)、精製白糖を 1.6 mg/ml (4.7 mM)、マンニトールを 10 mg/ml (55 mM) の濃度になるように精製水に溶解した。この溶液を 5 分割し、うち 4 分割分について、それぞれ 30 mM の酢酸、酒石酸、クエン酸、リン酸を用いて、pH を 5.5 のペプチド溶液に調整した。これらの pH 調整後の液および無調整の液を 0.22 μm のメンブランフィルターによりろ過し、ろ液を 6 ml ヴァイアルに 1 ml ずつ入れ、各 50 本、合計 250 本を凍結乾燥した。

上記凍結乾燥サンプルを、60℃のインキュベータ内で保存し、それぞれ、1、2、3、4、5、6、7、8 週間目に取り出し、1 ヴァイアルに 1 ml の精製水を加え、さらに 50 倍に希釈した液につき、実験例 1 と同

様にして、ヒルジン変異体HV1C3の残存百分率を求めた。その結果を表3に示した。

表 3

PH調整剤	残 存 百 分 率 (%)							
	1週目	2週目	3週目	4週目	5週目	6週目	7週目	8週目
—	96.9	94.2	92.3	90.9	89.9	88.2	87.2	86.1
酢 酸	98.3	95.6	94.2	93.3	92.0	91.9	91.4	90.6
酒石酸	98.4	97.6	95.9	95.2	92.4	92.2	91.9	90.6
クエン酸	97.4	95.8	94.4	93.3	92.4	91.6	90.8	89.8
リン酸	77.9	66.6	61.4	58.1	57.3	57.6	—	—

これらの結果から、有機酸を添加してpHを調整すると安定性が著しく増すが、無機酸であるリン酸の場合は劣ることが分かる。

(実験例3)

実験例1と同様にヒルジン変異体HV1C3を6 mg/ml (0.86 mM)、精製白糖を1.6 mg/ml (4.7 mM)、マンニトールを10 mg/ml (55 mM)の濃度になるように精製水に溶解した。この溶液を4分割し、うち3分割分について、30 mMの酒石酸を用いて、pHを、それぞれ5.0、5.5、6.0に調整しペプチド溶液とした。これらのpH調整後の液および無調整の液を0.22 μmのメンブランフィルターによりろ過し、ろ液を6 ml ヴァイアルに1 ml ずつ入れ、各50本、合計200本を凍結乾燥した。

上記凍結乾燥サンプルを、60℃のインキュベータ内で保存し、それぞれ、1、2、3、4、5、6、7、8週間目に取り出し、1 ヴァイアルに1 mlの精製水を加え、さらに50倍に希釈した液につき、実験例1と同様にして、ヒルジン変異体HV1C3の残存百分率を求めた。その結果を表4に示した。

表 4

pH	残 存 百 分 率 (%)							
	1 週目	2 週目	3 週目	4 週目	5 週目	6 週目	7 週目	8 週目
—	96.9	94.2	92.3	90.9	89.9	88.2	87.2	86.1
5.0	97.6	96.1	93.2	91.8	91.7	89.9	89.1	86.6
5.5	98.4	97.6	95.9	95.2	92.4	92.2	91.9	90.6
6.0	98.4	97.6	96.6	96.1	94.6	93.6	91.8	92.2

これらの結果から、有機酸、特に酒石酸で pH を 5 ~ 6.5 の範囲に調整することにより、安定性が著しく増すことが分かる。

(実験例 4)

ヒルジン変異体 HV1C3 を 6 mg/ml (0.86 mM)、精製白糖を 1.6 mg/ml (4.7 mM) になるように精製水に溶解し、この溶液を 4 分割し、うち 3 分割分について、それぞれ 5 mM、10 mM、30 mM の酒石酸を用いて、pH を 5.5 のペプチド溶液に調整した。無調整液にはマンニトールを 10 mg/ml (55 mM) になるよう溶解した。これらの液を 0.22  $\mu$ m のメンブランフィルターによりろ過し、ろ液を 6 ml ヴァイアルに 1 ml ずつ入れ、各 50 本、合計 200 本を凍結乾燥した。

上記凍結乾燥サンプルを、60 °C のインキュベータ内で保存し、それぞれ、1、2、3、4、5、6 週間目に取り出し、1 ヴァイアルに 1 ml の精製水を加え、実験例 1 と同様にして、ヒルジン変異体 HV1C3 の残存百分率を求めた。その結果を表 5 に示した。

表 5

酒石酸 濃度 mM	残 存 百 分 率 (%)					
	1 週目	2 週目	3 週目	4 週目	5 週目	6 週目
0	97.0	94.0	92.0	91.0	87.8	86.5
5	98.8	98.6	97.6	97.5	97.0	96.9
10	98.5	98.1	97.2	96.9	96.4	96.1
30	97.9	96.8	96.1	94.7	94.1	93.5

これらの結果から、pHの調整のために添加される有機酸の濃度は5 mMであっても十分に効果があることが分かる。

(実験例5)

実験例1と同様にヒルジン変異体HV1C3を6 mg/ml (0.86 mM)、精製白糖及びマンニトールの添加量を表6に示した濃度になるように、それぞれ精製水に溶解し、この溶液を5 mMの酒石酸を用いて、pHを5.5のペプチド溶液に調整した。pH調整後の液および無調整の液を0.22  $\mu$ mのメンブランフィルターによりろ過し、ろ液を6 ml ヴァイアルに1 ml ずつ入れ、凍結乾燥した。

上記凍結乾燥サンプルはいずれも安定な形態を示し、精製白糖およびマンニトールは賦形剤として有効であった。これらの凍結乾燥サンプルを、60℃のインキュベータ内で保存し、それぞれ、4、8週間目に取り出し、1 ヴァイアルに1 mlの精製水を加え、さらに50倍に希釈した液につき、実験例1と同じ条件で、液体クロマトグラフィーにより、ヒルジン変異体HV1C3以外の異性体量のピーク面積百分率を測定した。その結果を表6に示した。

表6

精製白糖 (mg/ml)	マンニトール (mg/ml)	異性体量(%)	
		4週目	8週目
1.6	1.0	7.23	8.58
—	1.0	6.93	7.99
1.6	—	4.90	5.00
—	—	5.72	6.13

この結果から、精製白糖及びマンニトールは、安定性にはほとんど影響を与えないことが確認された。即ち、表6に記載される4週目と8週目の異性体量の差違(増加)は、極僅かであり、有機酸添加による安定性の向上効果を、精製白糖及びマンニトールの添加は損なうものでないことが確認された。

(実験例6)

ヒルジン変異体HV1C3を含む表7に示した処方ペプチド溶液から凍結乾燥サンプルを調製した。

表7

処方番号	ヒルジン変異体 (mg/ml)	精製白糖 (mg/ml)	マンニトール (mg/ml)	酒石酸 (mM)	pH	ヒルジン変異体充填量 (mg/ヴァイアル)
1	6	8	0	10	6.0	5
2	6	8	50	10	6.0	5
3	6	30	50	0	無調整	1
4	6	0	0	0	無調整	5

上記凍結サンプルを40℃のインキュベーター内で保存し、3ヶ月目に取り出して、1ヴァイアルに1mlの精製水を加え、さらに50倍に希釈した液につき、実験例1と同様にして、ヒルジン変異体HV1C3の残存百分率を求めた。サンプルは3個掛けとし、その平均を取り、その結果を表8に示した。また、このときのクロマトグラムを図1に示した。

表8

処方番号	残存百分率(%)
1	98.5
2	98.2
3	96.9
4	90.0

これらの結果から、有機酸を添加しpHを5～6.5の範囲に調整することにより長期間の保存安定性が向上することが確認された。

産業上の利用可能性

本発明によると、ディスルファトヒルジンまたはヒルジン変異体のような、経時的に-Asp-Gly-または-Asn-Gly-配列のスクシンイミド体または $\beta$ 転移体へ変化するペプチドのこのような変化を効率よく抑制し、これらのペプチドの安定性を増大させることができる。

従って、これらのペプチドの医薬としての利用を促進することができる。

## 配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 66

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

## 配列

Val	Val	Tyr	Thr	Asp	Cys	Thr	Glu	Ser	Gly	Gln	Asn	Leu	Cys
1				5					10				

Leu	Cys	Glu	Gly	Ser	Asn	Val	Cys	Gly	Gln	Gly	Asn	Lys	Cys
15					20					25			

Ile	Leu	Gly	Ser	Asp	Gly	Glu	Lys	Asn	Gln	Cys	Val	Thr	Gly
	30					35					40		

Glu	Gly	Thr	Pro	Lys	Pro	Gln	Ser	His	Asn	Gln	Gly	Asp	Phe
		45					50					55	

Glu	Pro	Ile	Pro	Glu	Asp	Ala	Tyr	Asp	Glu
			60					65	

配列番号 : 2

配列の長さ : 65

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

## 配列

Ile Ile Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys  
 1 5 10

Leu Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Gln Gly Asn Lys Cys  
 15 20 25

Ile Leu Gly Ser Asp Gly Glu Lys Asn Gln Cys Val Thr Gly  
 30 35 40

Glu Gly Thr Pro Lys Pro Gln Ser His Asn Asp Gly Asp Phe  
 45 50 55

Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Gln  
 60 65

配列番号 : 3

配列の長さ : 65

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

## 配列

Val Val Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys  
 1 5 10

Leu Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Gln Gly Asn Glu Cys  
 15 20 25

Ile Leu Gly Ser Asp Gly Glu Lys Asn Gln Cys Val Thr Gly  
 30 35 40

Glu Gly Thr Pro Lys Pro Gln Ser His Asn Asp Gly Asp Phe  
 45 50 55

Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Gln  
 60 65

配列番号 : 4

配列の長さ : 65

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Ile Ile Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys  
 1 5 10

Leu Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Gln Gly Asn Glu Cys  
 15 20 25

Ile Leu Gly Ser Asp Gly Glu Lys Asn Gln Cys Val Thr Gly  
 30 35 40

Glu Gly Thr Pro Lys Pro Gln Ser His Asn Asp Gly Asp Phe  
 45 50 55

Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Gln  
 60 65

配列番号 : 5

配列の長さ : 66

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Ile Ile Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys

1

5

10

Leu Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Gln Gly Asn Glu Cys

15

20

25

Ile Leu Gly Ser Asp Gly Glu Lys Asn Gln Cys Val Thr Gly

30

35

40

Glu Gly Thr Pro Lys Pro Gln Ser His Asn Gln Gly Asp Phe

45

50

55

Glu Pro Ile Pro Glu Asp Ala Tyr Asp Glu

60

65

配列番号 : 6

配列の長さ : 66

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Ile Ile Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys  
 1 5 10

Leu Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Gln Gly Asn Lys Cys  
 15 20 25

Ile Leu Gly Ser Asp Gly Glu Lys Asn Gln Cys Val Thr Gly  
 30 35 40

Glu Gly Thr Pro Lys Pro Gln Ser His Asn Gln Gly Asp Phe  
 45 50 55

Glu Pro Ile Pro Glu Asp Ala Tyr Asp Glu  
 60 65

配列番号 : 7

配列の長さ : 65

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Val Val Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys  
 1 5 10

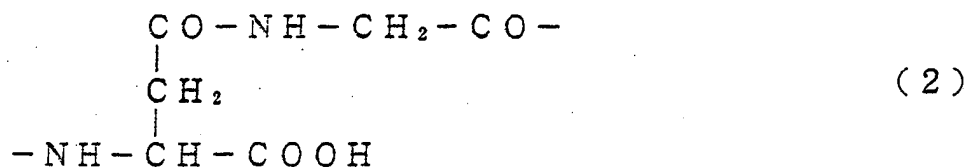
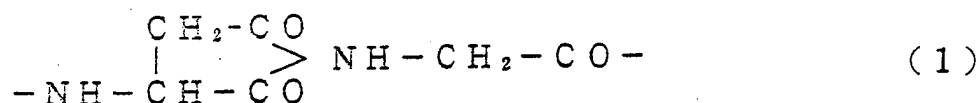
Leu Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Gln Gly Asn Lys Cys  
 15 20 25

Ile Leu Gly Ser Asp Gly Glu Lys Asn Gln Cys Val Thr Gly  
 30 35 40

Glu Gly Thr Pro Lys Pro Gln Ser His Asn Asp Gly Asp Phe  
45 50 55

Glu Glu Ile Pro Tyr Tyr Tyr Leu Gln  
60 65





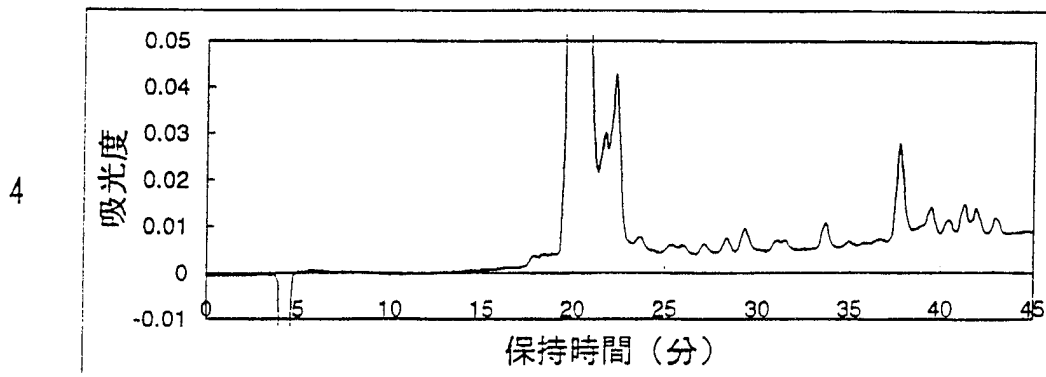
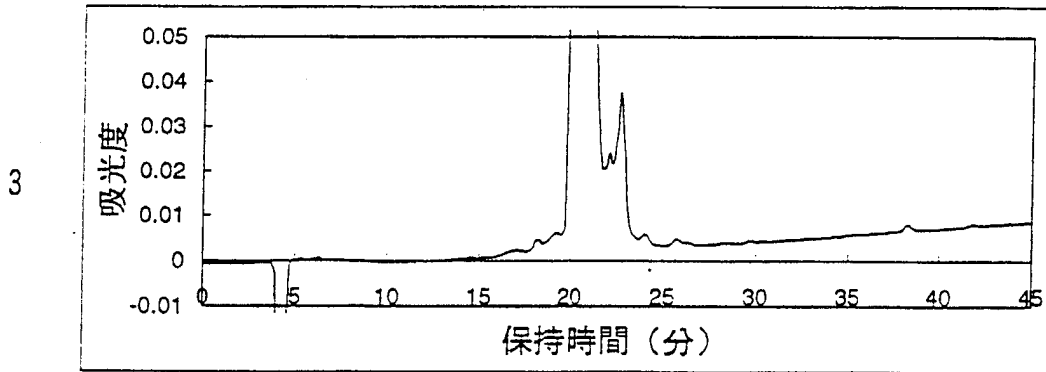
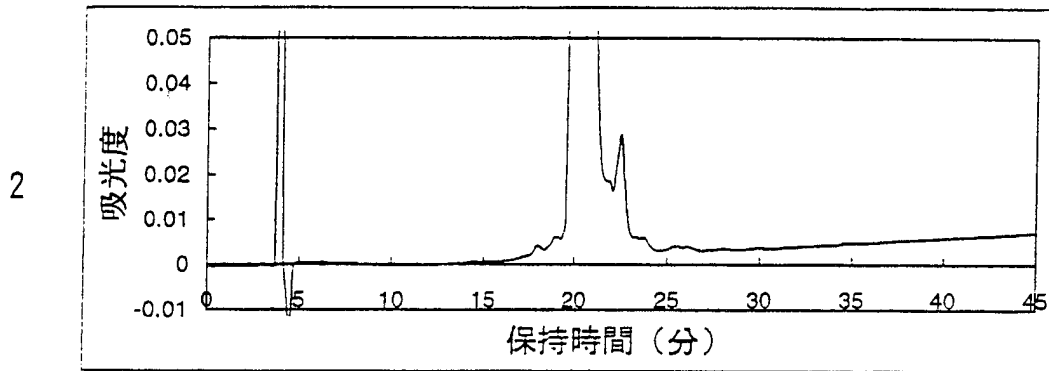
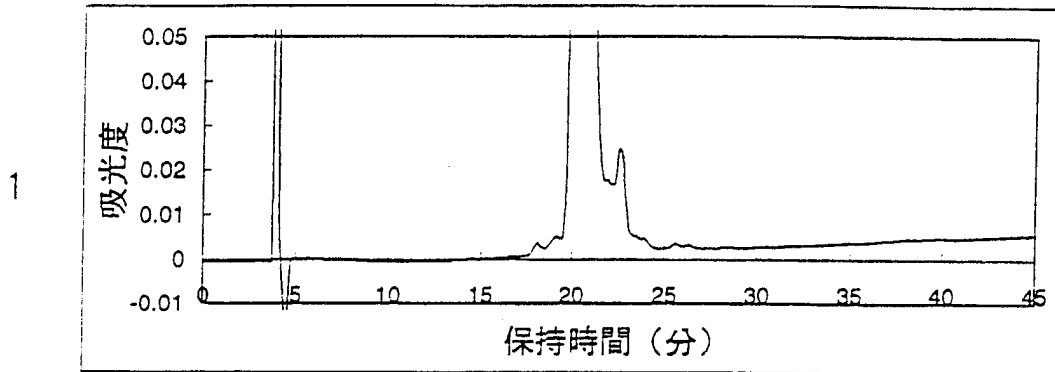
7. 組成比としてディスルファートヒルジンまたはヒルジン変異体 1 モルに対して 5 ~ 100 モルの有機酸を添加してなるヒルジン含有凍結乾燥医薬組成物。

8. 組成比としてディスルファートヒルジンまたはヒルジン変異体 1 モルに対して、5 ~ 100 モルの有機酸および 1 ~ 500 モルの白糖を添加してなるヒルジン含有凍結乾燥医薬組成物。

9. 組成比としてディスルファートヒルジンまたはヒルジン変異体 1 モルに対して、5 ~ 100 モルの有機酸、1 ~ 500 モルの白糖、および 10 ~ 1000 モルのマンニトールを添加してなるヒルジン含有凍結乾燥医薬組成物。

10. ディスルファートヒルジンまたはヒルジン変異体の濃度を 0.1 ~ 500 mg/ml とした溶液を凍結乾燥したことからなる請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のヒルジン含有凍結乾燥医薬組成物。

図 1



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP98/00178

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int. Cl<sup>6</sup> A61K38/58, A61K47/12, A61K47/26, A61K9/14

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)

Int. Cl<sup>6</sup> A61K38/58

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 practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 7-267877, A (CIBA-Geigy AG.), October 17, 1995 (17. 10. 95) & EP, 665019, A	1 - 10
PX	JP, 9-227407, A (Boehringerwerke AG.), September 2, 1997 (02. 09. 97) & DE, 19607239, A & EP, 792648, A	1 - 10
X Y	JP, 4-327539, A (CIBA-Geigy AG.), November 17, 1992 (17. 11. 92) & EP, 503829, A	1-3, 6, 7, 10 4, 5, 8, 9
X Y	JP, 2-117694, A (CIBA-Geigy AG.), May 2, 1990 (02. 05. 90) & EP, 352228, A & AU, 8938045, A	1-3, 6, 7, 10 4, 5, 8, 9
X Y	JP, 60-136597, A (CIBA-Geigy AG.), July 20, 1985 (20. 07. 85) & EP, 142860, A & DE, 3342139, A & US, 4654302, A	1-3, 6, 7, 10 4, 5, 8, 9

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search March 2, 1998 (02. 03. 98)	Date of mailing of the international search report March 17, 1998 (17. 03. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00178

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, 5-247090, A (Pharmacia & Upjohn SPA), September 24, 1993 (24. 09. 93) & EP, 501821, A & US, 5356875, A	1-3, 6, 7, 10 4, 5, 8, 9
A	JP, 5-310789, A (Hoechst AG.), November 22, 1993 (22. 11. 93) & US, 5286714, A & DE, 4140381, A & EP, 549915, A	1 - 10
A	JP, 6-256214, A (CIBA-Geigy AG.), September 13, 1994 (13. 09. 94) & EP, 624375, A & US, 5472938, A	1 - 10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> A61K38/58, A61K47/12, A61K47/26, A61K9/14

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> A61K38/58

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 7-267877, A (CIBA-GEIGY AKTI ENGESELLSCHAFT) 17. 10月. 1995 (17. 10. 95) & EP, 665019, A	1-10
PX	JP, 9-227407, A (BEHRINGWERKE AK TIENGESELLSCHAFT) 2. 9月. 1997 (02. 09. 97) & DE, 19607239, A & EP, 792 648, A	1-10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 03. 98

国際調査報告の発送日

17.03.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子 印

4C 9051

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 4-327539, A (CIBA-GEIGY AKTIE NGESELLSCHAFT) 17. 11月. 1992 (17. 1 1. 92) & EP, 503829, A	1-3, 6, 7, 10 4, 5, 8, 9
X Y	JP, 2-117694, A (CIBA-GEIGY AKTIE NGESELLSCHAFT) 2. 5月. 1990 (02. 05. 90) & EP, 352228, A & AU, 893804 5, A	1-3, 6, 7, 10 4, 5, 8, 9
X Y	JP, 60-136597, A (CIBA-GEIGY AKTI ENGESELLSCHAFT) 20. 7月. 1985 (20. 0 7. 85) & EP, 142860, A & DE, 33421 39, A & US, 4654302, A	1-3, 6, 7, 10 4, 5, 8, 9
X Y	JP, 5-247090, A (PHARMACIA & UPJO HN SPA) 24. 9月. 1993 (24. 09. 93) & EP, 501821, A & US, 5356875, A	1-3, 6, 7, 10 4, 5, 8, 9
A	JP, 5-310789, A (HOECHST AKTIENGE SELLSCHAFT) 22. 11月. 1993 (22. 11. 9 3) & US, 5286714, A & DE, 414038 1, A & EP, 549915, A	1-10
A	JP, 6-256214, A (CIBA-GEIGY AKTIE NGESELLSCHAFT) 13. 9月. 1994 (13. 0 9. 94) & EP. 624375, A & US, 54729 38, A	1-10