

(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2007-538048

(P2007-538048A)

(43) 公表日 平成19年12月27日(2007.12.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/21 (2006.01)	A 6 1 K 37/66 H	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/06 (2006.01)	A 6 1 K 9/06	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 7	
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-517247 (P2007-517247)	(71) 出願人	504104899
(86) (22) 出願日	平成17年5月13日 (2005.5.13)		アレス トレーディング ソシエテ アノ ニム
(85) 翻訳文提出日	平成19年1月15日 (2007.1.15)		スイス連邦 CH-1170 オーボンヌ ゾーヌ アンデュストリエル ドゥル リエッタ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2005/052219	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開番号	W02005/110466		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開日	平成17年11月24日 (2005.11.24)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	04076496.1		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成16年5月17日 (2004.5.17)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 福本 積
(31) 優先権主張番号	60/579, 218	(74) 代理人	100087413
(32) 優先日	平成16年6月14日 (2004.6.14)		弁理士 古賀 哲次
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒドロゲル・インターフェロン製剤

(57) 【要約】

本発明は、インターフェロンを含むポロキサマー・ヒドロゲル医薬製剤に関する。より詳細には、本発明は、持続放出インターフェロン- ヒドロゲル製剤と、その調製方法と、その利用法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インターフェロン（IFN）を含むポロキサマー・ヒドロゲルである医薬組成物。

【請求項 2】

上記インターフェロンが IFN- α である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

上記インターフェロンが組み換え IFN- α である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

上記インターフェロンが組み換え IFN- α 1a である、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【請求項 5】

緩衝剤と酸化防止剤をさらに含む、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

緩衝剤と界面活性剤をさらに含む、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

固体-ゲル転移温度調節剤をさらに含む、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

トレハロースとシクロデキストリンの中から選択した固体-ゲル転移温度調節剤をさらに含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

上記ポロキサマーがポロキサマー 407 である、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の組成物

20

【請求項 10】

20～25% w/w のポロキサマー 407 を含む、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の組成物が組み換え IFN- α 1a を含むポロキサマー 407 ヒドロゲルであり、この組成物が緩衝剤と L-メチオニンをさらに含む組成物。

【請求項 12】

ポロキサマー 188 をさらに含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

トレハロースをさらに含む、請求項 12 に記載の組成物。

30

【請求項 14】

ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンをさらに含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 15】

25% w/w のポロキサマー 407

74.7% w/w の酢酸塩緩衝剤（50mM/pH3.8）

0.012% w/w の r-hINF-ベータ 1a

0.02% w/w の L-メチオニン

0.24% w/w のポロキサマー 188

40

25% w/w のポロキサマー 407

72.04% w/w の酢酸塩緩衝剤（50mM/pH3.8）

0.012% w/w の r-hINF-ベータ 1a

0.03% w/w の L-メチオニン

0.24% w/w のポロキサマー 188

2.6% w/w のグリセロール 30° Be

25% w/w のポロキサマー 407

72.04% w/w の酢酸塩緩衝剤（50mM/pH3.8）

0.012% w/w の r-hINF-ベータ 1a

50

0.03% w/wのL-メチオニン
 0.24% w/wのポロキサマー188
 2.6% w/wのPEG(ルトロール(登録商標)E400)

25% w/wのポロキサマー407
 72.04% w/wの酢酸塩緩衝液(50mM/pH3.8)
 0.012% w/wのr-hINF-ベータ1a
 0.03% w/wのL-メチオニン
 0.24% w/wのポロキサマー188
 2.6% w/wのトレハロース

10

及び

20% w/wのポロキサマー407
 77.34% w/wの酢酸塩緩衝剤(50mM/pH3.8)
 0.015% w/wのr-hINF-ベータ1a
 0.04% w/wのL-メチオニン
 0.24% w/wのポロキサマー188
 2.6% w/wのヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン

からなるグループの中から選択された、請求項1~14のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項16】

請求項1~15のいずれか1項に記載のIFNヒドロゲル組成物を調製する方法であって、均一なポリマー溶液が形成される温度において緩衝溶液に計算量のポロキサマーを添加した後、上記インターフェロンを添加する操作を含む方法。

20

【請求項17】

上記緩衝溶液が溶液からゲルへの転移温度の調節剤を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

上記緩衝溶液が、トレハロースとシクロデキストリンの中から選択した、溶液からゲルへの転移温度の調節剤を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項19】

L-メチオニン、ポロキサマー188、ならびにこれらの組み合わせの中から選択した安定剤を含む溶液から上記インターフェロンを添加する、請求項16~18のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項20】

請求項1~15のいずれか1項に記載のIFNヒドロゲル組成物を利用して多発性硬化症の治療に用いる医薬組成物を調製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インターフェロンを含むヒドロゲル医薬製剤に関する。より詳細には、本発明は、持続放出インターフェロン-ヒドロゲル製剤と、その調製方法と、その利用法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

以前は治療できなかったいくつかの疾患に関して組み換えタンパク質医薬品がすでに独自の治療法を提供しており、しかも多数の新しいタンパク質薬が開発されつつある。

【0003】

タンパク質は通常は非経口投与されるため、循環からそのタンパク質が急速に除去される可能性がある。治療に有効な血中レベルを維持するためには、投与量を多くしたり、頻繁に投与したりせねばならないことがしばしばある。この方法の不便さと、副作用が発生する可能性は、タンパク質の持続送達または制御送達がなされる系を用いると避けることができよう。

50

【0004】

持続送達系は、ポーラスを投与する場合よりもタンパク質治療薬の血中レベルを一定に維持することができる。そのため薬の効率が改善され、副作用がより少なくなる。このようなドラッグ・デリバリー系としては、注射可能な油、エマルジョン、懸濁液、リポソーム、微粒子（マイクロカプセル、マイクロスフェア）、インプラント、ゲル系などがある。

【0005】

ドラッグ・デリバリーに用いられるゲル系の中では、ポロキサマー・ゲルが、その場で熱硬化してゲルを形成する材料という独自の性質のために使用されている。ポロキサマーは、ポリ(エチレンオキシド)とポリ(プロピレンオキシド)のブロック・コポリマーであり、温度を上げると低粘性状態から高粘性状態へと転移する水性ゲルを形成する(“熱ゲル化”と呼ばれる)非イオン性界面活性剤としてよく知られている。

10

【0006】

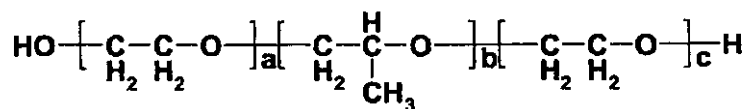
さらに、ポロキサマーは、湿潤特性、消泡特性、可溶化特性が優れているため、医薬用にドラッグ・デリバリー用ビヒクルとして一般に使用されている(Guzman他、1992年、International Journal of Pharmaceutics、第80巻、119~127ページ; Gander他、1986年、Drug Dev. and Indust. Pharmacy、第12巻(11~13)、1613~1623ページ)。

【0007】

商品名ブルロニック(登録商標)と呼ばれるポロキサマーは、以下の一般式(1)を持つ3ブロックのコポリマー:

20

【化1】



(1)

30

である(ただし(a)と(c)は統計的に同数であり、(b)は15以上であり、(a+c)がこの分子の重量の20~90%を構成する)。

【0008】

2つのポリエチレンオキシド鎖(PEO)は親水性であるのに対し、ポリプロピレン鎖(PP0)は疎水性であるため、PEO-PP0-PEOブロック・コポリマーは両親媒性になる。なおその両親媒性は、単位(a)と(b)の数を変えることによって変化させることができる。

【0009】

PEO-PP0-PEOブロック・コポリマーは両親媒性であるため、自己凝集して関連する多彩な構造(例えばミセル、液晶相、マイクロエマルジョン)を形成することができる。

【0010】

ブルロニック(登録商標)のうちで、ポロキサマー407(ルトロール(登録商標)F127またはブルロニック(登録商標)F127)、(一般式(1)において(a)=(c)=99かつ(b)=65であるポロキサマー)と、ポロキサマー338(ルトロール(登録商標)F108またはブルロニック(登録商標)F108)(一般式(1)において(a)=(c)=16かつ(b)=46であるポロキサマー)が、濃度を20~35%にした水溶液にすると熱ゲル化特性を持つことが知られている(Guzman他、1992、上記文献)。特に22~25%(w/w)のポロキサマー407ポリマー溶液は、比較的低温(すなわち4~10)では液体だが、特徴的な転移温度(すなわち18~20)を超える温度に温めると非常に粘性のある安定なゲルを形成する。このゲルは、例えば皮下注射用、局所塗布用、エーロゾル用の液体ヒドロゲル製剤に使用されてきており、体温まで温めるとゲルを形成する(Guzman他、1992、上記文献)。

40

50

【0011】

ポロキサマー407ゲルは、ゲル・マトリックスの中に組み込んだタンパク質の安定性を増大させることが見いだされているため（Stratton他、1997年、*Journal of Pharmaceutical Science*、第86巻、9号、1006～1010ページ）、さまざまな製剤に使用されてきた。例えばリドカイン（Chen-Chow他、1981年、*International Journal of Pharmaceutics*、第8巻、89～99ページ）、インドメタシン（Miyazaki他、1986年、*Chem. Pharm. Bull.*、第34巻(4)、1801～1808ページ）、IL-2（Johnston他、1992年、*Pharmaceutical Research*、第9巻(3)、425～434ページ）で使用されている。

【0012】

インターフェロンはサイトカインである。すなわち、細胞間でメッセージを伝達し、免疫系で極めて重要な役割を果たす可溶性タンパク質である。免疫系での役割は、感染を起こす微生物を破壊するのを助け、その結果として起こるあらゆる損傷を修復するというものである。インターフェロンは、感染した細胞から自然に分泌される物質であり、1957年に初めて同定された。その名称は、インターフェロンがウイルスの複製と産生を“インターフェアする（阻止する）”という事実に由来する。

【0013】

インターフェロンは、抗ウイルス活性と抗増殖活性の両方を示す。天然のヒト・インターフェロンは、生化学特性と免疫特性に基づいて3つの主要なクラスに分類されている。すなわち、インターフェロン（白血球）、インターフェロン（線維芽細胞）、インターフェロン（免疫）である。インターフェロンは、現在アメリカ合衆国その他の国で、毛様細胞性白血病、性病いぼ、カポジ肉腫（後天性免疫不全症候群（エイズ）患者で一般に見られるがん）、慢性非A型肝炎、慢性非B型肝炎の治療に用いることが認められている。

【0014】

さらに、インターフェロン（IFN）は、身体がウイルスの感染に応答して産生する糖タンパク質である。インターフェロンは、防護された細胞内でのウイルスの増殖を抑制する。IFNは低分子量のタンパク質からなり、作用は極めて非特異的である。1つのウイルスによって誘導されるIFNが、広い範囲の他のウイルスにも有効である。しかしIFNは種特異的である。すなわち1つの種が産生するIFNは、同じ種の細胞、または密接な関係のある種の細胞における抗ウイルス活性だけを刺激する。IFNは、その潜在的な抗腫瘍活性と抗ウイルス活性が研究された最初のサイトカイン群である。

【0015】

3つの主要なIFNは、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ と呼ばれる。中心的なこれらのIFNは、最初は、出所となる細胞（白血球、線維芽細胞、T細胞）によって分類された。しかしいくつかのタイプが1つの細胞で産生されているらしいことが明確になってきた。そこで現在では、白血球IFNはIFN- α と呼ばれ、線維芽細胞IFNはIFN- β と呼ばれ、T細胞IFNはIFN- γ と呼ばれている。第4のタイプのIFNとして、（パーキット・リンパ腫に由来する）“Namalwa”細胞系で産生されるリンパ芽球腫様IFNも存在している。この細胞系は、白血球IFNと線維芽細胞IFNの両方の混合物を産生するように見える。

【0016】

インターフェロン単位またはインターフェロンの国際単位（UまたはIU（国際単位を意味する））が、細胞の50%をウイルスによる損傷から保護するのに必要な量として定義されるIFN活性の1つの指標となることが報告されている。生物活性の測定に使用できるアッセイは、細胞変性効果抑制アッセイである（Rubinstein他、1981年、*J. Virol.*、第37巻、755～758ページ；Familletti他、1981年、『*Methods in Enzymology*』、第78巻、Pestka編、アカデミック・プレス社、ニューヨーク、387～394ページに記載されている）。インターフェロンのためのこの抗ウイルス・アッセイでは、約1単位/mlのインターフェロンが、50%の細胞変性効果を生じさせるのに必要な量である（Pestka、1986年、『*Methods in Enzymology*』、第78巻、Pestka編、アカデミック・プレス社、ニューヨーク119、14～23ページ）。

10

20

30

40

50

【0017】

どのクラスのIFNも、異なるいくつかのタイプを含んでいる。IFN- とIFN- は、それぞれ単一の遺伝子の産物である。

【0018】

IFN- に分類されるタンパク質は最も多彩なグループであり、約15のタイプを含んでいる。第9染色体上にIFN- 遺伝子のクラスターが存在していて、そこには少なくとも23個のメンバーが含まれている。そのうちの15個は活性であって転写される。成熟IFN- はグリコシル化されない。

【0019】

IFN- とIFN- はすべて同じ長さであり（アミノ酸が165個または166個）、似た生物活性を持っている。IFN- は長さがアミノ酸146個であり、クラスとクラスほどは似ていない。IFN- だけが、マクロファージを活性化させたり、キラーT細胞の成熟を誘導したりできる。新しいタイプのこれら治療薬は、腫瘍に対する生体の応答に影響を及ぼし、免疫調節を通じて認識に影響を与えるため、生物学的応答調節薬（BRM）と呼ばれることがある。

【0020】

ヒト線維芽細胞インターフェロン（IFN- ）は抗ウイルス活性を持っており、ナチュラル・キラー細胞を刺激して腫瘍細胞を攻撃させることもできる。このインターフェロンは約20,000Daのポリペプチドであり、ウイルスと二本鎖RNAによって誘導される。組み換えDNA技術によってクローニングされた線維芽細胞インターフェロンの遺伝子のヌクレオチド配列（Derynk他、1980年、Nature、第285巻、542～547ページ）から、このタンパク質の完全なアミノ酸配列が得られた。長さはアミノ酸166個である。

【0021】

Shepardら（1981年、Nature、第294巻、563～565ページ）は、抗ウイルス活性を失わせる塩基842の位置の突然変異（位置141がCys Tyr）と、ヌクレオチド1119～1121が欠失したクローン変異体を報告した。

【0022】

Markら（1984年、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、第81巻(18)、5662～5666ページ）は、塩基469（T）を（A）で置換する人工的突然変異を挿入することにより、位置17のアミノ酸をシステインからセリンに変化させた。得られたIFN- は、“元の”IFN- と同じくらい活性であり、長期保管中（-70 ）も安定であったことが報告されている。

【0023】

レピフ（登録商標）（セロノ社、組み換えインターフェロン- ）は、哺乳動物の細胞系から産生されるインターフェロン（IFN）-ベータ-1aである。推奨されている国際非商標名（INN）は、“インターフェロン-ベータ-1a”である。

【0024】

IFNとコポリマーからなるさまざまな製剤が、過去数十年の間に開発されてきた。そのうちで、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレングリコールを含むIFNアルファ注射製剤（日本国特開2003-342193）、シクララジン-IFNアルファ組み合わせ製剤（ヨーロッパ特許第0177153号）、局所投与用インターフェロン・アルファ室温ポロキサマー・ゲルのためのキット（アメリカ合衆国特許第4,469,228号）、IFN- の微粒子製剤（WO 01/58474）、化学的にポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン・コポリマーと結合した糖タンパク質を含む組成物（ヨーロッパ特許第0098110号）、粘膜（特に鼻内粘膜）に送達するためのIFN- 製剤（WO 04/002404）が報告されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0025】

タンパク質をベースとしたあらゆる医薬品と同様、インターフェロンを治療薬として使用する際の1つの大きな挑戦課題は、注入する投与量を増やすことなく、しかも起こりうる副作用なしに、所定の時間にわたって治療に有効な血中レベルを維持することである。

そのため、IFNの血中レベルを液体製剤よりも長期間にわたって維持すること、および/または血漿をより多くのIFNに曝露することにより、IFNの生物活性を維持または改善するIFN医薬組成物が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0026】

本発明は、インターフェロン(IFN)(特に組み換えh-IFN 1a)を含むポロキサマー・ヒドロゲル医薬組成物、または生体内で形成されるポロキサマー・ゲル医薬組成物と、その調製方法に関する。この医薬組成物は、ポロキサマー(特にポロキサマー407)を用いて調製されるヒドロゲルである。このような医薬組成物を、この明細書ではIFN“ヒドロゲル”と呼び、この用語には、インターフェロン(IFN)、またはそのアイソフォーム、そのムテイン、その融合タンパク質、その機能性誘導体、その活性化断片が含まれる。

10

【0027】

本発明のポロキサマー・ヒドロゲルIFN製剤は、生体内で形成されるゲルであるという利点を有するため、取り扱いが容易であり、持続放出プロファイルを示す、および/またはバルクのIFN製剤よりも大きな生物学的利用能を示す。

【0028】

本発明の一実施態様によれば、ヒドロゲルはさらに、少なくとも1種類の安定剤を含んでいる。

【0029】

本発明の別の一実施態様によれば、ヒドロゲルはさらに、賦形剤として、溶液からゲルへの転移温度の調節剤を少なくとも1種類含んでいる。

20

【0030】

本発明の第1の特徴により、インターフェロン(IFN)、そのアイソフォーム、そのムテイン、その融合タンパク質、その機能性誘導体、その活性化断片のいずれかを含むポロキサマー・ヒドロゲルである医薬組成物が提供される。

【0031】

本発明の第2の特徴により、本発明のIFNヒドロゲル組成物を調製する方法であって、均一なポリマー溶液が形成される温度において緩衝溶液に計算量のポロキサマーを添加した後、インターフェロン、そのアイソフォーム、そのムテイン、その融合タンパク質、その機能性誘導体、その活性化断片のいずれかを添加する操作を含む方法が提供される。

30

【0032】

本発明の第3の特徴により、本発明のIFN-ベータ・ヒドロゲル組成物を利用して多発性硬化症の治療に用いる医薬組成物を調製する方法が提供される。

【0033】

本発明の第4の特徴により、多発性硬化症を治療する方法であって、本発明の持続放出IFN-ベータ製剤を、それを必要としている患者に投与する操作を含む方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

以下の段落では、本発明の化合物を構成するさまざまな化学的部分の定義を与える。この定義は、それよりも広い定義を明らかな形で示す場合を除き、この明細書と請求項の全体に適用されるものとする。

40

【0035】

この明細書では、“インターフェロン”または“IFN”に、その名称で文献に記載されているあらゆる分子が含まれるものとする。例えば、上記の“背景技術”の項に記載したあらゆるタイプのIFNが含まれる。特にIFN- α 、IFN- β 、IFN- γ が、上記の定義に含まれる。IFN- β が、本発明における好ましいIFNである。本発明に適したIFN- β は市販されており、例えばレピフ(登録商標)(セロノ社)、アボネックス(登録商標)(パイオジェン社)、ベータフェロン(登録商標)(シェリング社)として入手できる。

【0036】

この明細書では、“インターフェロン-ベータ(IFN-ベータまたはIFN- β)”という用

50

語に、特にヒト起源の線維芽細胞インターフェロン（体液から単離することによって、あるいは宿主原核細胞または宿主真核細胞からDNA組み換え技術によって得られる）と、その塩、その機能性誘導体、その変異体、そのアナログ、その活性な断片が含まれるものとする。IFN-ベータは、組み換えIFN-ベータ-1aを意味することが好ましい。

【0037】

本発明に適したIFN- は市販されており、例えばレピフ（登録商標）（セロノ社）、アボネックス（登録商標）（バイオジェン社）、ベータフェロン（登録商標）（シェリング社）として入手できる。本発明では、ヒト起源のインターフェロンを使用することも好ましい。この明細書では、インターフェロンという用語に、その塩、その機能性誘導体、その変異体、そのアナログ、その活性な断片が含まれるものとする。

10

【0038】

レピフ（登録商標）（組み換えインターフェロン- ）は、多発性硬化症（MS）のインターフェロン療法のためにごく最近開発されたものであり、治療に大きな進歩をもたらした。レピフ（登録商標）は、哺乳動物細胞系から産生されたインターフェロン（IFN）-ベータ1aである。インターフェロン-ベータ1aを週に3回皮下投与すると再発-弛張性多発性硬化症（RRMS）の治療に有効であることが確立された。インターフェロン-ベータ1aは、再発の回数を減らし、再発時の重篤度を軽減し、MRIによって測定される疾患の苦痛と進行を抑えることにより、長期にわたるMSにプラスの効果を持つ可能性がある。

【0039】

本発明に従って再発-弛張性MSを治療する際のIFN- の投与量は、使用するIFN- のタイプによって異なる。

20

【0040】

本発明によれば、IFNが大腸菌の中で産生される組み換えIFN- 1b（商品名ベータセロン（登録商標）で市販されている）である場合には、2日に1回、一人あたり約250~300 μ g、または8MIU~9.6MIUの投与量で皮下投与することが好ましい。

【0041】

本発明によれば、IFNがチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）の中で産生される組み換えIFN- 1a（商品名アボネックス（登録商標）で市販されている）である場合には、1週間に1回、一人あたり約30~33 μ g、または6MIU~6.6MIUの投与量で筋肉内投与することが好ましい。

30

【0042】

本発明によれば、IFNがチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）の中で産生される組み換えIFN- 1a（商品名レピフ（登録商標）で市販されている）である場合には、1週間に3回（TIW）、一人あたり22~44 μ g、または6MIU~12MIUの投与量で皮下投与することが好ましい。

【0043】

この明細書では、“ムテイン”という用語は、IFNのアナログのうちで、天然のIFNの1個以上のアミノ酸残基が別のアミノ酸残基で置換されていたり、天然のIFNの1個以上のアミノ酸残基が欠失していたり、天然のIFN配列に1個以上のアミノ酸残基が付加されていたりするが、得られる産物の活性は野生型IFNと比べて顕著に変化していないものを意味する。このようなムテインは、公知の合成法および/または部位指定突然変異誘発技術によって、あるいは適切な他の方法によって作られる。好ましいムテインとしては、例えばShepard他、1981年、上記文献、またはMark他、1984年、上記文献に記載されているものが挙げられる。

40

【0044】

このようなムテインもIFNと十分に重複したアミノ酸配列を持っていて、活性がIFNと実質的に同程度かそれ以上であることが好ましい。インターフェロンの生物学的機能は当業者によく知られており、しかも生物学的規格が確立していて、例えば国立生物学規格・規制協会（<http://immunology.org/links/NIBSC>）から入手することができる。

【0045】

50

IFNの活性を調べるバイオアッセイが知られている。IFNアッセイは、例えばRubinsteinら（1981年、上記文献）が記載しているようにして実施することができる。例えばルーチンの実験により、任意のムテインがIFNの活性と実質的に同程度かそれ以上の活性を持つかどうかを調べることができる。

【0046】

本発明で使用できるIFNのムテイン、またはそれをコードしている核酸としては、それに対応してペプチドまたはポリヌクレオチドが置換された配列からなる有限数の集合がある。それらは、当業者であればこの明細書に記載した教えまたはガイドに基づき、難しい実験を行なうことなく容易に得ることができる。

【0047】

本発明のムテインにおける好ましい変化は、“保存された”置換として知られるものである。本発明のポリペプチドまたはタンパク質の保存されたアミノ酸置換としては、1つのグループ内の同義アミノ酸がある。同義アミノ酸は、互いに十分に似た物理化学的性質を持っているため、そのグループのメンバー同士を置換してもその分子の生物機能が保持される。上記配列に対するアミノ酸の挿入や欠失でその配列の機能を変えないものも可能であることは明らかである。それは特に、挿入または欠失がほんのアミノ酸数個（例えば30個未満であり、10個未満が好ましい）であって、しかも機能的なコンホメーションにとって重要なアミノ酸（例えばシステイン残基）を除去又は置換しない場合に当てはまる。このような欠失および/または挿入によって生まれるタンパク質とムテインは、本発明の範囲に含まれる。

10

20

【0048】

同義アミノ酸のグループは、表Iに規定したものであることが好ましい。同義アミノ酸のグループは、表IIに規定したものであることがさらに好ましい。同義アミノ酸のグループは、表IIIに規定したものであることが最も好ましい。

【0049】

表I

同義アミノ酸の好ましいグループ

【表 1】

アミノ酸	同義グループ	
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn	
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His	
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu	
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro	
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr	10
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala	
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val	
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile	
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe	
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr	
Cys	Ser, Thr, Cys	
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His	20
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln	
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn	
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys	
Asp	Glu, Asn, Asp	
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu	
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	
Trp	Trp.	30

【 0 0 5 0 】

表 11

同義アミノ酸のより好ましいグループ

【表 2】

アミノ酸	同義グループ	
Ser	Ser	
Arg	His, Lys, Arg	
Leu	Leu, Ile, Phe, Met	
Pro	Ala, Pro	
Thr	Thr	10
Ala	Pro, Ala	
Val	Val, Met, Ile	
Gly	Gly	
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu	
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe	
Tyr	Phe, Tyr	
Cys	Cys, Ser	
His	His, Gln, Arg	20
Gln	Glu, Gln, His	
Asn	Asp, Asn	
Lys	Lys, Arg	
Asp	Asp, Asn	
Glu	Glu, Gln	
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu	
Trp	Trp.	30

【 0 0 5 1 】

表 III

同義アミノ酸の最も好ましいグループ

【表 3】

アミノ酸	同義グループ	
Ser	Ser	
Arg	Arg	
Leu	Leu, Ile, Met	
Pro	Pro	
Thr	Thr	10
Ala	Ala	
Val	Val	
Gly	Gly	
Ile	Ile, Met, Leu	
Phe	Phe	
Tyr	Tyr	
Cys	Cys, Ser	
His	His	20
Gln	Gln	
Asn	Asn	
Lys	Lys	
Asp	Asp	
Glu	Glu	
Met	Met, Ile, Leu	
Trp	Met.	30

【0052】

本発明で使用するIFNのムテインを得るのに利用できるタンパク質のアミノ酸置換法の実例は、公知の任意の方法であり、例えば、Markらに付与されたアメリカ合衆国特許第4,959,314号、第4,588,585号、第4,737,462号；Kothsらに付与されたアメリカ合衆国特許第5,116,943号；Namenらに付与されたアメリカ合衆国特許第4,965,195号；Chongらに付与されたアメリカ合衆国特許第4,879,111号；Leeらに付与されたアメリカ合衆国特許第5,017,691号に記載されており；リシン置換されたタンパク質は、Shawらに付与されたアメリカ合衆国特許第4,904,584号に提示されている。IFN-ベータの具体的なムテインは、例えばMarksらが（1984年、上記文献）報告している。

40

【0053】

“融合タンパク質”という用語は、IFNを含むポリペプチド、またはそのムテインで、例えば体液中の滞在時間が長い別のタンパク質と融合したものを意味する。IFNは、例えば別のタンパク質やポリペプチドなど（例えば免疫グロブリンやその断片）と融合させることができる。

【0054】

この明細書では、“機能性誘導体”に、IFNの誘導体、そのムテイン、その融合タンパク質が含まれる。これらは、各残基の上、あるいはN末端またはC末端の基の上に側鎖として存在する官能基から従来技術で知られている手段で作ることができ、薬理的に許容可能な状態を維持している（すなわちIFNと実質的に同じ活性を失うことなく、その機能

50

性誘導体を含む組成物に毒性を与えない)限りは本発明に含まれる。このような誘導体として、例えば、抗原部位を隠して体液中のIFNの滞在時間を延ばすことのできるポリエチレングリコール側鎖がある。他の誘導体としては、カルボキシル基の脂肪族エステル；アンモニア、第一級アミン、第二級アミンのいずれかと反応させることによるカルボキシル基のアミド；アミノ酸残基の自由なアミノ基とアシル部分（例えばアルカノイル基または炭素環式アロイル基）で形成されたN-アシル誘導体；（例えばセリル残基またはトレオニル残基の）自由なヒドロキシル基とアシル部分で形成されたO-アシル誘導体などがある。

【0055】

本発明では、IFN、ムテイン、融合タンパク質の“活性な断片”に、単独のタンパク質分子のポリペプチド鎖のあらゆる断片または前駆体、あるいは関連する分子または残基（例えば糖残基またはリン酸残基）が結合したタンパク質分子のポリペプチド鎖のあらゆる断片または前駆体、あるいはタンパク質分子または糖残基そのものの凝集体のあらゆる断片または前駆体が含まれる。ただしこの断片は、対応するIFNと比べて活性が顕著に低下してはならない。

【0056】

本発明では、組み換えIFN-ベータ1aと本発明の化合物を使用することが特に好ましい。

【0057】

特別なインターフェロン変異体が最近報告された。このいわゆる“コンセンサス・インターフェロン”は、IFNの非天然変異体である（アメリカ合衆国特許第6,013,253号）。本発明の好ましい一実施態様によると、本発明の化合物は、コンセンサス・インターフェロンと組み合わせて使用される。

【0058】

この明細書では、ヒト・インターフェロン・コンセンサス（IFN-con）は、非天然ポリペプチドで、天然に存在するヒト白血球インターフェロンの亜型の配列の過半数を代表するIFN- のサブセットに共通するアミノ酸残基を主に含んでいて、すべての亜型に共通するアミノ酸が存在することはない1つ以上の位置に、その位置に多く存在するアミノ酸を含むが、天然に存在する少なくとも1つの亜型ではその位置に存在していないどのアミノ酸残基も含まないものを意味する。IFN-conには、例えばIFN-con1、IFN-con2、IFN-con3と表わされるアミノ酸配列が含まれ、これらはアメリカ合衆国特許第4,695,623号、第4,897,471号、第5,541,293号に開示されている。IFN-conをコードしているDNA配列は、これら特許に記載されているようにして作ること、あるいは他の標準的な方法で作ることができる。

【0059】

さらに別の好ましい一実施態様では、融合タンパク質がIg融合体を含んでいる。直接融合させること、あるいは短いリンカー・ペプチドを介して融合させることが可能である。リンカー・ペプチドとしては、長さがアミノ酸1~3個のものや、より長くて例えばアミノ酸残基が13個のものが可能である。リンカー・ペプチドは、例えば配列E-F-M（グルタミン酸-フェニルアラニン-メチオニン）を持つトリペプチドにすること、またはグルタミン酸-フェニルアラニン-グリシン-アラニン-グリシン-ロイシン-バリン-ロイシン-グリシン-グリシン-グルタミン-フェニルアラニン-メチオニンという13個のアミノ酸を含むリンカー配列にすることが可能であり、それをIFN配列と免疫グロブリン配列の間に導入できる。得られる融合タンパク質は特性が改善され、体液中の滞在時間（半減期）が延びたり、比活性が増大したり、発現レベルが増大したりする。また、融合タンパク質の精製が簡単になる可能性もある。

【0060】

さらに別の好ましい一実施態様では、IFNをIg分子の定常領域と融合させる。IFNは、重鎖領域（例えばヒトのIgG₁のCH₂ドメインまたはCH₃ドメイン）と融合させることが好ましい。Ig分子の他のアイソフォーム（例えばアイソフォームIgG₂、IgG₃、IgG₄、または他のクラスのIgであるIgMやIgA）も、本発明の融合タンパク質を作るのに適している。融合タンパク質は、単量体でも多量体でもよく、ヘテロ多量体でもホモ多量体でもよい。

10

20

30

40

50

【0061】

さらに別の好ましい実施態様では、機能性誘導体は、アミノ酸残基上の1つ以上の側鎖として存在する1つ以上の官能基に結合した少なくとも1つの部分を備えている。この部分はポリエチレングリコール（PEG）部分であることが好ましい。PEG化は、公知の方法で実施することができ、その方法は例えばWO 99/55377に記載されている。

【0062】

個体への投与量は、多数の因子に依存する。因子としては、薬物動態、投与経路、患者の状態と特性（性別、年齢、体重、健康状態、サイズ）、症状の進み具合、同時に実施している治療、治療の頻度、望む効果などがある。

【0063】

ヒトIFN-ベータ1aの標準的な投与量は、1日につき80,000IU/kg～200,000IU/kg、または一人当たり1日に6MIU（100万国際単位）～12MIU、または一人当たり22～44μg（マイクログラム）である。本発明によれば、IFN-ベータ1aは、一人当たり週に1回以下、約1～500μgの量を投与することが好ましい。この量は、約10～308μg、または約10～260μgであることがより好ましい。

【0064】

本発明による活性成分の投与は、筋肉内経路または皮下経路で行なうことができる。IFNの好ましい投与経路は、皮下経路である。

【0065】

IFNは、2日に1回、またはそれよりも少ない頻度で投与することも可能である。IFNは、1週間に1回、または2回、または3回投与することが好ましい。

【0066】

好ましい投与経路は皮下経路であり、例えば1週間に1回以下投与する。

【0067】

製剤中のIFN-ベータ1aの濃度は、約10μg/ml～約800μg/mlであることが好ましい。この濃度は、約20μg/ml～約500μg/mlであることがより好ましく、約30μg/ml～約300μg/mlであることがさらに好ましく、約44、88、264μg/mlであることが最も好ましい。

【0068】

“ヒドロゲル”という用語は、親水性ポリマーが架橋して大量の水を含む三次元構造を構成する能力を有するネットワークを意味する。ポロキサマーは、水溶液中でミセルを形成する特徴を持つポリマーである。ポロキサマーは、より高い濃度および/または高温でミセル間相互作用が大きくなるためにミセルが会合して“ゲル化”（溶液からゲルへの転移）し、液晶相（ゲル）を形成する。その後、さらに高温になるとゲルは再び融解する（Bromberg他、1998年、Advanced Drug Delivery Reviews、第31巻、197～221ページ）。

【0069】

相転移温度は、水中のポロキサマーの濃度によって異なる。一般に、ポリマーの濃度が20～30重量%の範囲では、溶液からゲルへの転移は5～30の温度で起こり、ゲルから溶液への転移は35～50で起こる。したがって本発明による“ポロキサマー・ヒドロゲル”という用語は、ヒトの体温でゲル化（溶液からゲルへの転移）する性質を有するポロキサマー溶液を意味する。例えば本発明のポロキサマー・ヒドロゲルは、ポロキサマーを20～30重量%含んでおり、その値は一般に20～25重量%である。したがって“ヒドロゲル”という用語は、生体内で形成されるゲルも意味する。

【0070】

“溶液からゲルへの（または“ゾル-ゲル”）転移温度調節剤”という用語は、IFN-ベータを含むヒドロゲルが溶液からゲルに転移する温度を変化させる（好ましくは上昇させる）ことのできる賦形剤を意味する。そのような調節剤の具体例は、糖類（例えばトレハロース）、ポリエチレングリコール、グリセリン（例えばグリセロール30°）、シクロデキストリン（ヒドロキシプロピル-シクロデキストリンが好ましい）である。ゾル-ゲル転移温度調節剤は、例えば、注射器に入れやすくするため、および/または保管温度を高くするために室温近傍でヒドロゲルの転移温度を上昇させるのに使用できる。本発明の

10

20

30

40

50

ヒドロゲルは、例えば約1~3% w/w、好ましくは2.6% w/wのゾル-ゲル温度調節剤を含むことができる。

【0071】

“界面活性剤”という用語は、液体の表面張力を小さくしたり、2種類の液体間の界面張力を小さくしたり、液体と固体の間の界面張力を小さくしたりする可溶性化合物を意味する。なお表面張力とは、液体の表面に作用して表面積を最小にしようとする力である。界面活性剤は、医薬製剤にときどき使用されてきた。それは、例えば、低分子量の薬剤やポリペプチドを送達したり、薬剤の吸収状態を変化させたり、標的組織への薬剤の送達を変化させたりすることが目的である。よく知られている界面活性剤としては、ポリソルベート（ポリオキシエチレン誘導体；トウイーン）やプルロニックがある。

10

【0072】

本発明の一実施態様によれば、プルロニックは、本発明によるヒドロゲルの調製に用いる安定化IFN液体製剤の中に存在していることが好ましい界面活性剤である。

【0073】

本発明の別の実施態様によれば、プルロニック（登録商標）F77（ポロキサマー217）、プルロニック（登録商標）F87（ポロキサマー237）、プルロニック（登録商標）F88（ポロキサマー238）、プルロニック（登録商標）F68（ポロキサマー188）の中から選択した界面活性剤（特にプルロニック（登録商標）F68（BASF社）が好ましい）が、本発明によるヒドロゲルの調製に用いる安定化IFN液体製剤の中に存在している。

【0074】

プルロニックは、安定化IFN液体製剤の中に、望む保管期間（例えば12~24ヶ月）を通じてインターフェロンの安定性を維持するのに十分な濃度で、そして表面（例えばバイアル、アンプル、カートリッジ、注射器）への吸着によるタンパク質の損失を防ぐのに十分な濃度で存在していることが好ましい。一般に、ルトロールF68のモル数を（IFNに対して）25~200倍過剰にする。モル数は、50倍過剰にすることが好ましい（IFNの含有量が約150 µg/mlならば約3mg/ml）。

20

【0075】

安定化IFN液体製剤に含まれるプルロニック（特にプルロニック（登録商標）F68）の濃度は、約0.01mg/ml~約10mg/mlであることが好ましい。この値は、約0.05mg/ml~約5mg/mlであることがより好ましく、約0.1mg/ml~約2mg/mlであることがより一層好ましく、約1

30

【0076】

“酸化防止剤”という用語は、酸素または酸素由来のフリーラジカルが他の物質と相互作用するのを阻止する化合物を意味する。酸化防止剤は、物理的安定性と化学的安定性を大きくするために医薬系に一般に添加される多数の賦形剤の1つである。酸化防止剤は、ある種の薬または賦形剤が酸素に曝露されたりフリーラジカルの存在下に置かれたりしたときに起こる酸化プロセスを最少にするため、あるいは遅延させるために添加する。このプロセスは、光、温度、濃縮水素、微量の金属の存在、微量の過酸化物の存在を触媒として起こることがしばしばある。亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、チオ尿素、メチオニン、エチレンジアミン四酢酸の塩（EDTA）、ブチル化ヒドロキシルエン（BHT）、ブチル化ヒドロ

40

キシアニソール（BHA）が、薬剤中の酸化防止剤としてよく用いられる。EDTAナトリウムは、酸化反応を触媒する金属イオンを封鎖することによって酸化防止剤の活性を大きくすることがわかっている。最も好ましい酸化防止剤はメチオニンである。

【0077】

好ましくは、酸化防止剤（特にメチオニン）が、本発明によるヒドロゲル製剤の調製に用いる安定化IFN液体製剤の中に存在している安定剤である。一般に、メチオニンは、モル数を（IFNに対して）100~800倍過剰にして使用することができる。モル数は、400倍過剰にすることが好ましい（IFNの含有量が約150 µg/mlならば約0.4mg/ml）。

【0078】

メチオニンは、遊離塩基または塩の形態で存在することができる。メチオニンが遊離塩

50

基または塩の形態で存在している限り、メチオニンのあらゆる立体異性体（すなわちL、D、DL異性体）を本発明の方法または製剤で使用できる。L-立体異性体を用いることが好ましい。メチオニンのアナログを本発明の製剤で使用することもできる。“メチオニンのアナログ”という用語は、天然に存在するメチオニンの誘導体を意味する。本発明の製剤では、メチオニンのアナログを遊離塩基または塩の形態で用いることもできる。

【0079】

酸化防止剤（例えばメチオニン）を添加することによる安定性の増大および/または維持は、濃度に依存して起こる。すなわち、インターフェロン-ベータを含む本発明の製剤は、酸化防止剤が含まれていないと、通常は酸化したり、凝集体/オリゴマーが形成されたりするが、酸化防止剤の濃度を大きくすると、インターフェロン-ベータを含むその製剤の安定性が増大する、および/または維持される。酸化および/または凝集体/オリゴマーの形成を減らすために本発明の製剤で使用する酸化防止剤（例えばメチオニン）の量は、当業者に一般に知られている方法を利用すると、難しい実験を行なうことなく容易に決定することができる。

10

【0080】

“静菌”という用語は、製剤に抗菌剤として作用させるために添加する化合物または組成物を意味する。静菌剤の具体例としては、フェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベンなど）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、チメロサルなどがある。静菌剤はベンジルアルコールが好ましい。

20

【0081】

本発明のヒドロゲル製剤は、1回投与してもよいし、複数回投与してもよい。複数回の投与を想定している本発明の液体インターフェロン製剤は、静菌剤を含んでいることが好ましい。静菌剤としては、例えば、フェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベンなど）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、チメロサルなどがある。特に好ましいのはフェノール、ベンジルアルコール、m-クレゾールであり、より好ましいのはベンジルアルコールである。静菌剤は、製剤を複数回注射する期間の全体にわたって（注射に適した）実質的に細菌のない状態に維持するのに有効な濃度になるような量を使用する。その期間は、約12時間または24時間～約12日間にすることができ、約6～約12日間であることが好ましい。静菌剤は、約0.1%（静菌剤の重量/溶媒の重量）～約2.0%の濃度で存在していることが好ましい。この値は約0.2%～約1.0%であることがより好ましい。ベンジルアルコールの場合には、濃度が0.2%または0.3%であることが特に好ましい。

30

【0082】

しかし保存剤（例えばベンジルアルコール）の使用が複数回投与する製剤に限定されることはなく、1回投与用の製剤に添加することもできる。本発明の一実施態様は、ベンジルアルコールを含む1回投与用の製剤である。

【0083】

本発明の製剤は、pHが約3.0～約5.0であることが好ましい。この値は、約3.8～4.0であることがより好ましい。好ましい緩衝剤は酢酸塩であり、好ましい対イオンは、ナトリウム・イオンまたはカリウム・イオンである。酢酸塩緩衝剤は従来技術でよく知られている。全溶液中の緩衝剤の濃度は、約5mM、9.5mM、10mM、50mM、100mM、150mM、200mM、250mM、500mMにすることができる。緩衝剤の濃度は、約10mMであることが好ましい。特に好ましいのは、酢酸塩イオンが50mMで、pHが3.8の緩衝剤である。

40

【0084】

この明細書で使用方法が考えられる“シクロデキストリン”は、ベータ-シクロデキストリンのヒドロキシプロピル誘導体、ヒドロキシエチル誘導体、グルコシル誘導体、マルトシル誘導体、マルトトリオシル誘導体と、ガンマ-シクロデキストリンの対応する

50

誘導体である。ヒドロキシアルキル基は、1個以上のヒドロキシ基（例えばヒドロキシプロピル（2-ヒドロキシプロピル、3-ヒドロキシプロピル）、ジヒドロキシプロピルなど）を含むことができる。グルコシル誘導体、マルトシル誘導体、マルトトリオシル誘導体は、1個以上の糖残基（例えばグルコシルまたはジグルコシル、マルトシルまたはジマルトシル）を含むことができる。シクロデキストリン誘導体のさまざまな混合物（例えばマルトシル誘導体とジマルトシル誘導体の混合物）も使用できる。この明細書で使用する具体的なシクロデキストリン誘導体としては、ヒドロキシプロピル-ベータ-シクロデキストリン（HPCDまたはHPBCD）、ヒドロキシエチル-ベータ-シクロデキストリン（HEBCD）、ヒドロキシプロピル-ガンマ-シクロデキストリン（HPGCD）、ヒドロキシエチル-ガンマ-シクロデキストリン（HEGCD）、ジヒドロキシプロピル-ベータ-シクロデキストリン（2HPBCD）、グルコシル-ベータ-シクロデキストリン（ G_1 -ベータ-CDまたは G_1 BCD）、ジグルコシル-ベータ-シクロデキストリン（ $2G_1$ -ベータ-CDまたは $2G_1$ BCD）、マルトシル-ベータ-シクロデキストリン（ G_2 -ベータ-CDまたは G_2 BCD）、マルトシル-ガンマ-シクロデキストリン（ G_2 -ガンマ-CDまたは G_2 GCD）、マルトトリオシル-ベータ-シクロデキストリン（ G_3 -ベータ-CDまたは G_3 BCD）、マルトトリオシル-ガンマ-シクロデキストリン（ G_3 -ガンマ-CDまたは G_3 GCD）、ジマルトシル-ガンマ-シクロデキストリン（ $2G_2$ -ベータ-CDまたは $2G_2$ BCD）、ならびにこれらの混合物（例えばマルトシル-ベータ-シクロデキストリン/ジマルトシル-ベータ-シクロデキストリン）などがある。

【0085】

本発明の組成物で使用するヒドロキシプロピル-ベータ-シクロデキストリンは市販されており、本発明による好ましいシクロデキストリンの1つである。

【0086】

本発明の製剤に含まれるインターフェロンの濃度範囲は、約 $1.0\mu\text{g/ml}$ ～約 50mg/ml であるが、より低濃度でもより高濃度でもよく、予定する送達用ビヒクルまたは投与経路が何であるかによって異なる。例えば溶液製剤は、経粘膜ゲル用製剤（例えば頬間経路または鼻腔経路のためのIFNゲル組成物）では異なることになる。インターフェロンの濃度は、約 $5.0\mu\text{g/ml}$ ～約 2mg/ml であることが好ましい。この値は、約 $10\mu\text{g/ml}$ ～約 1mg/ml であることがより好ましく、約 $30\mu\text{g/ml}$ ～約 $100\mu\text{g/ml}$ であることが最も好ましい。

【0087】

本発明の製剤は、パッケージする時点でのインターフェロン活性の少なくとも約60%を12～24ヶ月の期間にわたって保持することが好ましい。この割合は、少なくとも約70%であることがより好ましく、少なくとも約80%であることが最も好ましい。

【0088】

本発明の持続放出製剤は、計算量のインターフェロン溶液を均一なポロキサマー溶液に添加する操作を含む方法で調製することができる。このインターフェロン溶液は、インターフェロン安定化溶液（例えば安定剤であるL-メチオニン、界面活性剤であるポロキサマー（例えばポロキサマー188）、またはこれらの混合物などを賦形剤として含むインターフェロン溶液）であることが好ましい。

【0089】

本発明の一実施態様によれば、本発明の製剤に対してはさらに、無菌条件下での濾過ステップを実施することができる（例えば、ポロキサマー・ヒドロゲルの粘性率が小さな値に維持される例えば4 という温度で $0.22\mu\text{m}$ の膜を用いて実施する無菌濾過）。

【0090】

本発明による製剤を室温において注射器に装填しやすくするため、ポロキサマー・ヒドロゲルが溶液からゲルに移る温度を変化させる賦形剤を添加することができる。添加は、液体ヒドロゲル溶液を形成する前（すなわちポロキサマーを添加する前）に緩衝溶液に対して行なうことが好ましい。ポロキサマー・ヒドロゲルが溶液からゲルへに移る温度を変化させる賦形剤の具体例は、ポリエチレングリコール、グリセリン（グリセロール 30° ）、糖類（例えばトレハロース）、シクロデキストリン（例えばヒドロキシプロピル-シクロデキストリン）である。

【0091】

本発明の一実施態様によれば、ヒドロゲル製剤は、4 における粘性率が、水の粘性率と200mPasの間の値である。この値は、100～150mPasの範囲であることが好ましい。粘性率がこの範囲だと、オートインジェクタやあらかじめ装填した注射器などの特別な装置に収容できて、皮下注射の後に“その場”でゲルを形成することができる。

【0092】

次に、得られた溶液を、バイアル、アンプル、カートリッジ、あらかじめ装填しておくタイプの注射器のいずれかに入れる。当業者であれば、このプロセスのいろいろな変形例を知っているであろう。例えば、成分を添加する順番、添加物を使用するかどうか、製剤を調製するときの温度とpHなどはすべて、濃度と投与法をどのようにするかを決める際に最適化すべき因子であろう。

10

【0093】

保管される製剤は、ヒドロゲルがゾルからゲルに転移する温度よりも低い温度で保管することが好ましいため、患者に透明な溶液として提供することができる。

【0094】

この明細書に記載したヒドロゲルに含まれるインターフェロンは、本発明に従い、従来技術でよく知られているさまざまな送達方法（例えば皮下注射、経粘膜インプラント、当業者に評価されている他の方法）を通じて患者に投与することができる。

【0095】

“バイアル”という用語は、広く、固体または液体の形態になった本発明の持続放出インターフェロン製剤を装填したときの無菌状態を維持するのに適した容器を意味する。この明細書で使用するバイアルの具体例としては、アンプル、カートリッジ、プリスター包装のほか、インターフェロンを注射器または経粘膜スプレーを通じて患者に送達するのに適した他の容器などがある。

20

【0096】

本発明の製剤は、あらかじめ装填した注射器として市販することもできる。

【0097】

本発明の製剤は、認可されている注射装置を用いて投与することができる。単一バイアル・システムを備える具体例としては、レビジェクト（登録商標）などの溶液を送達するためのオートインジェクタまたはペン式注射器がある。

30

【0098】

注射装置の針は、本発明のヒドロゲルの粘度に合うように選択する。例えば本発明のヒドロゲルは、さまざまなゲージの針（例えば18/23（18ゲージの針に等しい内径と、21ゲージの針の最小外径）または21/26（21ゲージの針に等しい内径と、26ゲージの針の最小外径））を備えた注射装置を用いて注射することができる。

【0099】

本発明の製剤は、ヒドロゲル用に認可されている装置を用いて投与することができる。例えばデポ・ワン・ニードル注射技術（インプリント・ファーマシューティカルズ社）を利用して本発明のヒドロゲルを注射することができる。

【0100】

本発明の文脈における“治療”という用語は、疾患の進行に関するあらゆる好ましい効果（例えば、疾患が発症した後の病状の展開が緩和、逆行、軽減、鈍化すること）を意味する。

40

【0101】

IFN、そのアイソフォーム、そのムテイン、その融合タンパク質、その機能性誘導体、その活性な断片、その塩のいずれかが含まれた本発明の医薬組成物は、このポリペプチドを用いた治療法に反応する臨床上的徴候を診断、予防、治療（局所または全身）するのに役立つ。そのような臨床上的徴候としては、例えば、中枢神経系（CNS）、脳、脊髄の異常や疾患（多発性硬化症など）；自己免疫疾患（関節リウマチ、乾癬、クローン病など）；がん（乳がん、前立腺がん、膀胱がん、腎臓がん、大腸がんなど）などがある。

50

【0102】

この明細書に引用したあらゆる参考文献（その中には、学术论文または要約、アメリカ合衆国またはそれ以外の国で公開または未公開の特許出願と付与済みの特許、他のあらゆる参考文献が含まれる）は、その引用文献に提示されているあらゆるデータ、表、図、文章を含め、その全体が参考としてこの明細書に組み込まれているものとする。さらに、この明細書で引用した参考文献の中で引用されている参考文献の全内容も、その全体が参考としてこの明細書に組み込まれているものとする。

【0103】

公知の方法のステップ、従来法のステップ、公知の方法または従来法への言及があるからといって、本発明の何らかの特徴、説明、実施態様が、関連する従来技術に開示、教示、示唆されていることを意味するものでは決してない。 10

【0104】

特別な実施態様に関する上記の説明により本発明の一般的な性質が十分に明らかになったはずであるゆえ、第三者は、従来技術での知識（その中にはこの明細書で引用した参考文献の内容が含まれる）を適用することにより、難しい実験を行ったり、本発明の一般的な考え方から逸脱したりすることなく、さまざまな用途のために実施態様を容易に変更および/または改変することができる。したがってそのような改変や変更は、この明細書に示した教えとガイドに基づく開示済みの実施態様の等価物の範囲に含まれるものとする。この明細書で用いる表現または用語は説明を目的としたものであって本発明を制限することは意図していないため、当業者は、この明細書の表現または用語を、この明細書に示した教えとガイドに当業者の知識を組み合わせるべきであることを理解されたい。 20

【0105】

本発明の一実施態様により、インターフェロン-ベータを含むポロキサマー・ヒドロゲルである医薬組成物が提供される。

【0106】

本発明のさらに別の実施態様により、組み換えインターフェロン-ベータ（例えば組み換えインターフェロン-ベータ1a）を含むポロキサマー・ヒドロゲルである医薬組成物が提供される。

【0107】

本発明の別の実施態様により、緩衝剤と酸化防止剤をさらに含む医薬組成物が提供される。 30

【0108】

本発明の別の実施態様により、緩衝剤と界面活性剤をさらに含む医薬組成物が提供される。

【0109】

本発明の別の実施態様により、ゾル-ゲル転移温度調節剤をさらに含む医薬組成物が提供される。

【0110】

本発明のさらに別の実施態様により、トレハロースとシクロデキストリンの中から選択したゾル-ゲル転移温度調節剤をさらに含む医薬組成物が提供される。 40

【0111】

本発明の一実施態様により、ポロキサマー407ヒドロゲルである医薬組成物が提供される。

【0112】

本発明のさらに別の実施態様により、約20~25% w/wのポロキサマー407を含むポロキサマー407ヒドロゲルである医薬組成物が提供される。

【0113】

本発明の好ましい実施態様により、組み換えインターフェロン-ベータ（例えば組み換えインターフェロン-ベータ1a）と、酢酸塩緩衝剤と、酸化防止剤としてのLメチオニンとを含む医薬組成物が提供される。 50

【0114】

本発明の別の好ましい実施態様により、組み換えインターフェロン-ベータ（例えば組み換えインターフェロン-ベータ1a）と、酢酸塩緩衝剤と、酸化防止剤としてのLメチオニンと、界面活性剤としてのポロキサマー188とを含むポロキサマー407ヒドロゲルである医薬組成物が提供される。

【0115】

本発明の別の好ましい実施態様により、組み換えインターフェロン-ベータ（例えば組み換えインターフェロン-ベータ1a）と、酢酸塩緩衝剤と、酸化防止剤としてのLメチオニンと、界面活性剤としてのポロキサマー188と、ゾル-ゲル転移温度調節剤としてのトレハロースとを含むポロキサマー407ヒドロゲルである医薬組成物が提供される。

10

【0116】

本発明の別の好ましい実施態様により、組み換えインターフェロン-ベータ（例えば組み換えインターフェロン-ベータ1a）と、酢酸塩緩衝剤と、酸化防止剤としてのLメチオニンと、ゾル-ゲル転移温度調節剤としてのシクロデキストリン（ヒドロキシプロピル-シクロデキストリンが好ましい）とを含むポロキサマー407ヒドロゲルである医薬組成物が提供される。

【0117】

本発明の別の好ましい実施態様により、以下のグループの中から選択した医薬組成物が提供される。

25% w/wのポロキサマー407

20

74.7% w/wの酢酸塩緩衝液（50mM/pH3.8）

0.012% w/wのr-hINFベータ1a

0.03% w/wのL-メチオニン

0.24% w/wのポロキサマー188

25% w/wのポロキサマー407

72.04% w/wの酢酸塩緩衝液（50mM/pH3.8）

0.012% w/wのr-hINFベータ1a

0.03% w/wのL-メチオニン

0.24% w/wのポロキサマー188

2.6% w/wのトレハロース

30

20% w/wのポロキサマー407

77.34% w/wの酢酸塩緩衝液（50mM/pH3.8）

0.015% w/wのr-hINFベータ1a

0.04% w/wのL-メチオニン

2.6% w/wのヒドロキシプロピル-シクロデキストリン

25% w/wのポロキサマー407

72.04% w/wの酢酸塩緩衝液（50mM/pH3.8）

0.012% w/wのr-hINFベータ1a

0.03% w/wのL-メチオニン

0.24% w/wのポロキサマー188

2.6% w/wのグリセロール30° Be

及び

25% w/wのポロキサマー407

72.04% w/wの酢酸塩緩衝液（50mM/pH3.8）

0.012% w/wのr-hINFベータ1a

0.03% w/wのL-メチオニン

0.24% w/wのポロキサマー188

50

2.6% w/wのPEG (ルトロール (登録商標) E400)

【0118】

本発明の別の実施態様により、本発明のIFNヒドロゲル医薬組成物を調製する方法であって、均一なポリマー溶液が形成される温度において緩衝溶液に計算量のポロキサマーを添加した後、インターフェロン、そのアイソフォーム、そのムテイン、その融合タンパク質、その機能性誘導体、その活性な断片のいずれかを添加する操作を含む方法が提供される。

【0119】

本発明のさらに別の実施態様により、本発明のIFNヒドロゲル医薬組成物を調製する方法であって、緩衝溶液が、トレハロースとシクロデキストリンの中から選択したゾル-ゲル転移温度調節剤、好ましくはヒドロキシプロピル-シクロデキストリンを含む方法が提供される。

10

【0120】

本発明のさらに別の実施態様により、本発明のIFNヒドロゲル医薬組成物を調製する方法であって、L-メチオニン、ポロキサマー-188、ならびにこれらの組み合わせの中から選択することが好ましい安定剤を含む溶液からインターフェロンを添加する方法が提供される。

【0121】

本発明のさらに別の実施態様により、本発明のINF-ベータ・ヒドロゲルを利用して多発性硬化症を治療するための医薬組成物を調製する方法が提供される。

20

【0122】

本発明のさらに別の実施態様により、多発性硬化症を治療する方法であって、本発明のINF-ベータ・ヒドロゲルを、それを必要としている患者に投与する操作を含む方法が提供される。

【0123】

これから本発明を以下の実施例を手がかりにして説明するが、本発明がこれら実施例に限定されると考えてはならない。実施例では、図面を参照することになる。

【0124】

実施例

以下の略号の定義をそれぞれ以下に示す。

30

cm (センチメートル)、cps (センチポアズ)、Da (ダルトン)、g (グラム)、 μ g (マイクログラム)、min (分)、mg (ミリグラム)、ml (ミリリットル)、mm (ミリメートル)、mM (ミリモル)、mPas (ミリパスカル秒)、rpm (1分あたりの回転数)、nm (ナノメートル)、CHO (チャイニーズ・ハムスター卵巣)、IFN (インターフェロン)、IU (国際単位)、i.v. (腹腔内)、EMEM (アール塩を含むイーグル最少必須培地)、FBS (ウシ胎仔血清)、GMS (モノステアリン酸グリセリル)、MTT (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸)、MS (多発性硬化症)、MW (分子量)、PBS (リン酸緩衝液)、PES (ポリエーテルスルホン)、PP (ポリプロピレン)、PVDF (ポリフッ化ビニリデン)、r-IFNベータ (組み換えインターフェロン・ベータ)、r-hIFN 1a (CHO細胞内で産生された組み換えインターフェロン・ベータ1a)、RIA (ラジオイムノアッセイ)、s.c. (皮下)、TIW (週に3回)、UI (国際単位)、VSV (水疱性口内炎ウイルス)。

40

【0125】

ポロキサマーの合成は、Schmolka、1977年、Journal of the American Oil Chemist's Society、第54巻、110~116ページに記載されている。ポロキサマーは市販されている。

【実施例1】

【0126】

ポロキサマー-407-r-hIFN 1aヒドロゲル(1)

【0127】

1. 一般的な調製手続き:

【0128】

50

氷浴の中に置いたポリプロピレン製ビーカー（タンパク質の吸着が少ない）の中で、計量したルトロール（登録商標）F127を、（500～800rpmで）磁気攪拌している冷たい（2～8℃）酢酸塩緩衝剤（50mM、pH3.8）にゆっくりと添加し、このポリマーを完全に溶かす。

【0129】

別の容器の中で、安定剤（例えばルトロール（登録商標）F68とL-メチオニン）を含む少量の酢酸塩緩衝剤を濃縮バルクr-hIFNベータ溶液（2mg/ml）に添加する。この緩衝剤を上記のポリマー溶液に添加し、攪拌速度を100～200rpmに落とし、タンパク質に加わる物理的応力を最少にする。最終組成物をポリプロピレン製注射器に2～8mlにて充填する。

【0130】

バルクr-hIFNベータ溶液は、限外濾過遠心分離（サートリアス・ヴィヴァスピン20ml、10 MWのカットオフが5000Da、2500rpm）によって0.348mg/mlから2mg/mlに濃縮した酢酸塩緩衝溶液である。濃縮したバルク溶液は、常に、以下の実施例1§5に記載したようにして最新のSEC-HPLC法で分析してアッセイと純度測定（モノマーの%）を行なう。

【0131】

2. r-hIFN-ベータ

【0132】

§1に示した一般的な手続きに従い、バルクのレピフ（登録商標）0.348mg/mlを使用し、安定剤の組み合わせ（例えばルトロール（登録商標）F68/L-メチオニン）を添加することによってr-hIFN 1aの安定化溶液を調製した。

【0133】

3. 賦形剤

【0134】

3.1. ルトロール（登録商標）F127（ポロキサマー、プルロニック、シンペロニック）

【0135】

ルトロールF127（ポリオキシエチレン-ポリプロピレン-ポリオキシエチレン・3ブロック・コポリマー、BASF社）は、ポリエチレンオキシドとポリプロピレンオキシドのブロック・コポリマーである。FDA不活性成分ガイドに掲載されている（i.v.注射、吸入、眼科用組成物、経口粉末、溶液、懸濁液、シロップ、局所用組成物）。UKヨーロッパ薬局方4、1777ページと、USP 24 NF19、2492～2493ページに、認可された非経口医薬として掲載されている。

【0136】

プルロニック（登録商標）F127に含まれるポリオキシエチレン（親水性）の割合は73%である（一般式（I）において（a）=（c）=67かつ（b）=98であるポロキサマー）。

【0137】

プルロニック（登録商標）F127の典型的な性質を以下に示す：

平均分子量：12600g/モル

融点：56

20℃における物理的形態：固体

77℃における粘性率：3100cps

25℃における濃度0.1%での表面張力：41ダイン/cm

ドレープス湿潤試験（3gmのフック、濃度0.1%、25℃）：>360秒

泡の高さ（ロス・マイルズ、0.1%、水性、50℃）：40mm

水溶液中での曇点、濃度1%：>100

25℃での水中におけるHLB（親水性-親油性バランス）：18～23

25℃における水への溶解度：>10%

【0138】

3.2. 氷酢酸、シグマ社

【0139】

3.3. ルトロール（登録商標）F68（ポロキサマー、プルロニック、シンペロニック）

【0140】

10

20

30

40

50

ルトロールF68 (ポリオキシエチレン-ポリプロピレン・ブロック・コポリマー、BASF社) は、ポリエチレンオキシドとポリプロピレンオキシドのブロック・コポリマーである。FDA不活性成分ガイドに掲載されている (i.v.注射、吸入、眼科用組成物、経口粉末、溶液、懸濁液、シロップ、局所用組成物)。UKヨーロッパ薬局方4、1777ページと、USP 24 NF19、2492~2493ページに、認可された非経口医薬として掲載されている。

【0141】

ブルロニック (登録商標) F68に含まれるポリオキシエチレン (親水性) の割合は80%であり、ポリオキシプロピレン (疎水性) の分子量は約1,967Daである (一般式 (1) において (a) = (c) = 79かつ (b) = 28であるポロキサマー)。

【0142】

ブルロニックF68の典型的な性質を以下に示す：

平均分子量：8400

融点 / 流動点：52

20 における物理的形態：固体

粘性率 (ブルックフィールド)：1000cps (25 で液体、60 でペースト、77 で固体)

25 における表面張力 (ダイン/cm)

濃度0.1%：50.3

濃度0.01%：51.2

濃度0.001%：53.6

25 におけるヌジールとの界面張力 (ダイン/cm)

濃度0.1%：19.8

濃度0.01%：24.0

濃度0.001%：26.0

25 におけるドレープス湿潤試験 (秒)

濃度1.0%：>360

濃度0.1%：>360

泡の高さ

50 におけるロス・マイルズ、0.1%：35mm

26 におけるロス・マイルズ、0.1%：40mm

400ml/分での動的挙動、0.1%：>600

水溶液中での曇点 ()

濃度1%：>100

濃度10%：>100

HLB (親水性-親油性バランス)：29

【0143】

3.4.L-メチオニン、シグマ社

【0144】

L-メチオニン (L-met) は、酸化を制限するために製剤中に0.03%のレベルで含まれている。したがってIFN-ベータ溶液が安定する。

【0145】

4. ヒドロゲル (1) 組成物

【0146】

r-hIFN-ベータ1aを120 µg/ml含んでいて以下の組成を持つヒドロゲル (1) を調製した：

ルトロール (登録商標) F127 25.0% w/w

酢酸塩緩衝剤 (50mM / pH3.8) 74.7% w/w

r-hIFN-ベータ1a 0.012% w/w

L-メチオニン 0.03% w/w

ルトロール (登録商標) F68 0.24% w/w

10

20

30

40

50

【0147】

ヒドロゲル(1)を実施例1、§1の一般的な手続きに従って製造した。そのとき、25gのルトロール(登録商標)F127溶液と3mgのr-hIFN-ベータ1aを使用した。

【0148】

5. 物理化学的性質

【0149】

- 粘性率

【0150】

このようなヒドロゲルの性質を明らかにして適切な注入プロトコルを決めるため、動的粘性率を調べた。ヴィスコスターLフンギラブ回転粘度計を使用し、粘性率をmPas(センチポアズ)単位で直接読み取った。ヒドロゲル(1)の50gのバッチを用意し、ポリプロピレン製バイアルの中に入れ、粘性率を測定している間を通じて氷浴($T=5\pm 2$)の中に保持した。報告された粘性率の値は、100~140mPasの範囲である(スピンドル第2番、スピンドルの速度は100rpmで、平衡時間は3分間)。

10

【0151】

- タンパク質の放出

【0152】

生理学的皮下状態に似た状態にするため、ヒドロゲル(1)からのIFN-ベータの放出をPBSの中で調べた。1gの製剤(1)を用い、4mlのPBS(pH7.4)の中への薬剤放出テストを 37 ± 2 にて実施した(振盪浴の速度=100rpm)。サンプルを5分、15分、30分、1時間、2時間の時点で回収した。

20

【0153】

蛍光検出器(Trp蛍光)を備えたSE-HPLCで各サンプルを分析し、ELISA法(東レ・キット)で確認した。この方法について以下に詳細に説明する。

【0154】

媒体中に検出されたIFN-ベータの量は、放出された全タンパク質の割合として表示した。2つの方法で得られた放出プロファイルから、2相放出パターンであることがわかる。すなわち早い開始段階の後に、よりゆっくりとした薬剤放出が続く(図1)。

【0155】

抽出手続きとSE-HPLC分析：

30

【0156】

ヒドロゲル系に組み込まれるIFN-ベータを抽出する方法を最適化して薬の回収量を測定するため、いろいろなテストを行なった。

【0157】

水とアセトンからなる水/有機溶媒混合物をベースとして、抽出手続きを以下のように設定した。

- ・遠心分離管に入れた1.0mlのアセトンに500mgのヒドロゲル組成物(1)を溶かし、10未満の超音波浴の中で2分間にわたって超音波処理した。
- ・水を添加して最終体積を3mlにした。
- ・サンプルを遠心分離(+4にて10,000rpmで5分間)によって取得した。
- ・液相を回収して分析した。

40

【0158】

この抽出手続きの後、サンプルを以下の操作条件下でSE-HPLCにより分析した。

- ・HPLCカラムTSK G2000 SW_{XL}コード番号08540(7.8mmID×30cm、5μm)
- ・注入体積100μl
- ・カラムの温度：室温
- ・サンプルの温度：室温
- ・流速：0.5ml/分(アイソクラティック)
- ・移動相：70%v/v精製水(MILLIQ-ミリポア)/30%v/vのアセトニトリル/0.2%v/v

のTFA

50

- ・実行時間：27分
- ・平衡時間：3分
- ・蛍光検出器の波長：励起が280nm、発光が348nm。

【0159】

ELISAテスト

【0160】

ELISAイムノアッセイ（東レ・キット）を使用し、IFNヒドロゲル（1）から放出されたIFN-ベータの濃度を調べた。このアッセイでは、1ステップ・サンドイッチ法を利用する。このアッセイは、r-hIFN-ベータに対するポリクローナル抗体でコーティングした96ウエルのマイクロプレートに基づいて実施する。r-hIFN-ベータに対して特異的な酵素結合モノクローナル抗体をウエルに添加した後、ピペットで基準とサンプルをウエルの中に入れる。r-hIFN-ベータが存在していれば、固定化した抗体と結合する。洗浄して結合しなかった抗体-酵素試薬をすべて除去した後、基質溶液をウエルに添加すると、最初のステップで結合したr-hIFN-ベータの量に比例した色が現われる。発色が止まったとき、色の強度を測定する。

10

【0161】

アッセイをマニュアルに従って実施したが、サンプルのインキュベーションを+4 にて一晚実施した点が異なっている。

【0162】

抗体でコーティングしたマイクロプレートを400 μ lの洗浄溶液で洗浄し、紙の上で乾燥させた。次に、ヒドロゲル（1）からの薬剤放出実験に由来する100 μ lのサンプル、または濃度曲線（0~200IU/ml）をもとにした参照用r-hIFN-ベータ1a（バルク）をあらかじめ満たしたマイクロプレートに、酵素で標識した抗体をウエル1つにつき50 μ l添加した。マイクロプレートを覆い、室温にて120分間にわたってインキュベートしている間を通じて振盪した。インキュベーションが終わるとサンプルを取り出し、マイクロプレートを3回洗浄し、紙の上で乾燥させた。100 μ lの発色溶液を各ウエルに添加した。30分間にわたってインキュベートした後、100 μ lの反応停止液を添加し、吸光度を450nmと650nmの2つの波長で読み取った（図1）。

20

【0163】

- 使用前の安定性

30

【0164】

IFNヒドロゲル（1）の安定性を、4 にて、t=0、24時間、1週間、1ヶ月、2ヶ月の時点で調べた。目視による薬の放出状態と、粘性率を調べた（スピンドル第2番、100rpm、T=6 \pm 2）。

【0165】

ヒドロゲル製剤（1）は少なくとも2ヶ月間は安定であった。

【実施例2】

【0166】

ポロキサマー407-r-hIFN-ベータ1aヒドロゲル（1）の生物活性

【0167】

ヒドロゲル製剤（1）から放出されたr-hIFN-ベータ1aの抗ウイルス活性をバルクのIFN-ベータで観測された生物活性と比較することにより、ヒドロゲル（1）の生物活性を明らかにする。

40

【0168】

この実験では、家畜に口蹄疫を起こすウイルスである水疱性口内炎ウイルス（VSV）がインターフェロンに対する感受性を持つためにこのウイルスを選択した。

【0169】

利用した抗ウイルス・アッセイは、WISH細胞系に対するウイルスの細胞変性効果がIFN-ベータによって抑制されることに基づいている。WISH細胞系は、r-hIFN-ベータ1aヒドロゲル・サンプルまたは参照用r-hIFN-ベータ1a（バルク）の連続希釈液（1：1.5に希釈）

50

をあらかじめ満たした96ウエルの微量滴定プレートに、5% FBSを含むEMEMの中に 4×10^4 細胞/ウエル (50 μ l/ウエル) の割合となるようにして入れた。細胞を37℃、5% CO₂のもとで18~22時間にわたってインキュベートした後、2.5% FBSを含むEMEMの中で調製した水疱性口内炎ウイルス (VSV) 懸濁液をウエル1つにつき50 μ lの割合で添加した。対照細胞のウエルには培地だけを入れ、ウイルス懸濁液は入れなかったのに対し、ウイルスのウエルにはVSV懸濁液だけを入れた。感染した細胞を37℃、5% CO₂のもとでさらに20~24時間にわたってインキュベートした後、5% MTT溶液で2時間にわたって染色した。実験が終了すると、上清を廃棄し、200 μ l/ウエルの割合で96% エタノールを添加してホルマザン塩を溶かした。プレートをプレート読取分光光度計の中で595nmにて読み取った。結果は、対照細胞に対する細胞変性効果の抑制率として表現した。

10

【0170】

ヒドロゲル製剤(1)から2時間後に放出されたr-hIFN-ベータ1aの試験管内での生物活性を、上記のWISHアッセイを利用し、2つの実験セットで測定した。r-hIFN-ベータ1aの濃度は37.7 μ g/mlであった。ヒドロゲルの調製に使用したr-hIFN-ベータ1aを含まないルトロール・ヒドロゲル(プラセボ)からの干渉があるかどうか、プラセボにバルクのr-hIFN-ベータ1aを添加することによって調べた。

【0171】

両方のバッチから2時間後に放出されたr-hIFN-ベータ1aは生物活性が維持されており、バルクのr-hIFN-ベータ1aをプラセボに添加した場合と比べて回収は完全であった(図2)。したがってポロキサマー・ヒドロゲルは、薬剤放出時にr-hIFN-ベータ1aの生物活性を完全に保持できるように見える。

20

【実施例3】

【0172】

ポロキサマー407-r-hIFN-ベータ1aヒドロゲル(1)の薬物動態プロファイル

【0173】

本発明のIFNポロキサマー・ヒドロゲルの持続放出特性を調べるには、このヒドロゲルの薬物動態プロファイルを、バルク製剤および他のゲル製剤の薬物動態プロファイルと比較するとよい。

【0174】

IFN-ベータ・ヒドロゲル製剤(1)の薬物動態プロファイルを投薬されたことのないカニクイザル(各群にオス2匹とメス2匹)で調べ、IFN-ベータ・リポゲル製剤の薬物動態プロファイルと比較した。

30

【0175】

サンプルは、19Gの針を備えた注射器にあらかじめ充填した状態で提供した。実験は、IFN-ベータ・ヒドロゲル(1)(120 μ g/ml)を週に1回s.c.注射した場合と、バルクのIFN-ベータの液体緩衝剤(pH3.8)を週に1回注射した場合(対照1)、またはIFN-ベータ・リポゲル(120 μ g/ml)を週に1回s.c.注射した場合(対照2)とを比較する設計にした(以下の表IVを参照)。

【0176】

サルに週に3回(TIW)(48時間間隔でt=0、48時間、96時間のときに3回s.c.注射)投与してMSを治療するレピフ(登録商標)投与計画を真似た別の対照群を利用した(対照3)

40

【0177】

対照1(グループ2)のIFN溶液は、50mMの酢酸塩緩衝剤に40 μ g/mlのIFNが含まれた溶液であった。

【0178】

対照2のIFN-ベータ・リポゲル組成物(グループ3)は以下の通りであった。

モノステアリン酸グリセリン(GMS) 22.37% w/w

(RYLO(登録商標)MG20 ファルマ、ダニスコ・カルトール社)

PEG400 63.09% w/w

50

(ルトロールE400、BASF社)
 酢酸 4.03% w/w
 酢酸塩緩衝剤 (50mM/pH3.8) 9.94% w/w
 r-hIFN-ベータ1a 0.01% w/w
 L-メチオニン (シグマ社) 0.03% w/w
 ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン 0.03% w/w
 (カバソールW7HP、ワッカー社)

【0179】

対照3のIFN溶液 (グループ4) は、50mMの酢酸塩緩衝剤に16 μg/mlのIFNが含まれた溶液であった。

10

【0180】

血液のサンプリングは投与前にも行ない、グループ1と3では注射後14日間 (336時間)、グループ2では注射後2日間がカバーされるように設計した。グループ4のサンプリングは、r-hIFN-ベータ1aを最初と最期に注射した後の薬物動態動態ファイルとネオプテリンの完全な薬物動態動態ファイルが得られるように設計した。

【0181】

r-hIFN-ベータ1aをELISA (富士レビオ社) によって上記のようにして定量した。ネオプテリンのレベルはRIAアッセイ (ICNバイオメディカル社) で定量した。

【0182】

【表4】

20

表IV

グループ	製剤のタイプ	投与量 (μg/kg)	注
1	IFN-ベータ・ヒドロゲル (1)	3. 67s. c.	ポロキサマー・ヒドロゲルをt=0に注射
2	IFN-ベータ (対照1)	3. 67s. c.	バルク溶液をt=0に注射
3	IFN-ベータ・リポゲル (対照2)	3. 67s. c.	モノステアリン酸グリセリル・リポゲルをt=0に注射
4	バルクのIFN-ベータ (対照3)	3×1. 223s. c.	バルク溶液をt=0、48時間、96時間のときに注射

30

【0183】

IFN- の放出 :

【0184】

ポロキサマー・ヒドロゲル (1) (グループ1) は、1回s.c.注射された後にr-hIFN-ベータ1aを制御されたパターンで放出し、血中レベルが約1週間 (おそらくそれ以上) にわたって5UI/mlを超えるレベルに維持されることがわかった (図3)。

【0185】

タンパク質の生物学的利用能は、対照として使用した緩衝溶液製剤 (1回だけのs.c.注射とTIWの注射の両方) およびリポゲル製剤よりも顕著に大きい (以下の表V)。

40

【0186】

図3と図4に示したように、ポロキサマー・ヒドロゲル (1) からのr-hIFN-ベータ1aの放出は、GMSをベースとしたリポゲル (グループ3) で得られたr-hIFN-ベータ1aの放出プロファイルと比べて著しく制御されたパターンを示す。リポゲル (グループ2) からのr-hIFN-ベータ1aの放出プロファイルは、より低い“バースト”と低くて長い安定状態を特徴とする。

【0187】

これらの結果から、対照2として使用したリポゲル製剤は、r-hIFN-ベータ1aの持続放出

50

に適していないことがわかる。

【0188】

【表5】

表V

薬物動態パラメータ	IFN-ベータ・ヒドロゲル (1)	IFN-ベータ・リポゲル (対照2)	IFN-ベータ (対照1)	バルクのIFN-ベータ (対照3) 1日目	バルクのIFN-ベータ (対照3) 5日目
T_{max} (時間)	8.0±0.0	1.5±0.5	1.3±0.5	1.8±0.5	1.4±0.5
C_{max} (IU/ml)	231.3±116.4	24.0±12.1	96.3±53.4	31.3±0.9	26.1±16.5
$T_{1/2}$ (時間)	19.4±2.4	45.1±77.6	9.5±3.8	6.1±2.8	8.0±3.5

10

【0189】

血清ネオプテリンのレベル上昇：

【0190】

薬物動態 (PD) の結果から、ゲルから放出される r-hIFN-ベータ1aの生物活性が確認された。ネオプテリンのレベルは、ヒドロゲル (1) の注射では対照 (対照1) と比べて t_{max} が約24時間ずれて上昇した。r-hIFN-ベータ1aを繰り返して投与する (TIW) と、PDプロファイルはより低くなったが延長した (対照3)。リポゲル製剤は、薬物動態プロファイルがより低かった (対照2)。

20

【0191】

対照リポゲル製剤の調製：

【0192】

ポリプロピレン製ピーカー (タンパク質の吸着が少ない) の中で、計量したGMSとPEGを酢酸塩緩衝剤 (50mM、pH4~5) と混合し、水浴 (40) の中に数分間入れることで、溶けて均一になった脂質マトリックスを得た。

【0193】

別の容器の中で、安定剤と賦形剤 (すなわちシクロデキストリンとL-メチオニン) を含む少量の酢酸塩緩衝剤 (50mM、pH4~5) を濃縮バルク r-hIFNベータ溶液 (2mg/ml) に添加する。この緩衝液をまず最初に水浴 (40) の中に約1.5分間入れた後、上記の脂質混合物に添加する。

30

【0194】

次にこの混合物を水浴に約5~10分間入れた後、ポリプロピレン製の棒でゆるやかに攪拌しながら室温まで冷却する。

【0195】

これらの結果から、ヒドロゲル (1) は r-hIFN-ベータ1a対照液体製剤と似た生物活性を持つことと、少なくとも1週間にわたって r-hIFN-ベータ1aの血中レベルを維持できて生物学的利用能が改善されていることがわかる。

40

【実施例4】

【0196】

ポロキサマー407-r-hIFN-ベータ1aヒドロゲル (1) の無菌濾過

【0197】

IFN-ベータを含む単一相ヒドロゲル溶液は、無菌濾過で処理することができよう。IFN-ヒドロゲル (1) は実施例1に記載したようにして調製した。

【0198】

PALL社からの直径が47mmでカットオフが0.2mmの2つの異なる膜 (PVDF：ポリフッ化ビニリデンとPES：ポリエーテルスルホン) を、溶液の粘性率が小さく保たれる温度 (例えば4) で使用した。

50

【0199】

粘性率は、レオメーター（ヴィスコスターLフンギラブ）で濾過する前後に測定する。50mlのヒドロゲル（1）をポリプロピレン製バイアルに入れ、氷浴（ $T=5\pm 2$ ）の中に保持する。そのときスピンドル第2番を100rpmにする。濾過によるレオロジーの有意な変化は観察されなかった。

【0200】

IFNを含むヒドロゲル（1）のIFNモノマーの含有量と放出動態をSEC HPLC/蛍光検出器（PBS（pH7.4）、37、100rpm、4mlのPBSの中にヒドロゲル（1）が1g）によって分析した。濾過後に得られた放出プロファイルは、濾過前のものと非常によく似ているため、濾過によってヒドロゲルのIFN放出特性は変化していない。

10

【実施例5】

【0201】

ポロキサマー407-r-hIFN-ベータ1aヒドロゲル（2）

【0202】

IFN-ヒドロゲル（2）を実施例1に記載したようにして調製し、ポロキサマー・ヒドロゲル溶液を形成する前に（すなわちポロキサマー407を添加する前に）、2.6% w/wのトレハロース（シグマ社）を緩衝溶液に添加する。

【0203】

ヒドロゲル（2）組成物：

ポロキサマー407 25% w/w

酢酸塩緩衝剤 50mM / pH3.8 72.04% w/w

r-hIFNベータ1a 0.012% w/w

L-メチオニン 0.03% w/w

ポロキサマー188 0.24% w/w

トレハロース 2.6% w/w

20

【0204】

- 粘性率

【0205】

ヒドロゲル（2）の特徴とその注射可能性を明らかにするため、動的粘性率を調べた。ヴィスコスターLフンギラブ回転粘度計を使用し、粘性率をmPas（センチポアズ）単位で直接読み取った。ヒドロゲル（2）をポリプロピレン製バイアルの中に入れ、温度を変化させて粘度計のディスプレイ上の値を連続的に読み取りながら粘性率を測定した（SPL4、速度の範囲は200~300rpm）。

30

【0206】

結果から、ヒドロゲル（1）と比較してヒドロゲル（2）のレオロジー的挙動が異なっていることがわかる。本発明のヒドロゲル（2）でトレハロースを2.6% w/w使用すると、ゾル-ゲル転移温度が上昇する（図5）。するとマトリックスの製造条件が改善され、取り扱いが容易になる。

【実施例6】

【0207】

ポロキサマー407-r-hIFN-ベータ1aヒドロゲル（3）

【0208】

IFN-ヒドロゲル（3）を実施例1に記載したようにして調製したが、磁気攪拌している（500~700rpm）緩衝溶液にポロキサマー407を添加する前に、2.6% w/wのヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン（カバソールW7HP、ワッカー社）を添加する。次に、実施例1に記載したように、磁気攪拌しているヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン/緩衝溶液にポロキサマー407を添加する。

40

【0209】

ヒドロゲル（3）組成物：

ポロキサマー407 20% w/w

50

酢酸塩緩衝剤 50mM / pH3.8 77.34% w/w

r-hIFNベータ1a 0.015% w/w

L-メチオニン 0.04% w/w

カバソールW7HP 2.6% w/w

【0210】

- 粘性率

【0211】

ヒドロゲル(3)の特徴とその注射可能性を明らかにするため、動的粘性率を調べた。ヴィスコスターLフンガラ回転粘度計を使用し、粘性率をmPas(センチポアズ)単位で直接読み取った。ヒドロゲル(3)をポリプロピレン製バイアルの中に入れ、温度を変化させて粘度計のディスプレイ上の値を連続的に読み取りながら粘性率を測定した(SPL4、速度の範囲は200~300rpm)。

10

【0212】

図5に示した結果から、ヒドロゲル(1)と比較してヒドロゲル(3)のレオロジー的挙動が異なっていることがわかる。ヒドロゲル(3)のゾル-ゲル転移温度は、約11 から23 へと上昇する。

【0213】

驚くべきことに、ヒドロゲル(3)のゾル-ゲル転移温度のシフトは、使用したマトリックス形成ポロキサマー407(20% w/w)の濃度がヒドロゲル(2)よりも低いにもかかわらず、トレハロースを含むヒドロゲル(2)のゾル-ゲル転移温度のシフトと比べてはるかに大きい(図5)。そのため、マトリックスの製造条件が顕著に改善され、取り扱いがはるかに容易になる。

20

【0214】

- タンパク質の放出

【0215】

生理学的皮下状態に似た状態にするため、すでに説明したようにして、ヒドロゲル(3)からのIFN-ベータの放出をPBSの中で調べた。(あらかじめ装填した注射器を用いて供給する)1gのヒドロゲル(1)を用い、4mlのPBS(pH7.4)の中への薬剤放出テストを37±2にて実施した(振盪浴の速度=100rpm)。サンプルを5分、15分、30分、1時間、2時間の時点で回収した。

30

【0216】

各サンプルを、蛍光検出器(Trp蛍光)を備えたSE-HPLCで分析した。

【0217】

シクロデキストリンを含むヒドロゲル(3)の持続放出特性(IFN-ベータ放出プロファイル)は、ゾル-ゲル転移温度がシフトしているにもかかわらず、ゾル-ゲル転移温度調節剤なしのヒドロゲル(すなわちヒドロゲル(1))の持続放出特性と同等である(図6)。実施例2に記載した抗ウイルスアッセイから、バルクのr-hIFN-ベータ1aをプラセボに添加した場合と比べ、シクロデキストリンを含むヒドロゲル(3)から2時間後に放出されたr-hIFN-ベータ1aが生物活性を維持していることと、回収は完全であることが観察された。したがってシクロデキストリンを含むヒドロゲル(3)は、薬剤放出時にr-hIFN-ベータ1aの生物活性を完全に保持できるように見える。

40

【実施例7】

【0218】

ポロキサマー407-r-hIFN-ベータ1aヒドロゲル(4)

【0219】

IFN-ヒドロゲル(4)を実施例1に記載したようにして調製したが、ポロキサマー・ヒドロゲル溶液を形成する前に(すなわちポロキサマー407を添加する前に)、2.6% w/wのグリセロール30°Be(カルロ・エルバ社)を添加した。

【0220】

ヒドロゲル(4)組成物:

50

ポロキサマー407 25% w/w
 酢酸塩緩衝剤 (50mM / pH3.8) 72.04% w/w
 r-hIFNベータ1a 0.012% w/w
 L-メチオニン 0.03% w/w
 ポロキサマー188 0.24% w/w
 グリセロール30° Be 2.6% w/w

【実施例8】

【0221】

ポロキサマー407-r-hIFN-ベータ1aヒドロゲル(5)

【0222】

IFN-ヒドロゲル(5)を実施例1に記載したようにして調製したが、ポロキサマー・ヒドロゲル溶液を形成する前に(すなわちポロキサマー407を添加する前に)、2.6% w/wのPEG(ルトロール(登録商標)E400、BASF社)を添加した。

【0223】

ヒドロゲル(5)組成物:

ポロキサマー407 25% w/w
 酢酸塩緩衝剤 (50mM / pH3.8) 72.04% w/w
 r-hIFNベータ1a 0.012% w/w
 L-メチオニン 0.03% w/w
 ポロキサマー188 0.24% w/w
 PEG(ルトロール(登録商標)E400) 2.6% w/w

【実施例9】

【0224】

注射器の排出テスト

【0225】

さまざまなタイプの針を用いた注射器の排出テストにより、IFNポロキサマーをベースとしたヒドロゲルを皮下注射できるかどうかを調べることができる。

【0226】

特に、デポ・ワン(インプリント・ファーマシューティカルズ社)と呼ばれる新しい注射技術を利用して注射器の排出テストを実施する。

【0227】

選択したデポ・ワン針は以下の通りである。

- 18/23(18ゲージの針と同等の内径と、21ゲージの針の最小外径)
- 21/26(21ゲージの針と同等の内径と、26ゲージの針の最小外径)。

【0228】

3mlのポリプロピレン製注射器に(4に維持した)0.5mlのヒドロゲル(1)またはヒドロゲル(3)を装填し、約15分間にわたって室温にした後、ポリスチレン製バイアルの中に排出した。“針の性能”を、注射器から内容物を排出するのに必要な力をもとにして評価する。

【0229】

室温での注射器の排出テストから、ヒドロゲル(3)が室温で非常に優れた排出特性を持つことがわかる。

【実施例10】

【0230】

ポロキサマー407-r-hIFN-ベータ1aヒドロゲル(3)の薬物動態プロファイル

【0231】

ポロキサマー407-r-hIFN-ベータ1aヒドロゲル(3)の薬物動態プロファイルは、以前にr-hIFN-ベータ1aの治療も他の研究薬の治療も受けたことのないオスのカニクイザル(捕獲して育てたマカカ・ファスキュラリス)で調べることができる。

【0232】

10

20

30

40

50

動物：

【0233】

体重の範囲：実験開始時に2～4kg

年齢の範囲：約5歳

グループ1つあたりの動物数：4

【0234】

投与前に一晚（すなわち約16時間）断食させた動物に製剤を投与する。餌を治療から4時間後に再び与える。水は“自由に”飲めるようにする。

【0235】

21Gの針を備えていてあらかじめ320mgが装填された各注射器の中に、r-hIFN-1aヒドロゲル製剤（3）を1gにつき174 μ gの割合で入れる。ゲルの形成が熱に対して可逆的であるため、あらかじめ装填された注射器を4で保管し、投与に必要な時間だけ室温に維持せねばならない。

【0236】

動物1頭につき44 μ gのr-hIFN-1aを一方の脚に1回皮下注射する。あらかじめ装填されている注射器のr-hIFN-ベータ1aヒドロゲル製剤（3）200～250mgをグループ1の各カニクイザル（動物1～4）に投与する。あらかじめ装填されているガラス製注射器の重量を投与の前後に測定し、正確な投与量を評価できるようにする。

【0237】

血液を頭部静脈から回収して試験管に入れる。そのやり方については以下の表に詳しく記載してある。

【0238】

【表6】

表VI

サンプリング時刻	血液サンプル中のIFN-ベータの分析	血液サンプル中のネオプテリンの分析	採取した血液の合計量
実験前（-1日目）	-	×	0.5ml
投与前（0時間）	×	×	1.5ml
30分	×	-	1.0ml
1時間	×	-	1.0ml
2時間	×	-	1.0ml
4時間	×	-	1.0ml
6時間		×	0.5ml
8時間	×	-	1.0ml
24時間	×	×	1.5ml
32時間	×	×	1.5ml
48時間	×	×	1.5ml
56時間	×	×	1.5ml
72時間	×	×	1.5ml
96時間	×	×	1.5ml
104時間	×	×	1.5ml
120時間	×	×	1.5ml
168時間	×	×	1.5ml

【0239】

血液サンプルを室温で60分間にわたって凝固させる。凝固物を4にて15分間にわたっ

て2,500×g (3350rpm) で遠心分離することによって沈澱させる。

【0240】

0.5mlの血液を採取したときには、2つの血清アリコートにする。第1のアリコートは血清が少なくとも0.125mlであり、第2のアリコートは残りの血清である。

【0241】

1.0mlの血液を採取したときには、2つの血清アリコートにする。第1のアリコートは血清が少なくとも0.250mlであり、第2のアリコートは残りの血清である。

【0242】

1.5mlの血液を採取したときには、3つの血清アリコートにする。第1と第2のアリコートは血清が少なくとも0.250mlであり、第3のアリコートは残りの血清である。

10

【0243】

r-hIFN-ベータ1aを分析するための血清サンプルは-80 で保管する。

【0244】

ネオプテリンを分析するための血清サンプルは-20 で保管する。

【0245】

以下の薬物動態パラメータを、1回投与した後の時間（時間を単位として表示）に対するr-hIFN 1aの個々の血清濃度（IU/mlで表示）から取得する。

【0246】

観測による直接取得：

C_{max} ：血清中で見られる最大濃度。

20

T_{max} ：投与してから C_{max} が見られるまでに要する時間。

T_z ：定量可能な濃度が見られる最終サンプリング時刻。

C_z ：サンプリング時刻 T_z に得られた濃度の値。

【0247】

WinNonlin（登録商標）プログラムによる：

AUC_z ：血清濃度とサンプリング時刻 T_z までの時間の関係を表わす曲線よりも下の面積。対数-直線台形ルール（ C_{max} までは直線、 C_{max} の後は対数）で計算する。

T_{lin} ：排出半減期を決定するために考慮する最初の点。

z ：排出速度定数。（ T_{lin} から T_z まで）最終濃度の自然対数と時間の関係にフィットさせた直線回帰曲線の傾斜によって計算する。

30

$t_{1/2}$ ：排出半減期。 $t_{1/2}=(\ln 2)/z$ という式で計算する。

AUC ：血清濃度と時間の関係を表わす曲線よりも下の面積。以下の式： $AUC=AUC_z+C_z/z$ によって計算する。

$\%AUC_{ext}$ ：外挿した（すなわち外挿によって得られた） AUC の割合。以下の式： $\%AUC_{ext}=[(AUC-AUC_z)/AUC]\times 100$ によって計算する。

【0248】

この実験は、市販されている参照基準としてのIFN 製剤（例えばレビフ（登録商標）：ヒト血清アルブミン（HSA）と、マンニトールと、酢酸ナトリウムを賦形剤として含み、強度が44 μ gのr-hIFN 1a（12MIU）である製剤溶液が、21Gの針を備えていて注射体積が0.5mlである注射器にあらかじめ装填されているもの）を用いてグループ2の動物に対しても並行して実施することができる。この場合、レビフ（登録商標）をあらかじめ装填した1つの注射器の全内容物（0.5ml）を、グループ2の各カニクイザル（動物5～8）に投与する（1頭に1つの注射器）。

40

【0249】

【表 7】

表VII

	T _{max} (時間)	C _{max} (時間)	AUC _{最終} (時間×IU/ml)	T _{最終} (時間)	C _{最終} (IU/ml)	AUC (0~72) (時間×IU/ml)
平均値	12	1930	54300	96	9.64	53900
標準偏差	8.0	992	16000	16	5.10	15800
CV%	67	51.3	29.4	17	52.9	29.3

10

【0250】

結果から、r-hIFN 1aヒドロゲル製剤(3)が大きな生物活性を有することがわかる。

【図面の簡単な説明】

【0251】

【図1】pHが7.4で37℃のPBSの中にr-hIFN 1aポロキサマー・ヒドロゲル(1)から放出されたr-hIFN 1aの割合をSE-HPLC/蛍光検出器()とELISAアッセイ(黒四角)で測定し、ヒドロゲルをPBSの中に注入してからの時間に対してプロットしたグラフである(実施例1)。

【図2】2時間後にr-hIFN 1aポロキサマー・ヒドロゲル(1)から放出されたr-hIFN 1aの抗ウイルス活性()を、バルクのr-hIFN 1a()およびr-hIFN 1aなしのポロキサマー・ゲルと混合したバルクのr-hIFN 1a(プラセボ)(黒三角)と比較したグラフである。抗ウイルス活性は、VSVを感染させた後に生き延びた細胞(WISH細胞)の割合として表示してある(実施例2)。

【図3】投薬されたことのないカニクイザルのr-hIFN 1aの血中濃度の時間変化を、3.6 μg/kgのr-hIFN 1aポロキサマー・ヒドロゲル(1)を1回皮下注射した後(黒四角)、または3.6 μg/kgのバルクのr-hIFN 1aを1回皮下注射した後(対照1:)、または各回1.223 μg/kgを48時間間隔で1週間以内に3回(t=0、48時間、96時間)皮下注射した後(対照3:)に調べた結果を示すグラフである(実施例3)。

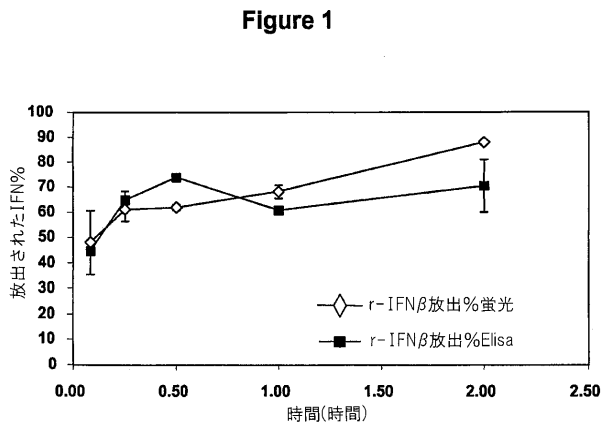
【図4】投薬されたことのないカニクイザルのr-hIFN 1aの血中濃度の時間変化を、3.6 μg/kgのr-hIFN 1aGMSリポゲルを1回皮下注射した後(対照2:)、または各回1.223 μg/kgを48時間間隔で1週間以内に3回(t=0、48時間、96時間)皮下注射した後(対照3:)に調べた結果を示すグラフである(実施例3)。

【図5】ルトロール・ヒドロゲル製剤(1)()の粘性率のプロファイルを、2.6% w/wのトレハロースを含むルトロール・ヒドロゲル製剤(2)(黒四角)および2.6% w/wのヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンを含むルトロール・ヒドロゲル製剤(3)(黒三角)と比較したグラフである。

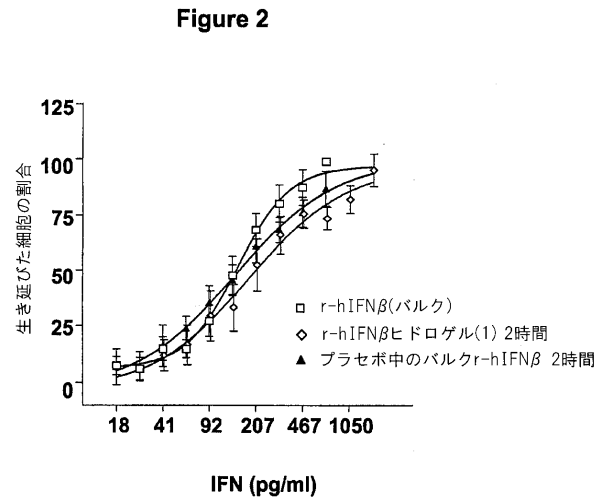
【図6】pHが7.4で37℃のPBSの中にr-hIFN 1aポロキサマー・ヒドロゲル(3)(ポロキサマー407が20% w/w; 酢酸塩緩衝液(50mM/pH3.8)が77.34% w/w; r-hIFN 1aが0.015% w/w; L-メチオニンが0.04% w/w; ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンが2.6% w/w)から放出されたr-hIFN 1aの割合をSE-HPLC/蛍光検出器で測定した結果を示すグラフである。

40

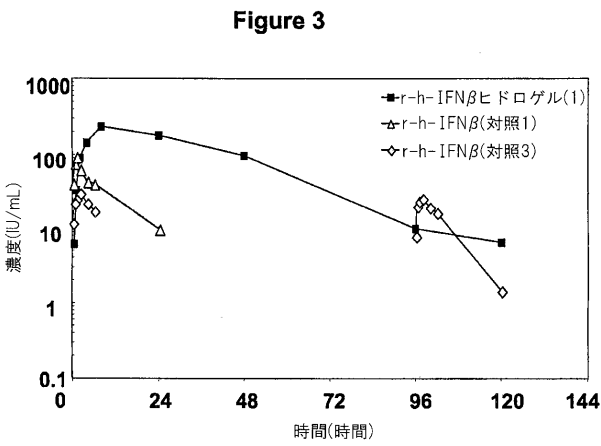
【 図 1 】



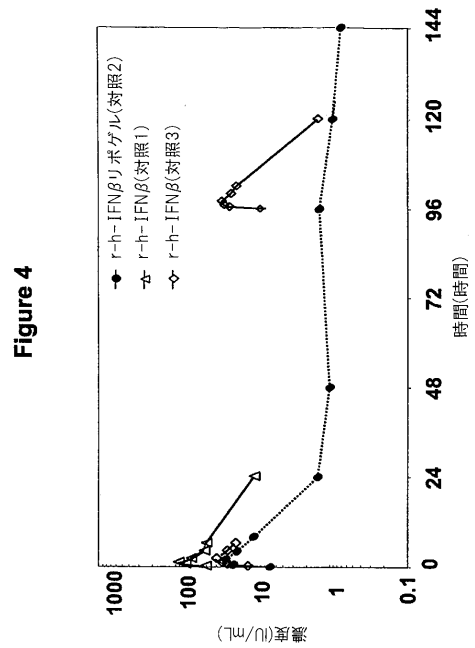
【 図 2 】



【 図 3 】

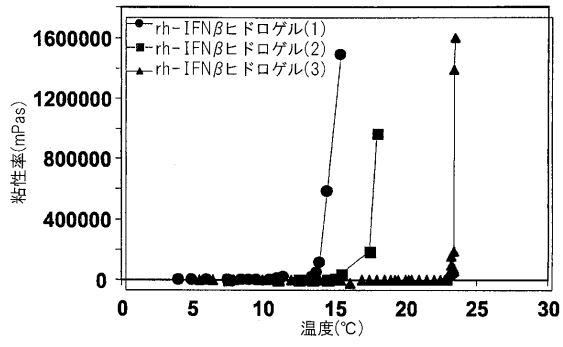


【 図 4 】



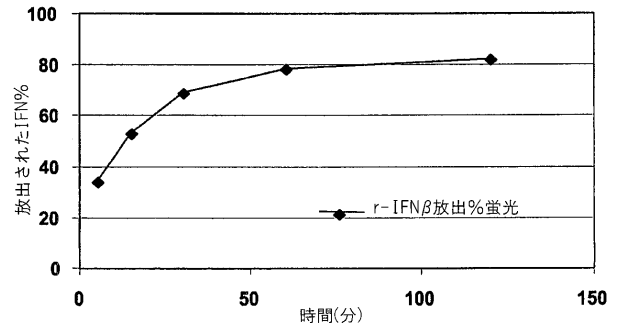
【 図 5 】

Figure 5



【 図 6 】

Figure 6



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP2005/052219

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K38/19		
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) IPC 7 A61K		
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, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 200406 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 2004-056676 XP002301962 & JP 2003 342193 A (OTSUKA PHARM CO LTD) 3 December 2003 (2003-12-03) abstract</p> <p>-----</p>	1
X	<p>EP 0 098 110 A (JAPAN CHEM RES) 11 January 1984 (1984-01-11) page 1, line 1 - page 3, line 1 page 3, lines 20,21; claims 1,3; example 3</p> <p>----- -/--</p>	1,2
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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. *8* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 July 2005		Date of mailing of the international search report 10/08/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Engl, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/052219

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 01/58474 A (SCHER DAVID S ; ALKERMES INC (US); JOHNSON J KEITH (US); TRACY MARK A) 16 August 2001 (2001-08-16) page 4, lines 2-9 page 5, lines 10-20 page 8, lines 13-19 page 23, line 8; claim 11</p>	1-14
X	<p>US 4 469 228 A (YUEN PUI-HO ET AL) 4 September 1984 (1984-09-04) column 1, lines 26-40 column 4, lines 10-43 column 5, lines 3-7</p>	1-20
X	<p>EP 0 177 153 A (SCHERING CORP) 9 April 1986 (1986-04-09) page 13, lines 4-10</p>	1
X	<p>WO 2004/002404 A (NASTECH PHARM CO) 8 January 2004 (2004-01-08) page 3, lines 21-32 page 6, lines 18-22 page 152, lines 11-20 page 168, line 9 page 170, line 8 page 173, line 5 page 175, line 5</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP2005/052219

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2003342193	A	03-12-2003	NONE	
EP 0098110	A	11-01-1984	JP 58225025 A JP 1784880 C JP 4063053 B JP 59059629 A DE 3380726 D1 EP 0098110 A2 US 4609546 A	27-12-1983 31-08-1993 08-10-1992 05-04-1984 23-11-1989 11-01-1984 02-09-1986
WO 0158474	A	16-08-2001	US 6465425 B1 AU 767632 B2 AU 3317501 A CA 2400186 A1 EP 1253936 A2 JP 2003522156 T WO 0158474 A2 US 2003138491 A1	15-10-2002 20-11-2003 20-08-2001 16-08-2001 06-11-2002 22-07-2003 16-08-2001 24-07-2003
US 4469228	A	04-09-1984	AU 559039 B2 AU 2882384 A CA 1218602 A1 DK 262584 A EP 0127130 A2 GB 2140690 A ,B HU 34126 A2 IL 71957 A JP 60069036 A NZ 208301 A PT 78655 A ,B ZA 8404045 A	19-02-1987 06-12-1984 03-03-1987 01-12-1984 05-12-1984 05-12-1984 28-02-1985 31-07-1987 19-04-1985 05-12-1986 01-06-1984 30-01-1985
EP 0177153	A	09-04-1986	US 4636383 A AT 57097 T DE 3579989 D1 EP 0177153 A2 JP 61065824 A	13-01-1987 15-10-1990 08-11-1990 09-04-1986 04-04-1986
WO 2004002404	A	08-01-2004	AU 2003267965 A1 CA 2486531 A1 EP 1539220 A2 WO 2004002404 A2 US 2004037809 A1	19-01-2004 08-01-2004 15-06-2005 08-01-2004 26-02-2004

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 47/40	(2006.01)	A 6 1 K 47/40	
A 6 1 K 47/20	(2006.01)	A 6 1 K 47/20	
A 6 1 K 47/14	(2006.01)	A 6 1 K 47/14	
A 6 1 K 47/10	(2006.01)	A 6 1 K 47/10	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	

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

(74) 代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(72) 発明者 デル クルト, マリア ドルリー

イタリア国, イ - 2 7 0 5 0 コルビノ サン クイリコ, ビア オラトリオ, 4

(72) 発明者 ザンバルディ, イラリア

イタリア国, イ - 1 0 0 1 0 パレラ, ビア ルイージ バラッティア, 3

(72) 発明者 ポンピリ, シルビア

イタリア国, イ - 6 3 0 3 9 サン ベネデット デル トロント, ビア ルイージ フェッリ, 2 9

(72) 発明者 エスポシト, ピエランドレア

イタリア国, イ - 1 0 0 1 5 イブレア, ビア ラゴ エッセ. ミケレ, 1 2 ビ

F ターム(参考) 4C076 AA09 AA94 AA95 BB11 CC01 CC29 CC47 DD09 DD41Z DD55

DD67 EE23F EE39 FF16 FF17 FF31 FF35

4C084 AA02 AA03 BA44 DA23 MA05 MA66 NA12 NA13 ZA15 ZC02