



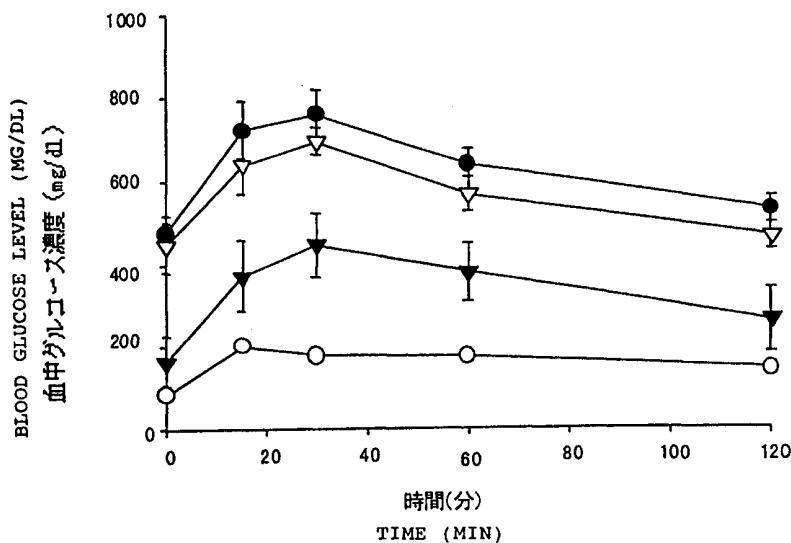
PCT

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7 A61K 38/00, 38/08, 38/10, 38/17, A61P 3/10</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/25803</p> <p>(43) 国際公開日 2000年5月11日(11.05.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05989</p> <p>(22) 国際出願日 1999年10月28日(28.10.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/310343 1998年10月30日(30.10.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 佐藤 純(SATO, Jun)[JP/JP] 〒666-0143 兵庫県川西市清和台西1丁目5番117号 Hyogo, (JP)</p> <p>大町佳宏(OMACHI, Yoshihiro)[JP/JP] 〒532-0023 大阪府大阪市淀川区十三東5丁目4番14号 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 朝日奈忠夫, 外(ASAHINA, Tadao et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開 ; 補正書受領の際には再公開される。</p>	

(54)Title: BETACELLULIN PROTEIN-CONTAINING PREPARATIONS

(54)発明の名称 ベータセルリン蛋白質含有製剤



(57) Abstract

1) Sustained release preparations containing a betacellulin protein, its mutein or a salt thereof; and 2) preparations for topical administration to the pancreas containing a betacellulin protein, its mutein or a salt thereof. Because of improving pancreatic functions, these preparations are useful in treating or preventing diabetes, etc.

(57)要約

本発明の1) ベータセルリン蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有する徐放性製剤、および2) ベータセルリン蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有する膵臓への局所投与剤は、膵臓機能を改善させ、糖尿病等の治療又は予防に有用である。

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)

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

明 細 書

ベータセルリン蛋白質含有製剤

5 技術分野

本発明は、ベータセルリン蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有する製剤に関する。

背景技術

10 ベータセルリン蛋白質（以下、BTC蛋白質と略記する場合がある）は、トランスジェニックマウス由来膵臓ベータ腫瘍細胞が産生する蛋白性因子で、その全アミノ酸配列はcDNAの解析から明らかにされている（Shingら；サイエンス（Science）、259：1604（1993）、Sasadaら；バイオケミカル・

15 Biophysical Research Communications）、190：1173（1993））。

当初、BTC蛋白質はマウス3T3細胞に対する増殖促進活性をもつ因子として見出されたが、その後、血管平滑筋細胞、網膜色素上皮細胞に対しても増殖促進活性を有することが見出されている（Shingら；サイエンス（Science）、259：1604（1993））。また、BTC蛋白質は創傷、潰瘍や血管奇形

20 の治療、あるいは糖尿病において認められるアテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症のような平滑筋細胞増殖に起因する病気の治療に使用できる競合剤（例えば抗体、偽ペプチド等）の作成等に用いられることが報告されている（特開平4-352800号公報及び特開平6-87894号公報）。

一方、糖尿病は、高血糖が持続することにより様々な合併症を引き起こす疾病であることが知られている。この疾病はインスリン依存型、インスリン非依存型及びその他に分類され、多様な成因によって起こると考えられているが、基本的にはインスリン作用の不足により発症し、特に、インスリン依存型糖尿病では産生されるインスリン量の絶対的な不足がその原因となっている。

小島らは、インスリンを産生する膵臓ベータ細胞への未分化膵臓幹細胞の分

化を促進する作用を有するBTC蛋白質をアロキサン腓部分灌流糖尿病モデルマウスに1mg/kg体重/日で8週間連日皮下投与したところ、耐糖能が改善され、BTC蛋白質又はそのムテインを含有する腓臓機能改善剤が糖尿病等の治療又は予防に有用であることを報告している（特開平9-188630号公報等）。

BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の体内動態は分布容積、体内消失クリアランスが大きく、血中半減期が20分程度であることから、腓臓機能改善効果を得るためにはBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を高投与量で長期間投与することが必要となる。しかしながら、例えばBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の水溶液を皮下投与する場合には、副作用の発現や、治療又は予防の現実的な投与において患者の不便性や苦痛が懸念される。従って、これらの問題を解決できるBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有する有用な製剤の開発が望まれている。

15 発明の開示

本発明者らは、上記の課題に鑑み、鋭意研究を重ねた結果、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を徐放性製剤として投与（特に局所投与）すると、意外にも、多分化能を有する腓外分泌腺由来細胞に作用して、これを有効にベータ細胞等へ分化させるほか、長期間にわたりBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩が徐放され、薬効を得るために高投与量を必要としないため副作用の軽減が達成でき、かつ連日投与することがないため患者の不便性や苦痛も軽減される等の臨床上の医薬として優れた性質を本発明の製剤が有していることを見出した。

更に、本発明者らは、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有する製剤を腓臓へ局所投与することにより、有効に腓臓機能が改善されることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち本発明は、

(1) ベータセルリン蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有する徐放

性製剤、

(2) ベータセルリン蛋白質が、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5及び配列番号：6からなる群から選ばれる少なくとも1つの配列番号で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質である前記(1)記載の徐放性製剤、

5 (3) ベータセルリン蛋白質が、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質又は配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質である前記(1)記載の徐放性製剤、

(4) ベータセルリン蛋白質が、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質である前記(1)記載の徐放性製剤、

10 (5) ベータセルリン蛋白質のムテインが、①配列番号：1もしくは配列番号：2で表わされるアミノ酸配列の1ないし40個程度のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1もしくは配列番号：2で表わされるアミノ酸配列の1ないし40個程度のアミノ酸が他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列、又は
15 ③配列番号：1もしくは配列番号：2で表わされるアミノ酸配列に1ないし40個程度のアミノ酸が付加したアミノ酸配列を有する蛋白質である前記(1)記載の徐放性製剤、

(6) ベータセルリン蛋白質のムテインが、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のN末端から12個又は30個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を有する蛋白質である前記(1)記載の徐放性製剤、

20 (7) ベータセルリン蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩及びキャリアーを含有する前記(1)記載の徐放性製剤、

(8) キャリアーがポリマーである前記(7)記載の徐放性製剤、

(9) ポリマーが生体内分解性ポリマーである前記(8)記載の徐放性製剤、

(10) 生体内分解性ポリマーが脂肪族ポリエステルである前記(9)記載の
25 徐放性製剤、

(11) 脂肪族ポリエステルが乳酸-グリコール酸重合体である前記(10)記載の徐放性製剤、

(12) 乳酸-グリコール酸重合体の乳酸/グリコール酸組成比が約100/0ないし約40/60である前記(11)記載の徐放性製剤、

- (13) 乳酸-グリコール酸重合体の重量平均分子量が約3,000ないし約8,000である前記(11)記載の徐放性製剤、
- (14) ポリマーが生体内非分解性ポリマーである前記(8)記載の徐放性製剤、
- 5 (15) 生体内非分解性ポリマーがポリグリセリン脂肪酸エステルである前記(14)記載の徐放性製剤、
- (16) 膵臓機能改善剤である前記(1)記載の徐放性製剤、
- (17) 糖尿病の治療又は予防剤である前記(1)記載の徐放性製剤、
- (18) 非経口投与剤である前記(1)記載の徐放性製剤、
- 10 (19) 膵臓への局所投与剤である前記(1)記載の徐放性製剤、
- (20) 皮下投与剤である前記(1)記載の徐放性製剤、
- (21) 筋肉内投与剤である前記(1)記載の徐放性製剤、
- (22) 腹腔内投与剤である前記(1)記載の徐放性製剤、
- (23) ベータセルリン蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有する膵
- 15 臓への局所投与剤、
- (24) 徐放性製剤を製造するためのベータセルリン蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の使用、
- (25) 膵臓への局所投与剤を製造するためのベータセルリン蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の使用、
- 20 (26) 哺乳動物に対して前記(1)記載の徐放性製剤の有効量を投与することを特徴とする糖尿病の治療方法、および
- (27) 哺乳動物に対して前記(23)記載の局所投与剤の有効量を投与することを特徴とする糖尿病の治療方法を提供する。

25 図面の簡単な説明

図1は、ラットにおける徐放性rhBTC含有PLGAマイクロカプセル皮下投与後の残存rhBTC(%)の経時変化を示すグラフである。●は投与量3.2mg/kg、○は5.9mg/kg、▲は10.0mg/kgを示す。

図2は、ラットにおける徐放性rhBTC含有PLGAマイクロカプセル皮

下投与後の血中 r h B T C 濃度 (pg/ml) の経時変化を示すグラフである。●は投与量 3.2 mg/kg、○は 5.9 mg/kg、▲は 10.0 mg/kg を示す。

5 図 3 は、ラットにおける徐放性 r h B T C 含有 H G P S 製剤を皮下投与後の残存 r h B T C (%) の経時変化を示すグラフである。投与量は 4.1 mg/kg を示す。

図 4 は、S T Z 糖尿病モデルラットにおける徐放性 r h B T C 含有 H G P S 製剤の投与 8 週間後の血中グルコース濃度 (mg/dl) を示すグラフである。●は無処置糖尿病ラット群、○は正常ラット群、▼は膵臓局所投与群 (投与量 45 mg/kg)、▽は皮下投与群 (投与量 45 mg/kg) を示す。

10 図 5 は、S T Z 糖尿病モデルラットにおける徐放性 r h B T C 含有 H G P S 製剤投与後、8 週後の血中インスリン濃度 (μ U/ml) の経時変化を示すグラフである。●は無処置糖尿病ラット群、○は正常ラット群、▼は膵臓局所投与群 (投与量 45 mg/kg)、▽は皮下投与群 (投与量 45 mg/kg) を示す。

15 発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられる B T C 蛋白質又はそのムテインは、B T C 様活性、即ち線維芽細胞、血管平滑筋細胞、網膜色素上皮細胞等の細胞増殖促進作用、より具体的には未分化膵臓幹細胞から膵臓ベータ細胞への分化促進作用を有する蛋白質であれば何れのものであってもよい。また、例えば発酵生産物、合成化合物、合成ペプチド等も用いることができる。

20 また、B T C 蛋白質としては、天然由来のものでもよく、遺伝子工学的手法によって製造された組換え型蛋白質でもよい。

天然由来の B T C 蛋白質としては、例えばヒト、サル、マントヒヒ、チンパンジー、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、マウス、ラット等のあらゆる哺乳動物由来の B T C 蛋白質が用いられ、中でもヒト、マウス由来のもの等が好ましく、
25 特にヒト由来のものが好ましい。本発明の製剤をヒトに適用する場合は、とりわけヒト由来の B T C 蛋白質を用いるのが好ましい。

B T C 蛋白質としては、具体的には、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5 及び配列番号：6 からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの配列番号で

表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質等が用いられる。より具体的にはヒト由来B T C蛋白質として、例えば配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質（特開平6-87894）等が、マウス由来B T C蛋白質としては、例えば配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質（Shingら；サイ
5 エンス（Science），259：1604（1993））等が用いられる。

また、これらのB T C蛋白質は、アミノ酸のみで構成される単純蛋白質であってもよく、糖蛋白質、リポ蛋白質、ヘム蛋白質、金属蛋白質、フラビン蛋白質、リン蛋白質等の複合蛋白質であってもよい。糖蛋白質である場合、糖鎖として、例えばD-マンノース、D-ガラクトース、L-フルクトース等の中性糖、
10 D-グルコサミン、D-ガラクトサミン等のアミノ糖、及びシアル酸等が挙げられる。

B T C蛋白質のムテインとしては、例えば上記B T C蛋白質の少なくとも1個の構成アミノ酸が欠失している欠失型ムテイン、B T C蛋白質の少なくとも1個の構成アミノ酸が他のアミノ酸に置換している置換型ムテイン、B T C蛋白質に少なくとも1個のアミノ酸が付加している付加型ムテイン等が用いられる。
15 アミノ酸の欠失、置換又は付加の数は、B T C蛋白質の本来有する作用を失わない限り何個でもよい。

具体的には、①配列番号：1もしくは配列番号：2で表わされるアミノ酸配列の1ないし40個程度のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1もしくは配列番号：2で表わされるアミノ酸配列の1ないし40個、好ましくは
20 1ないし9個程度のアミノ酸が他のアミノ酸配列に置換したアミノ酸配列、又は③配列番号：1もしくは配列番号：2で表わされるアミノ酸配列に1ないし40個、好ましくは1ないし9個程度のアミノ酸が付加したアミノ酸配列を有する蛋白質等が用いられ、中でも、次の部分アミノ酸配列、

- 25 ① His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile（配列番号：3）
② Gly Arg Cys Arg Phe Val Val（配列番号：4）
③ Glu Gln Thr Pro Ser Cys（配列番号：5）、及び
④ Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr（配列番号：6）からなる

群か

ら選ばれる少なくとも1つのアミノ酸配列を有する蛋白質等が好ましい。

これらのムテインの中でも、欠失型ムテイン等が好ましく、例えば配列番号：1もしくは配列番号：2で表わされるアミノ酸配列のN末端から1ないし40
5 個程度のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を有する蛋白質等が好ましい。

より具体的には、BTC蛋白質の欠失型ムテインとして、例えば配列番号：1もしくは配列番号：2で表わされるアミノ酸配列のN末端から12個又は30個のアミノ酸を欠失したアミノ酸配列を有するヒトBTC蛋白質の欠失型ム
10 テイン等が用いられる (Watanabe ら; ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 269: 9966(1994))。特に、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のN末端から12個又は30個のアミノ酸を欠失したアミノ酸配列を有するヒトBTC蛋白質の欠失型ムテインが好ましい。

その他のBTC蛋白質のムテインとしては、BTC蛋白質のN末端がアシル化 (例、ホルミル、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシル) されたもの、グリコシル化されたもの、ポリエチレングリコール誘導体等の化学
15 修飾されたもの等、BTC蛋白質の有する作用を失わない限り何れのものでもよい。また、該BTC蛋白質又はそのムテインは、C末端のカルボキシル基がアミド化又はエステル化 (例、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチルなどの C_{1-6} アルキル-エステルなど) されていてもよい。

20 BTC蛋白質又はそのムテインは塩を形成していてもよく、BTC蛋白質又はそのムテインの塩としては、とりわけ薬理的に許容される塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸 (例えば塩酸、りん酸、臭化水素酸、硫酸等) との塩、有機酸 (例えば酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸等) との塩、無機塩基との塩 (例えばナトリウム塩、
25 カリウム塩等のアルカリ金属塩; カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩; アルミニウム塩、アンモニウム塩等)、有機塩基との塩 (例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、

N, N-ジベンジルエチレンジアミン等) 等が用いられる。

本発明に用いられるBTC蛋白質又はそのムテインのうち、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するヒトBTC蛋白質、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のN末端から12個又は30個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を有する欠失型ヒトBTCムテイン、及び配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するマウスBTC蛋白質は公知である。また、それら以外のBTC蛋白質又はそのムテインについては自体公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って製造することができ、例えば自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは公知のペプチド又は前駆体を適当なペプチターゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成方法としては、例えば固相合成法、液相合成法の何れでもよい。即ち、目的とするペプチドは、そのペプチド又は前駆体を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば以下の①ないし⑤に記載された方法が挙げられる。

- ① M. Bodanszky 及び M. A. Ondetti, ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- ② Schroeder 及び Luebke, ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③ 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善 (株) (1975年)
- ④ 矢島治明及び榊原俊平、生化学実験講座1、ペプチド又は前駆体の化学IV、205、(1977年)
- ⑤ 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前駆体の精製法、例えば溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶等を組み合わせて目的とするペプチド又は前駆体を精製単離することができる。上記方法で得られるペプチド又は前駆体は遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明のBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有する徐放性製剤は、キャリアー（担体あるいは基剤）を含有しているのが好ましく、キャリアーとして例えば蛋白、ポリサッカライド、ポリマー（生体内分解性ポリマー、生体内非分解性ポリマー）、リポソーム、無機物等が挙げられる。

- 5 蛋白としては、例えばコラーゲン、ゲラチン、フィブリン、血清アルブミン等が挙げられる。

ポリサッカライドとしては、例えばデンプン、ヒアルロン酸、キトサン、キチン、アルギン酸塩、アガロース、デキストラン、セルロース誘導体等が挙げられる。

- 10 生体内分解性ポリマーとしては、例えば脂肪族ポリエステル、ポロフォスファベンゼン、ポリオルソエステル等が挙げられる。

生体内非分解性ポリマーとしては、例えばポリグリセリン脂肪酸エステル、シリコン、エチルビニルアセテート共重合体、ポリヒドロキシエチルメチルメタアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン等が挙げられる。

- 15 リポソームとしては、通常のリポソームに加えて例えばポリサッカライド修飾リポソーム等が挙げられる。

無機物としては、例えばハイドロキシアパタイト、トリカルシウムフォスフェイト、カルシウムカルボネート、カルシウムサルフェート等が挙げられる。

- 20 本発明の徐放性製剤に用いるキャリアーとしては、例えばポリマー（例えば生体内分解性ポリマー、生体内非分解性ポリマー等）等が好ましく、特に生体内分解性ポリマーとして例えば脂肪族ポリエステル等、生体内非分解性ポリマーとして例えばポリグリセリン脂肪酸エステル等が好ましい。

- 25 脂肪族ポリエステルとしては、例えば乳酸-グリコール酸重合体等が用いられる。

乳酸-グリコール酸重合体の組成比（乳酸/グリコール酸；L/G比）（モル%）は約100/0ないし約40/60が好ましく、更に好ましくは約100/0ないし約75/25であり、特に好ましくは100/0（ポリ乳酸）で

ある。

乳酸-グリコール酸重合体の重量平均分子量は約3,000ないし約80,000が好ましく、更に好ましくは約5,000ないし約25,000であり、特に好ましくは約7,000ないし約20,000である。

- 5 乳酸-グリコール酸重合体の分散度（重量平均分子量/数平均分子量）は、好ましくは約1.2ないし約4.0、更に好ましくは約1.5ないし約3.5である。

- 10 ポリグリセリン脂肪酸エステルとしては、例えばテトラグリセロールモノパルミテート（TGMP）、テトラグリセロールジパルミテート（TGDP）、テトラグリセロールトリパルミテート（TGTP）、テトラグリセロールヘキサパルミテート（TGHP）、テトラグリセロールモノステアレート（TGM S）、テトラグリセロールジステアレート（TGDS）、テトラグリセロールトリスステアレート（TGTS）、テトラグリセロールヘキサステアレート（TGHS）、ヘキサグリセロールペンタステアレート（HGPS）、テトラグリセロールヘキサパルミテート（TGHP）等が挙げられ、これらを単独である
15 いは混合して用いることができる。

本発明の徐放性製剤は、自体公知の方法にしたがって製造される。

- 20 本発明の徐放性製剤は、具体的には、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩と、徐放性製剤の製造時に通常用いられるキャリアー（例えば前記キャリアー）とを混合し、必要に応じて成形することによって製造される。該キャリアーは、例えばBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の使用量が、キャリアーに対して約0.01ないし約50%（w/w）となるように使用される。

- 25 以下に本発明の徐放性製剤として、例えばA) 生体内非分解性ポリマーであるポリグリセリン脂肪酸エステルをキャリアーとして用いたBTC蛋白質含有徐放性製剤、及びB) 生体内分解性ポリマーである乳酸-グリコール酸重合体をキャリアーとして用いたBTC蛋白質含有徐放性製剤の製造法について例示する。

A) ポリグリセリン脂肪酸エステルをキャリアーとして用いたBTC蛋白質含

有徐放性製剤

ポリグリセリン脂肪酸エステルを加温・融解し、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の粉末を添加し攪拌等により均等に分散させる。この後冷却し、円盤状、フィルム状、棒状等に成形する。このようにして所定量のBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有するポリグリセリン脂肪酸エステル

5 C蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有するポリグリセリン脂肪酸エステルの徐放性製剤を得ることができる。加温温度は約50ないし約100℃、冷却温度は約0ないし約40℃である。BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の使用量は、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の種類、所望の薬理効果及び効果の持続期間等により異なるが、ポリグリセリン脂肪酸

10 エステルに対して約0.1ないし約50% (w/w)である。

B) 乳酸-グリコール酸重合体をキャリアーとして用いたBTC蛋白質含有徐放性製剤

B-1) 棒状成形物等の製造法について詳述する。

B-1-a)

15 乳酸-グリコール酸重合体を有機溶媒（好ましくはジクロルメタン等）で溶解し、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の水溶液を添加後乳化する。これを真空乾燥しBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩が均等に分散した乳酸-グリコール酸重合体の粉末を得る。これを加温し、冷却することにより、円盤状、フィルム状、棒状（ロッド状）等に成形する。このように

20 して所定量のBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有する乳酸-グリコール酸重合体の徐放性製剤を得ることができる。加温温度は約50ないし約100℃、冷却温度は約0ないし約40℃である。BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の使用量は、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の種類、所望の薬理効果及び効果の持続期間等により異なるが、乳酸-

25 グリコール酸重合体に対して約0.1ないし約30% (w/w)である。

B-1-b)

乳酸-グリコール酸重合体を有機溶媒（好ましくはジクロルメタン等）で溶解し、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の粉末を添加後、均一に分散させる。得られる分散系を真空乾燥し、BTC蛋白質もしくはそのムテイン

ン又はその塩が均等に分散した乳酸-グリコール酸重合体の粉末を得る。これを加温し、冷却することにより、円盤状、フィルム状、棒状（ロッド状）等に成形する。このようにして所定量のBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有する乳酸-グリコール酸重合体の徐放性製剤を得ることができる。

- 5 加温温度、冷却温度、およびBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の使用量は、前記と同様である。

B-2) マイクロカプセル（マイクロスフェアとも称する）の製造法について詳述する。

- 10 W/O/Wエマルジョン及びO/Wエマルジョンは、それぞれ(i) BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の水溶液、分散液又は懸濁液を内水相とし、乳酸-グリコール酸重合体の有機溶媒溶液を油相とするW/Oエマルジョンを得るか、又は(ii) BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を乳酸-グリコール酸重合体の有機溶媒溶液に溶解あるいは懸濁して油相を得、この(i)又は(ii)を水(外水相)に添加し、分散、乳化することによって製造される。

上記(i)、即ちBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の水溶液、分散液又は懸濁液を内水相とし、乳酸-グリコール酸重合体の有機溶媒溶液を油相とするW/Oエマルジョンは、以下のようにして製造される。

- 20 まず、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を水に溶解、分散又は懸濁し、内水相を製造する。BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の水溶液、分散液又は懸濁液中の濃度は、例えば0.001ないし90% (w/w)、好ましくは0.01ないし80% (w/w) である。

- 25 上記BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の使用量は、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の種類、所望の薬理効果及び効果の持続期間等により異なるが、乳酸-グリコール酸重合体に対して、約0.01ないし約50% (w/w)、好ましくは約0.1ないし約40% (w/w)、特に好ましくは約1ないし約30% (w/w) である。

必要であれば、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩のマイクロカプセルへの取り込みをあげるために、内水相にゼラチン、寒天、アルギン酸ナ

トリウム、ポリビニールアルコールあるいは塩基性アミノ酸（例えばアルギニン、ヒスチジン、リジン等）等の薬物保持物質を加えてもよい。薬物保持物質の添加量は、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩に対し、通常約0.01ないし約10重量倍である。

- 5 内水相は、一旦凍結乾燥して粉末状態とした後、適当な濃度となるように水を添加して溶解して用いてもよい。

別に、乳酸-グリコール酸重合体を有機溶媒に溶解し、油相を製造する。

- 前記有機溶媒としては、ハロゲン化炭化水素（例えばジクロロメタン、クロロホルム、クロロエタン、トリクロロエタン、四塩化炭素等）、脂肪酸エステル
10 ル（例えば酢酸エチル、酢酸ブチル等）、芳香族炭化水素（例えばベンゼン、トルエン、キシレン等）が挙げられ、中でもジクロロメタンが好ましい。

- 有機溶媒中の乳酸-グリコール酸重合体の濃度は、該乳酸-グリコール酸重合体の種類、分子量、有機溶媒の種類により異なるが、 $[\text{乳酸-グリコール酸重合体の重量} / (\text{有機溶媒の重量} + \text{乳酸-グリコール酸重合体の重量})]$ （ $\times 100\%$ ）は、通常約0.01ないし約90%（w/w）、好ましくは約0.01ないし約70%（w/w）である。未溶解物がないように溶解するのがよい。
15

- このようにして得られる乳酸-グリコール酸重合体の有機溶媒溶液（油相）に、上記したBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の水溶液、分散液又は懸濁液（内水相）を添加し、ホモミキサー等で分散、乳化し、W/Oエマルションを製造する。
20

一方、上記(ii)、即ちBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を乳酸-グリコール酸重合体の有機溶媒溶液に溶解あるいは懸濁して得られる油相は、以下のようにして製造される。

- まず、乳酸-グリコール酸重合体の有機溶媒溶液を製造する。該有機溶媒としては、上記W/Oエマルションを製造する際に用いた有機溶媒と同様のものが用いられる。
25

有機溶媒溶液中の乳酸-グリコール酸重合体の濃度は、該乳酸-グリコール酸重合体の分子量、有機溶媒の種類によって異なるが、 $[\text{乳酸-グリコール酸重合体の重量} / (\text{有機溶媒の重量} + \text{乳酸-グリコール酸重合体の重量})]$ （ \times

100%)は、通常約0.01ないし約70% (w/w)、好ましくは約1ないし約60% (w/w)である。

次に、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を乳酸-グリコール酸重合体の有機溶媒溶液に溶解あるいは懸濁して油相を製造する。

- 5 BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の使用量は、該BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の乳酸-グリコール酸重合体に対する割合が上記W/Oエマルジョン(i)を製造する場合と同様になるように選択すればよい。

- 10 ついで上記した(i)W/Oエマルジョン又は(ii)油相を、外水相に添加し、ホモキサナー等を用いて分散、乳化し、それぞれW/O/Wエマルジョン又はO/Wエマルジョンを製造する。

外水相の使用量は、通常上記(i)又は(ii)の約1ないし約10000容量倍、好ましくは約10ないし約2000容量倍、特に好ましくは約50ないし約500容量倍である。

- 15 外水相中には、通常乳化剤を添加する。該乳化剤としては、一般的に安定なW/O/Wエマルジョン又はO/Wエマルジョンを形成し得るものであればよく、例えばアニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、レシチン、ゼラチン、ヒアルロン酸等が挙げられるが、
20 中でもポリビニルアルコールが好ましい。外水相中の乳化剤の濃度は、通常約0.001ないし約20% (w/w)、好ましくは約0.01ないし約10% (w/w)、特に好ましくは約0.05ないし約5% (w/w)である。

- 25 このようにして得られるW/O/Wエマルジョン又はO/Wエマルジョン(以下、これらを単にエマルジョンと略記する場合がある)を水中乾燥法に付すことにより、これらエマルジョンに含まれる有機溶媒を除去してマイクロカプセルを製造することができる。

このようにして得られるマイクロカプセルは、遠心分離あるいは篩等で回収し、所望により、マイクロカプセル同士の凝集を防止するため糖あるいは糖アルコール、無機塩等、好ましくはマンニトール、ソルビトール等の凝集防止剤

を添加した後、凍結乾燥に付す。

マイクロカプセルと凝集防止剤の混合割合（重量比）は、約50：1ないし約1：1、好ましくは約20：1ないし約1：1、更に好ましくは約10：1ないし約5：1である。

- 5 凝集防止剤の添加方法は、マイクロカプセルと凝集防止剤とが均一に混合される方法であれば特に限定されないが、例えば凝集防止剤の水溶液にマイクロカプセルを分散する方法等が挙げられる。

- 10 BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の徐放性マイクロカプセルの製造法においては、水中乾燥法によりマイクロカプセル化するのが好適である場合が多い。

このようにして得られたマイクロカプセルは、必要があれば減圧下加温乾燥しマイクロカプセル中の水分及び溶媒の除去をより完全に行う。

- 15 また、前記したW/O/Wエマルジョン又はO/Wエマルジョンを用いる方法の他に、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の粉末（S相）を、乳酸-グリコール酸重合体を溶解した有機溶媒液（O相）に分散させた、S/O型分散液から溶媒を除去することによるS/O/W法により製造することもできる。

- 20 本法は、まず乳酸-グリコール酸重合体を有機溶媒に溶解し、この有機溶媒液中にBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の粉末（S相）を添加し分散させる。この際、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩と乳酸-グリコール酸重合体との混合割合（重量比）は、例えば約1：1000ないし約1：1、好ましくは約1：200ないし約1：5、更に好ましくは約1：100ないし約1：5である。また、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の粉末を有機溶媒液中に均一に分散させるため、外部物理的エネルギーを
25 加えることが好ましい。その方法としては例えば超音波照射、タービン型攪拌器、ホモジナイザー等が用いられる。

次いでこのようにして調製された有機溶媒分散液（S/O型分散液）を、更に水性溶媒（W相）中に添加して、上記と同様の外部物理的エネルギー、例えば超音波照射、タービン型攪拌器、あるいはホモジナイザー等によりS/O/W

W型エマルションを形成させる。以後、油相溶媒を蒸発させマイクロカプセルを製造する。この際の水相体積は、一般的には油相体積の約1倍ないし約10,000倍から選ばれる。更に好ましくは約2倍ないし約5,000倍、特に好ましくは約5倍ないし約2,000倍から選ばれる。

- 5 上記外水相中には、乳化剤を加えてもよい。該乳化剤としては、一般的に安定なS/O/Wエマルションを形成できるものであれば何れでもよい。乳化剤としては、例えばアニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、レシチン、ゼラチン、ヒアルロン酸等が挙げられる。
- 10 これらは適宜組み合わせて使用してもよい。外水相中の乳化剤の濃度は、好ましくは約0.001%ないし約20% (w/w) である。更に好ましくは約0.01%ないし約10% (w/w)、特に好ましくは約0.05%ないし約5% (w/w) である。

- このようにして得られたマイクロカプセルは、遠心分離あるいは濾過操作により分取した後、マイクロカプセルの表面に付着している乳化剤等を蒸留水による洗浄で除去し、再び蒸留水等に分散して凍結乾燥する。その後必要であれば、加温してマイクロカプセル中の水分及び有機溶媒を更に除去する。減圧下に加温してもよい。加温条件としては、用いた乳酸-グリコール酸重合体のガラス転移温度以上で、マイクロカプセルの各粒子が互いに付着しない程度の温度で加熱乾燥する。好ましくは、乳酸-グリコール酸重合体のガラス転移温度からガラス転移温度より約30℃高い温度の範囲で加熱乾燥する。ここでガラス転移温度とは、示差走査熱量計を用い、加温速度毎分10ないし20℃で昇温した際に得られる中間点を云う。
- 15
- 20

- このようにして得られるマイクロカプセルは、粒子同士の凝集を防ぐために凝集防止剤を加えてもよい。該凝集防止剤としては、例えばマンニトール、ラクトース、ブドウ糖、デンプン類（例えばコーンスターチ等）、ヒアルロン酸あるいはこのアルカリ金属塩等の水溶性多糖、グリシン、フィブリン、コラーゲン等の蛋白質、塩化ナトリウム、リン酸水素ナトリウム等の無機塩類等が適宜用いられる。
- 25

また、マイクロカプセルは、前記B-1-a)の場合と同様に、加温後、冷却することにより、円盤状、フィルム状、棒状（ロッド状）等に成形することもできる。

前記した各種製造法において、有機溶媒に乳酸-グリコール酸重合体を溶解する際に、該有機溶媒に酸化亜鉛を添加してもよい。

酸化亜鉛の使用量は、乳酸-グリコール酸重合体1重量部に対し、例えば約0.1~約100重量部、好ましくは約1~約20重量部である。

また、酸化亜鉛の粒子径は、通常約0.001~約10 μ m、好ましくは約0.005~約1 μ mである。

10 このように、酸化亜鉛を使用して得られる徐放性製剤は、「薬物取り込み率が高い」、「生体内投与時の薬物初期過剰放出が小さい」、「長期にわたって持続的に薬物を放出できる」等の優れた性質を有する。

本発明の徐放性製剤を製造する際に、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を、酢酸アンモニウム水溶液に溶解し、凍結乾燥して用いてもよい。

15 このように酢酸アンモニウムで処理して得られるBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩は、粒子径が小さく、優れた操作性を有するので、徐放性製剤を製造する際に有利である。

こうして得られる本発明の徐放性製剤は、そのままあるいは所望により製剤学的に許容される添加剤（例えば安定化剤、保存剤、無痛化剤等）を用いて種々の剤形に製造して投与することができる。このような製剤としては、例えば非経口剤（例えば注射剤、埋め込み剤、坐剤等）、経口投与剤（例えばカプセル剤、錠剤、顆粒剤、散剤等の固形製剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等の液剤等）等が挙げられる。製剤学的に許容される添加剤としての安定剤としては、例えばヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール等、保存剤としては、例えばベンジルアルコール、フェノール等、無痛化剤としては、例えば塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン等が挙げられる。本発明の製剤におけるBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の含有量は、製剤全体に対して通常約0.01ないし約100%（w/w）の範囲から適宜選択することができる。

本発明の徐放性製剤は、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を、

水性溶剤（例、蒸留水、生理的食塩水、リンゲル液等）または油性溶剤（例、オリーブ油、ゴマ油、綿実油、コーン油等の植物油；プロピレングリコール等）に溶解、懸濁または乳化した後、市販の徐放性製剤用容器〔例、デュロス（商品名、アルザ社製）〕に封入することによっても製造される。

- 5 本発明の製剤の投与方法は、経口、非経口のいずれでよいが、非経口剤とするのが好ましく、なかでも皮下投与剤、腹腔内投与剤及び筋肉内投与剤等の全身性投与剤、又は臓器等への局所投与剤とすることが好ましく、特に膵臓への局所投与剤とする場合が好ましい。

- 10 本発明において、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有する膵臓への局所投与剤としては、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩をそのまま、あるいは公知の製剤学的製造法に準じ、所望により製剤学的に許容される担体を用いて種々の剤形に製造されたBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有する製剤であればよいが、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有する徐放性製剤であることが好ましい。

- 15 膵臓への局所投与剤は、具体的には、BTC徐放性製剤を内視鏡手術等を応用して直接膵臓またはその周辺へ投与する、ステント技術を用いて製剤を膵臓支配動脈に投与する、経口的内視鏡を用いて膵管経由で製剤を膵臓に投与する等の方法により用いられる。

- 20 本発明の製剤の剤型としては、前記BTC蛋白質含有徐放性製剤の製造法の説明において例示した円盤状成形物、フィルム状成形物、棒状成形物、マイクロカプセルなどが挙げられるが、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を膵臓において局所的にかつ長期にわたって供給するためには、円盤状成形物、フィルム状成形物、棒状成形物が好ましい。さらに、製剤の製造工程が簡便であることから、棒状成形物が特に好ましい。

- 25 本発明の製剤は低毒性であるので、哺乳動物（例えばヒト、サル、マントヒヒ、チンパンジー、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、マウス、ラット等）の膵臓機能障害や膵臓機能低下に対して安全な製剤として使用することができる。具体的には、本発明の製剤は、細胞分化促進剤として膵臓ベータ細胞の分化を促進する作用を有する。即ち、本発明の製剤は、未分化膵臓幹細胞に作用して、こ

れを膵臓ベータ細胞へと分化させることができ、このようにして分化誘導されて生じた膵臓ベータ細胞は、インスリンを分泌・産生することができる。また、本発明の製剤は、未分化膵臓幹細胞を膵臓の他の細胞、例えばパankレアティックペプチド（以下、PPと略称する場合がある）を産生するF細胞へと分化誘導させる作用も有する。更には、本発明の製剤はin vivoにおける耐糖能改善作用を有する。従って、本発明の製剤は、例えば糖尿病（例えばインスリン依存性糖尿病）、糖尿病における膵臓機能障害、老人性のインスリン分泌低下に伴う膵臓機能低下症、糖尿病性合併症（例えば神経障害、腎症、網膜症、白内障、大血管障害、骨減少症等）、未分化型膵ガン等の疾患の治療又は予防に有効に用いることができる。

本発明の製剤の投与量は、主薬であるBTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の種類と含有量、剤形、持続期間、投与対象、投与ルート、投与目的、対象疾患、症状等に応じて適宜選択することができるが、例えば糖尿病の成人患者（体重約60kg）の治療に注射剤（例えば約2ないし約3ヶ月徐放剤）として投与する場合、1回あたり、BTC蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩として約30ないし約600mg/kg体重である。

また、本発明の製剤は、糖尿病治療剤、糖尿病性合併症治療剤、抗高脂血症剤、降圧剤、抗肥満剤、利尿剤、化学療法剤、免疫療法剤等の薬剤（以下、併用薬剤と略記する）と組み合わせて用いることができる。この際、本発明の製剤及び併用薬剤の投与時期は限定されず、これらを投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。併用薬剤の投与量は、臨床上用いられている用量を基準として適宜選択することができる。また、本発明の製剤と併用薬剤の配合比は、投与対象、投与ルート、対象疾患、症状、組み合わせ等に応じて適宜選択することができる。

糖尿病治療剤としては、インスリン製剤（例えばウシ、ブタの膵臓から抽出された動物インスリン製剤；大腸菌、イーストを用い、遺伝子工学的に合成したヒトインスリン製剤等）、インスリン感受性増強剤（例えば塩酸ピオグリタゾン、トログリタゾン、ロシグリタゾン（またはそのマレイン酸塩）、JTT-501、MCC-555、R-119702等）、 α -グルコシダーゼ阻害

剤（例えばボグリボース、アカルボース、ミグリトール等）、ピグアナイド剤（例えばフェンホルミン、メトホルミン、ブホルミン等）、あるいはスルホニルウレア剤（例えばトルブタミド、グリベンクラミド、グリクラジド、クロルプロパミド、トラザミド、アセトヘキサミド、グリクロピラミド、グリメピリド等）やその他のインスリン分泌促進剤（例えばレパグリニド、セナグリニド、ミツグリニド、GLP-1等）等が挙げられる。

糖尿病性合併症治療剤としては、アルドース還元酵素阻害剤（例えばトルレスタット、エパルレスタット、ゼナレスタット、SK-860、CT-112等）、神経栄養因子（例えばNGF、NT-3等）、活性酸素消去薬（例えばチオクト酸等）、脳血管拡張剤（例えばチオプリド、メキシレチン等）が挙げられる。

抗高脂血症剤としては、コレステロール合成阻害剤であるスタチン系化合物（例えばセリバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、ロバスタチン、アトロバスタチン、フルバスタチン等）、スクアレン合成酵素阻害剤あるいはトリグリセリド低下作用を有するフィブラート系化合物（例えばベザフィブラート、クロフィブラート、シムフィブラート、クリノフィブラート等）等が挙げられる。

降圧剤としては、アンジオテンシン変換酵素阻害剤（例えばカプトプリル、エナラプリル、デラプリル等）、アンジオテンシンII拮抗剤（例えばカンデサルタンシレキセチル、ロサルタン等）、カルシウム拮抗剤（例えばニカルジピン、ニフェジピン、ジルチアゼム、マニジピン等）等が挙げられる。

抗肥満剤としては、例えば中枢性抗肥満薬（例えばデキスフェンフルアミン、フェンフルラミン、フェンテルミン、シブトラミン、アンフェプラモン、デキサンフェタミン、マジンドール、フェニルプロパノールアミン、クロベンゾレックス等）、膵リパーゼ阻害薬（例えばオルリスタット等）、 $\beta 3$ アゴニスト（例えばCL-316243、SR-58611-A、UL-TG-307、AJ-9677等）、ペプチド性食欲抑制薬（例えばレプチン等）、コレシストキニンアゴニスト（例えばリンチトリプト、FPL-15849等）等が挙げられる。

利尿剤としては、例えばキサンチン誘導体（例えばサリチル酸ナトリウムテオブロミン、サリチル酸カルシウムテオブロミン等）、チアジド系製剤（例えばエチアジド、シクロペンチアジド、トリクロルメチアジド、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメチアジド、ベンチルヒドロクロロチアジド、ペンフルチアジド、ポリチアジド、メチクロチアジド等）、抗アルドステロン製剤（例えばスピロノラクトン、トリアムテレン等）、炭酸脱水酵素阻害剤（例えばアセタゾラミド等）、クロルベンゼンスルホンアミド系製剤（例えばクロルタリドン、メフルシド、インダパミド等）、アゾセミド、イソソルビド、エタクリン酸、ピレタニド、ブメタニド、フロセミド等が挙げられる。

10 化学療法剤としては、例えばアルキル化剤（例えばサイクロフォスファミド、イフォスファミド等）、代謝拮抗剤（例えばメソトレキセート、5-フルオロウラシル等）、抗癌性抗生物質（例えばマイトマイシン、アドリアマイシン等）、植物由来抗癌剤（例えばピンクリスチン、ビンデシン、タキソール等）、シスプラチン、カルボプラチン、エトポキシド等が挙げられる。中でも5-フルオロウラシル誘導体であるフルツロンあるいはネオフルツロン等が好ましい。

15 免疫療法剤としては、例えば微生物又は細菌成分（例えばムラミルジペプチド誘導体、ピシバニール等）、免疫増強活性のある多糖類（例えばレンチナン、シゾフィラン、クレスチン等）、遺伝子工学的手法で得られるサイトカイン（例えばインターフェロン、インターロイキン（IL）等）、コロニー刺激因子（例えば顆粒球コロニー刺激因子、エリスロポエチン等）等が挙げられ、中でもIL-1、IL-2、IL-12等が好ましい。

25 更に、動物モデルや臨床で悪液質改善作用が認められている薬剤、即ち、シクロオキシゲナーゼ阻害剤（例えばインドメタシン等）〔キャンサー・リサーチ（Cancer Reseach）、第49巻、5935ないし5939頁、1989年〕、プロゲステロン誘導体（例えばメゲステロールアセテート）〔ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー（Journal of Clinical Oncology）、第12巻、213ないし225頁、1994年〕、糖質ステロイド（例えばデキサメサゾン等）、メトクロプラミド系薬剤、テトラヒドロカンナビノール系薬剤（文献は何れも上記と同様）、脂肪代謝改善剤（例えばエイコサペンタエン酸等）〔ブ

リティシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー (British Journal of Cancer)、第68巻、314ないし318頁、1993年]、成長ホルモン、IGF-1、あるいは悪液質を誘導する因子であるTNF- α 、LIF、IL-6、オンコスタチンMに対する抗体等も本発明製剤と併用することができる。

5

以下に、本発明を実施例及び実験例を示して更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
15	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	Gly	: グリシン
20	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
25	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸

- L y s : リジン
A r g : アルギニン
H i s : ヒスチジン
P h e : フェニルアラニン
5 T y r : チロシン
 T r p : トリプトファン
 P r o : プロリン
 A s n : アスパラギン
 G l n : グルタミン
- 10 本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。
 〔配列番号：1〕
 ヒト由来B T C蛋白質のアミノ酸配列を示す。
 〔配列番号：2〕
 マウス由来B T C蛋白質のアミノ酸配列を示す。
- 15 〔配列番号：3〕
 配列番号：1および配列番号：2で表されるアミノ酸配列の第36番目から第
 47番目の部分アミノ酸配列を示す。
 〔配列番号：4〕
 配列番号：1および配列番号：2で表されるアミノ酸配列の第49番目から第
20 55番目の部分アミノ酸配列を示す。
 〔配列番号：5〕
 配列番号：1および配列番号：2で表されるアミノ酸配列の第57番目から第
 62番目の部分アミノ酸配列を示す。
 〔配列番号：6〕
- 25 配列番号：1および配列番号：2で表されるアミノ酸配列の第70番目から第
 80番目の部分アミノ酸配列を示す。
 〔配列番号：7〕
 配列番号：1で表されるヒト由来B T C蛋白質のアミノ酸配列を有する蛋白質
 をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

配列番号：2で表されるマウス由来BTC蛋白質のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAの塩基配列を示す。

5 実施例1

ポリグリセリン脂肪酸エステルの一つであるテトラグリセロールモノパルミテート (TetraGlycerol MonoPalmitate, TGMP) 760 mg を60ないし75℃で加熱融解後、rhBTC (リコンビナントヒトベータセルリン蛋白質) 凍結乾燥粉末20 mg を添加し攪拌混合後、14 G 留置針に約30 mg 吸引し室温にて冷却固化した。固化したrhBTC含有TGMPを取り出すため留置針を55℃で約1分間加熱し押し出し成形した。得られた円柱のペレットを長さ20 mm に切断し、長径約1.2 mm、長さ約20 mm の徐放性rhBTC含有TGMP製剤を得た。製剤中の薬物 (rhBTC) 含量は仕込み量で2.5%であった。

実施例2

15 ポリグリセリン脂肪酸エステルの一つであるテトラグリセロールジパルミテート (TetraGlycerol DiPalmitate, TGDP) 760 mg を60ないし75℃で加熱融解後、rhBTC凍結乾燥粉末20 mg を添加し攪拌混合後、14 G 留置針に約30 mg 吸引し室温にて冷却固化した。固化したrhBTC含有TGDPを取り出すため留置針を55℃で約1分間加熱し押し出し成形した。得られた円柱のペレットを長さ20 mm に切断し、長径約1.2 mm、長さ約20 mm の徐放性rhBTC含有TGDP製剤を得た。製剤中の薬物含量は仕込み量で2.5%であった。

実施例3

25 ポリグリセリン脂肪酸エステルの一つであるテトラグリセロールトリパルミテート (TetraGlycerol TriPalmitate, TGTP) 760 mg を60ないし75℃で加熱融解後、rhBTC凍結乾燥粉末20 mg を添加し攪拌混合後、14 G 留置針に約30 mg 吸引し室温にて冷却固化した。固化したrhBTC含有TGTPを取り出すため留置針を55℃で約1分間加熱し押し出し成形した。得られた円柱のペレットを長さ20 mm に切断し、長径約1.2 mm、長さ約20 mm の徐

放射性 r h B T C 含有 T G T P 製剤を得た。製剤中の薬物含量は仕込み量で 2.5% であった。

実施例 4

ポリグリセリン脂肪酸エステルの一つであるテトラグリセロールヘキサパルミテート (TetraGlycerol HexaPalmitate, TGHP) 760 mg を 60 ないし 75℃ で加熱融解後、r h B T C 凍結乾燥粉末 20 mg を添加し攪拌混合後、14 G 留置針に約 30 mg 吸引し室温にて冷却固化した。固化した r h B T C 含有 TGHP を取り出すため留置針を 55℃ で約 1 分間加熱し押し出し成形した。得られた円柱のペレットを長さ 20 mm に切断し、長径約 1.2 mm、長さ約 20 mm の徐放性 r h B T C 含有 TGHP 製剤を得た。製剤中の薬物含量は仕込み量で 2.5% であった。

実施例 5

ポリグリセリン脂肪酸エステルの一つであるテトラグリセロールモノステアレート (TetraGlycerol MonoStearate, TGMS) 760 mg を 60 ないし 75℃ で加熱融解後、r h B T C 凍結乾燥粉末 20 mg を添加し攪拌混合後、14 G 留置針に約 30 mg 吸引し室温にて冷却固化した。固化した r h B T C 含有 TGMS を取り出すため留置針を 55℃ で約 1 分間加熱し押し出し成形した。得られた円柱のペレットを長さ 20 mm に切断し、長径約 1.2 mm、長さ約 20 mm の徐放性 r h B T C 含有 TGMS 製剤を得た。製剤中の薬物含量は仕込み量で 2.5% であった。

実施例 6

ポリグリセリン脂肪酸エステルの一つであるテトラグリセロールジステアレート (TetraGlycerol DiStearate, TGDS) 760 mg を 60 ないし 75℃ で加熱融解後、r h B T C 凍結乾燥粉末 20 mg を添加し攪拌混合後、14 G 留置針に約 30 mg 吸引し室温にて冷却固化した。固化した r h B T C 含有 TGDS を取り出すため留置針を 55℃ で約 1 分間加熱し押し出し成形した。得られた円柱のペレットを長さ 20 mm に切断し、長径約 1.2 mm、長さ約 20 mm の徐放性 r h B T C 含有 TGDS 製剤を得た。製剤中の薬物含量は仕込み量で 2.5% であった。

実施例 7

ポリグリセリン脂肪酸エステルのものであるテトラグリセロールトリステアレート (TetraGlycerol TriStearate, TGT S) 760 mg を60ないし75℃で加熱融解後、r h B T C凍結乾燥粉末20 mg を添加し攪拌混合後、14 G留置針に約30 mg 吸引し室温にて冷却固化した。固化したr h B T C含有TGT Sを取り出すため留置針を55℃で約1分間加熱し押し出し成形した。得られた円柱のペレットを長さ20 mm に切断し、長径約1.2 mm、長さ約20 mm の徐放性r h B T C含有TGT S製剤を得た。製剤中の薬物含量は仕込み量で2.5%であった。

10 実施例 8

ポリグリセリン脂肪酸エステルのものであるテトラグリセロールヘキサステアレート (TetraGlycerol HexaStearate, TGHS) 760 mg を60ないし75℃で加熱融解後、r h B T C凍結乾燥粉末20 mg を添加し攪拌混合後、14 G留置針に約30 mg 吸引し室温にて冷却固化した。固化したr h B T C含有TGHSを取り出すため留置針を55℃で約1分間加熱し押し出し成形した。得られた円柱のペレットを長さ20 mm に切断し、長径約1.2 mm、長さ約20 mm の徐放性r h B T C含有TGHS製剤を得た。製剤中の薬物含量は仕込み量で2.5%であった。

実施例 9

20 ポリグリセリン脂肪酸エステルのものであるヘキサグリセロールペンタステアレート (HexaGlycerol PentaStearate, HGPS) 760 mg を60ないし75℃で加熱融解後、r h B T C凍結乾燥粉末20 mg を添加し攪拌混合後、14 G留置針に約30mg 吸引し室温にて冷却固化した。固化したr h B T C含有HGPSを取り出すため留置針を55℃で約1分間加熱し押し出し成形した。得られた円柱のペレットを長さ20 mm に切断し、長径約1.2 mm、長さ約20 mm の徐放性r h B T C含有HGPS製剤を得た。製剤中の薬物含量は仕込み量で2.5%であった。

実施例 10

ポリグリセリン脂肪酸エステルのものであるテトラグリセロールヘキサパル

- ミテート (TetraGlycerol HexaPalmitate, TGHP) 1560 mg を70℃で加熱して融解後、r h B T C凍結乾燥粉末40 mg を添加し攪拌混合後、内径1.5 mm の移植針に吸引し室温にて冷却固化した。固化した r h B T C含有TGHP を取り出すため移植針を60℃で1ないし3分間加熱し押し出し成形した。
- 5 得られた円柱ペレットを長さ10 mm に切断し、長径1.5 mm、長さ10 mm の徐放性 r h B T C含有TGHP 製剤を得た。製剤中の薬物含量は仕込み量で2.5%であった。

実施例11

- ポリグリセリン脂肪酸エステルの一つであるテトラグリセロールヘキサパルミテート (TetraGlycerol HexaPalmitate, TGHP) 1560 mg を70℃で加熱して融解後、r h B T C凍結乾燥粉末40 mg を添加し攪拌混合後、内径2.0 mm の移植針に吸引し室温にて冷却固化した。固化した r h B T C含有TGHP を取り出すため移植針を60℃で1ないし3分間加熱し押し出し成形した。
- 10 得られた円柱ペレットを長さ10 mm に切断し、長径2.0 mm、長さ10 mm の徐放性 r h B T C含有TGHP 製剤を得た。製剤中の薬物含量は仕込み量で2.5%であった。
- 15

実施例12

- ポリグリセリン脂肪酸エステルの一つであるヘキサグリセロールペンタステアレート (HexaGlycerol PentaStearate, HGPS) 1560 mg を70℃で加熱して融解後、r h B T C凍結乾燥粉末40 mg を添加し攪拌混合後、内径1.5 mm の移植針に吸引し室温にて冷却固化した。固化した r h B T C含有HGPS を取り出すため移植針を60℃で1ないし3分間加熱し押し出し成形した。
- 20 得られた円柱ペレットを長さ10 mm に切断し、長径1.5 mm、長さ10 mm の徐放性 r h B T C含有HGPS 製剤を得た。製剤中の薬物含量は仕込み量で2.5%であった。
- 25

実施例13

ポリグリセリン脂肪酸エステルの一つであるヘキサグリセロールペンタステアレート (HexaGlycerol PentaStearate, HGPS) 1560 mg を70℃で加熱して融解後、r h B T C凍結乾燥粉末40 mg を添加し攪拌混合後、内径2.

0 mm の移植針に吸引し室温にて冷却固化した。固化した r h B T C 含有 H G P S を取り出すため移植針を 6 0 ° C で 1 ないし 3 分間加熱し押し出し成形した。得られた円柱ペレットを長さ 1 0 mm に切断し、長径 2. 0 mm、長さ 1 0 mm の徐

5 5 % であった

実施例 1 4

L / G 比 7 5 / 2 5、分子量 1 2 7 0 0 の乳酸-グリコール酸重合体 (P L G A) 4 g を 3. 3 ml ジクロルメタンに溶解し、氷冷下で 5 0 mg/ml 濃度の r h B T C 水溶液を 0. 8 ml 添加し、ポリトロンで 2 0 0 0 0 rpm、2 0 秒間乳化
10 した。乳化液を 0. 1 % P V A 水溶液 8 0 0 ml 中に攪拌しながら注入しプロペラ攪拌機で攪拌しながら 3 時間水中乾燥した。1 2 5 μ m メッシュで分級後遠心洗浄後凍結乾燥し、薬物含量 1 % の徐放性 r h B T C 含有マイクロカプセルを得た。

実施例 1 5

15 L / G 比 7 5 / 2 5、分子量 1 2 7 0 0 の乳酸-グリコール酸重合体 4 g を 3. 3 ml ジクロルメタンに溶解し、氷冷下で 1 5 0 mg/ml 濃度の r h B T C 水溶液を 0. 8 ml 添加し、ポリトロンで 2 0 0 0 0 rpm、2 0 秒間乳化した。乳化液を 0. 1 % P V A 水溶液 8 0 0 ml 中に攪拌しながら注入しプロペラ攪拌機で攪拌しながら 3 時間水中乾燥した。1 2 5 μ m メッシュで分級後遠心洗浄後凍
20 結乾燥し、薬物含量 3 % の徐放性 r h B T C 含有マイクロカプセルを得た。

実施例 1 6

L / G 比 7 5 / 2 5、分子量 1 2 7 0 0 の乳酸-グリコール酸重合体 4 g を 3. 3 ml ジクロルメタンに溶解し、氷冷下で 2 5 0 mg/ml 濃度の r h B T C 水溶液を 0. 8 ml 添加し、ポリトロンで 2 0 0 0 0 rpm、2 0 秒間乳化した。乳化
25 液を 0. 1 % P V A 水溶液 8 0 0 ml 中に攪拌しながら注入しプロペラ攪拌機で攪拌しながら 3 時間水中乾燥した。1 2 5 μ m メッシュで分級後遠心洗浄後凍結乾燥し、薬物含量 5 % の徐放性 r h B T C 含有マイクロカプセルを得た。

実施例 1 7

L / G 比 1 0 0 / 0、分子量 1 8 0 0 0 の乳酸-グリコール酸重合体 (ポリ

5 乳酸) 10 g を 8.3 ml ジクロルメタンに溶解し、氷冷下で 273 mg/ml 濃度の rhBTC 水溶液を 2.08 ml 添加し、ポリトロンで 24000 rpm、30 秒間乳化した。乳化液を 0.1% PVA 水溶液 1600 ml 中に攪拌しながら注入しプロペラ攪拌機で攪拌しながら 2 時間水中乾燥した。125 μ m メッシュで分級後遠心洗浄後凍結乾燥し、薬物含量 5.2% の徐放性 rhBTC 含有マイクロカプセルを得た。

実施例 18

10 L/G 比 100/0、分子量 18000 の乳酸-グリコール酸重合体 (ポリ乳酸; PLA) 8 g を 6.7 ml ジクロルメタンに溶解し、氷冷下で 265 mg/ml 濃度の rhBTC 水溶液を 1.67 ml 添加し、ポリトロンで 24000 rpm、30 秒間乳化した。乳化液を一晩真空乾燥し rhBTC 含有 PLA 粉末を得た。これを内径 2.0 mm のテフロンチューブに 46 mg 充填し、60°C で 15 分間加熱した。加熱後棒で圧縮し冷却し成形した。長径 2.0 mm、長さ 1 cm の棒状製剤を得た。

15 実施例 19

分子量 18000 のポリ乳酸 (PLA) 8.0 g をジクロルメタン 6.7 ml に溶解し、264.72 mg/ml 濃度の rhBTC 水溶液 1.67 ml を添加し、氷冷下ポリトロンで 24000 rpm、30 秒間乳化した。乳化液を一昼夜真空乾燥し、rhBTC/PLA 粉末 8.09 g を得た。この粉末約 46 mg を内径 2.0 mm のテフロンチューブに充填し、60°C で 15 分間加熱した。加熱後長径 2.0 mm の棒で圧縮し、冷却後成形した。rhBTC 5.16% 含有ロッド状製剤を得た。

実施例 20

25 分子量 12000 のポリ乳酸 (PLA) 7.0 g をジクロルメタン 5.8 ml に溶解し、368 mg/ml 濃度の rhBTC 水溶液 1.46 ml を添加し、ポリトロンで 25000 rpm、30 秒間乳化した。乳化液を 0.1% PVA 水溶液 1170 ml にホモミキサー (7000 rpm) で攪拌しながら注入し、プロペラ攪拌機で攪拌しながら 2 時間水中乾燥した。125 μ m メッシュで分級後、遠心洗浄操作後凍結乾燥し、薬物含量 5.75% のマイクロカプ

セルを得た。これを内径2.0mmのテフロンチューブに充填し、60℃で15分間加熱した。加熱後長径2.0mmの棒で圧縮し、冷却後成形した。rhBTC 5.75%含有ロッド状製剤を得た。

実施例21

- 5 分子量12000のポリ乳酸(PLA) 7.0gおよび酸化亜鉛33.6mgをジクロルメタン5.8mlに溶解し、368mg/ml濃度のrhBTC水溶液1.41mlを添加し、ポリトロンで25000rpm、30秒間乳化した。乳化液を0.1%PVA水溶液1170mlにホモキサー(7000rpm)で攪拌しながら注入し、プロペラ攪拌機で攪拌しながら2時間水中乾燥した。125 μ mメッシュで分級後、遠心洗浄操作後凍結乾燥し、薬物含量
- 10 6.55%のマイクロカプセルを得た。これを内径2.0mmのテフロンチューブに充填し、60℃で15分間加熱した。加熱後長径2.0mmの棒で圧縮し、冷却後成形した。rhBTC 6.55%含有ロッド状製剤を得た。

実施例22

- 15 L/G比75/25、分子量12700の乳酸-グリコール酸重合体(PLGA) 2.4gをジクロルメタン2.0mlに溶解し、439.03mg/ml濃度のrhBTC水溶液1.58mlを添加し、ポリトロンで25000rpm、30秒間乳化した。乳化液を0.1%PVA水溶液400mlにホモキサー(7000rpm)で攪拌しながら注入し、プロペラ攪拌機で攪拌しながら2時間水中乾燥した。125 μ mメッシュで分級後、遠心洗浄操作後凍結乾燥し、マイクロカプセルを得た。これを内径2.0mmのテフロンチューブに充填し、60℃で15分間加熱した。加熱後長径2.0mmの棒で圧縮し、冷却後成形した。rhBTC 10.46%含有ロッド状製剤を得た。

実施例23

- 25 L/G比75/25、分子量12700の乳酸-グリコール酸重合体(PLGA) 3.5gをジクロルメタンに溶解し、rhBTCバルク粉末384mgを添加し、ポリトロン(20000rpm、30秒)で分散させ、s/o分散系を得た。これを一昼夜真空乾燥し、内径2.0mmのテフロンチューブに充填し、60℃で15分間加熱した。加熱後長径2.0mmの棒で圧縮し、冷却

後成形した。r h B T C 8. 14%含有ロッド状製剤を得た。

実施例 2 4

L/G比75/25、分子量12700の乳酸-グリコール酸重合体(PLGA) 2.4gおよび酸化亜鉛24.03mgをジクロルメタン2.0mlに溶解した。得られる溶液に、r h B T C 282.87mgを蒸留水500mgに溶解した溶液を添加し、ポリトロンで25000rpm、30秒間乳化した。乳化液を0.1%PVA水溶液400mlにホモミキサー(7000rpm)で攪拌しながら注入し、プロペラ攪拌機で攪拌しながら2時間水中乾燥した。125 μ mメッシュで分級後、遠心洗浄操作後凍結乾燥し、マイクロカプセルを得た。これを内径2.0mmのテフロンチューブに充填し、60 $^{\circ}$ Cで15分間加熱した。加熱後長径2.0mmの棒で圧縮し、冷却後成形した。r h B T C 9.19%含有ロッド状製剤を得た。

実施例 2 5

L/G比75/25、分子量12700の乳酸-グリコール酸重合体(PLGA) 2.4gおよび酸化亜鉛23.95mgをジクロルメタン2.0mlに溶解し、r h B T C 269.72mgを添加し、ポリトロンで25000rpm、30秒間乳化した。乳化液を0.1%PVA水溶液1170mlにホモミキサー(7000rpm)で攪拌しながら注入し、プロペラ攪拌機で攪拌しながら2時間水中乾燥した。125 μ mメッシュで分級後、遠心洗浄操作後凍結乾燥し、薬物含量6.55%のマイクロカプセルを得た。これを内径2.0mmのテフロンチューブに充填し、60 $^{\circ}$ Cで15分間加熱した。加熱後長径2.0mmの棒で圧縮し、冷却後成形した。r h B T C 8.72%含有ロッド状製剤を得た。

実施例 2 6

r h B T Cバルクを4.39mM酢酸アンモニウム水溶液で2mg/mlとなるように溶解し、急速凍結後、真空乾燥した。分子量12000のポリ乳酸(PLA) 3.5gと酸化亜鉛35.5mgをジクロルメタン3.5mlに溶解し、これに急速凍結乾燥したr h B T C 399mgを添加し、ポリトロンで分散した。得られるs/o分散系を、一昼夜真空乾燥し、内径2.0mmのテ

フロンチューブに充填し、60℃で15分間加熱した。加熱後長径2.0mmの棒で圧縮し、冷却後成形した。rhBTC10.11%含有ロッド状製剤を得た。

実施例27

- 5 rhBTCバルクを4.39mM酢酸アンモニウム水溶液で2mg/mlとなるように溶解し、急速凍結後、真空乾燥した。L/G比75/25、分子量12700の乳酸-グリコール酸重合体(PLGA)4.5gと酸化亜鉛45.3mgをジクロルメタン4.5mlに溶解し、これに急速凍結乾燥したrhBTC515mgを添加し、ポリトロンで分散した。得られるs/o分散系を、
- 10 一昼夜真空乾燥し、内径2.0mmのテフロンチューブに充填し、60℃で15分間加熱した。加熱後長径2.0mmの棒で圧縮し、冷却後成形した。rhBTC10.02%含有ロッド状製剤を得た。

実験例1

- 15 実施例14、15及び16で調製した徐放性rhBTC含有PLGAマイクロカプセルをラット皮下にrhBTC量として3.2mg/kg、5.9mg/kg及び10.0mg/kgとなるようにそれぞれ投与し、投与部位の残存rhBTC及び血中rhBTC濃度の経時変化を1ヶ月にわたり測定した。各製剤において、図1で示されるようにrhBTCは1ヶ月にわたり残存し、また図2で示されるように血中rhBTC濃度は1ヶ月にわたり検出された。これより本発明の
- 20 徐放性製剤が優れた徐放性を有することは明らかである。

実験例2

- 25 実施例13で調製した徐放性rhBTC含有HGPS製剤をラット皮下にrhBTC量として4.1mg/kgとなるように投与し、残存rhBTCの経時変化を1ヶ月にわたり測定した。図3で示されるように、rhBTCは1ヶ月にわたり残存した。これより本発明の徐放性製剤が優れた徐放性を有することは明らかである。

実験例3

実施例13で調製し、実験例2で徐放性を確認した徐放性rhBTC含有HGPS製剤をSTZ糖尿病モデルラットに皮下又は膵臓局所にrhBTC量と

して45 mg/kg 投与し、8週後に血中グルコース濃度及び血中インスリン濃度を測定した。図4で示されるように、無処置糖尿病ラット群と比較して皮下投与群及び膵臓局所投与群では血糖降下作用（血中グルコース濃度の低下）が見られ、耐糖能が改善した。また、図5で示されるように、膵臓局所投与群では

5 インスリンの分泌が確認された。これより、本発明の製剤が膵臓機能を改善させ、糖尿病の治療又は予防に有用なことは明らかである。

産業上の利用可能性

BTC蛋白質又はそのムテイン又は塩を含有する本発明の製剤は、膵臓機能を改善させ、糖尿病等の治療又は予防に有用である。

10

請求の範囲

1. ベータセルリン蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有する徐放性製剤。
- 5 2. ベータセルリン蛋白質が、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5及び配列番号：6からなる群から選ばれる少なくとも1つの配列番号で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質である請求項1記載の徐放性製剤。
3. ベータセルリン蛋白質が、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質又は配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質である請求項1記載の徐放性製剤。
- 10 4. ベータセルリン蛋白質が、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質である請求項1記載の徐放性製剤。
5. ベータセルリン蛋白質のムテインが、①配列番号：1もしくは配列番号：2で表わされるアミノ酸配列の1ないし40個程度のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1もしくは配列番号：2で表わされるアミノ酸配列の1ないし40個程度のアミノ酸が他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列、又は③配列番号：1もしくは配列番号：2で表わされるアミノ酸配列に1ないし40個程度のアミノ酸が付加したアミノ酸配列を有する蛋白質である請求項1記載の徐放性製剤。
- 15 6. ベータセルリン蛋白質のムテインが、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のN末端から12個又は30個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を有する蛋白質である請求項1記載の徐放性製剤。
7. ベータセルリン蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩及びキャリアーを含有する請求項1記載の徐放性製剤。
- 25 8. キャリアーがポリマーである請求項7記載の徐放性製剤。
9. ポリマーが生体内分解性ポリマーである請求項8記載の徐放性製剤。
10. 生体内分解性ポリマーが脂肪族ポリエステルである請求項9記載の徐放性製剤。
11. 脂肪族ポリエステルが乳酸-グリコール酸重合体である請求項10記載

の徐放性製剤。

- 1 2. 乳酸－グリコール酸重合体の乳酸／グリコール酸組成比が約100／0ないし約40／60である請求項11記載の徐放性製剤。
- 1 3. 乳酸－グリコール酸重合体の重量平均分子量が約3,000ないし約80,000である請求項11記載の徐放性製剤。
- 5 1 4. ポリマーが生体内非分解性ポリマーである請求項8記載の徐放性製剤。
- 1 5. 生体内非分解性ポリマーがポリグリセリン脂肪酸エステルである請求項14記載の徐放性製剤。
- 1 6. 膵臓機能改善剤である請求項1記載の徐放性製剤。
- 10 1 7. 糖尿病の治療又は予防剤である請求項1記載の徐放性製剤。
- 1 8. 非経口投与剤である請求項1記載の徐放性製剤。
- 1 9. 膵臓への局所投与剤である請求項1記載の徐放性製剤。
- 2 0. 皮下投与剤である請求項1記載の徐放性製剤。
- 2 1. 筋肉内投与剤である請求項1記載の徐放性製剤。
- 15 2 2. 腹腔内投与剤である請求項1記載の徐放性製剤。
- 2 3. ベータセルリン蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩を含有する膵臓への局所投与剤。
- 2 4. 徐放性製剤を製造するためのベータセルリン蛋白質又はそのムテイン又は塩の使用。
- 20 2 5. 膵臓への局所投与剤を製造するためのベータセルリン蛋白質もしくはそのムテイン又はその塩の使用。
- 2 6. 哺乳動物に対して請求項1記載の徐放性製剤の有効量を投与することを特徴とする糖尿病の治療方法。
- 2 7. 哺乳動物に対して請求項23記載の局所投与剤の有効量を投与することを特徴とする糖尿病の治療方法。
- 25

図 1

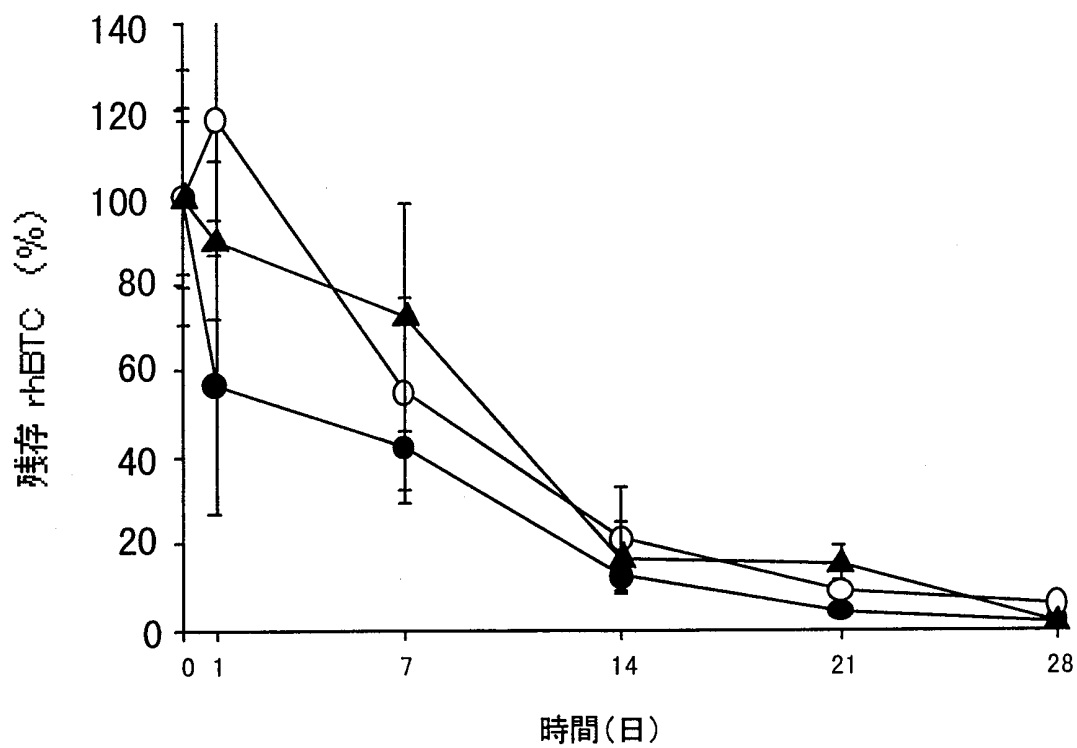


図 2

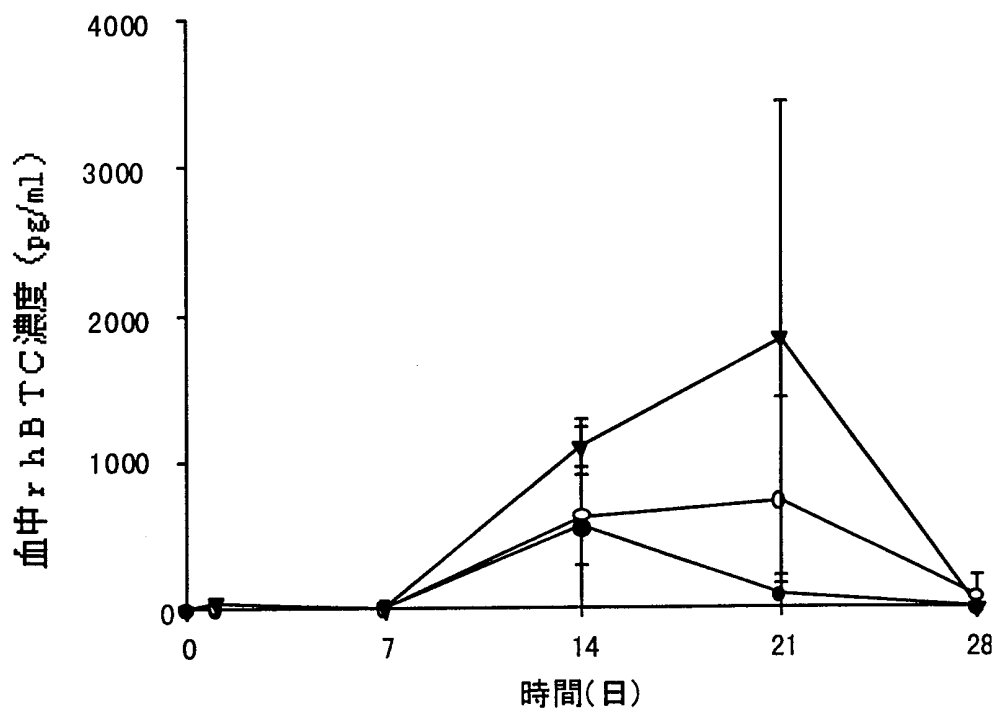


図 3

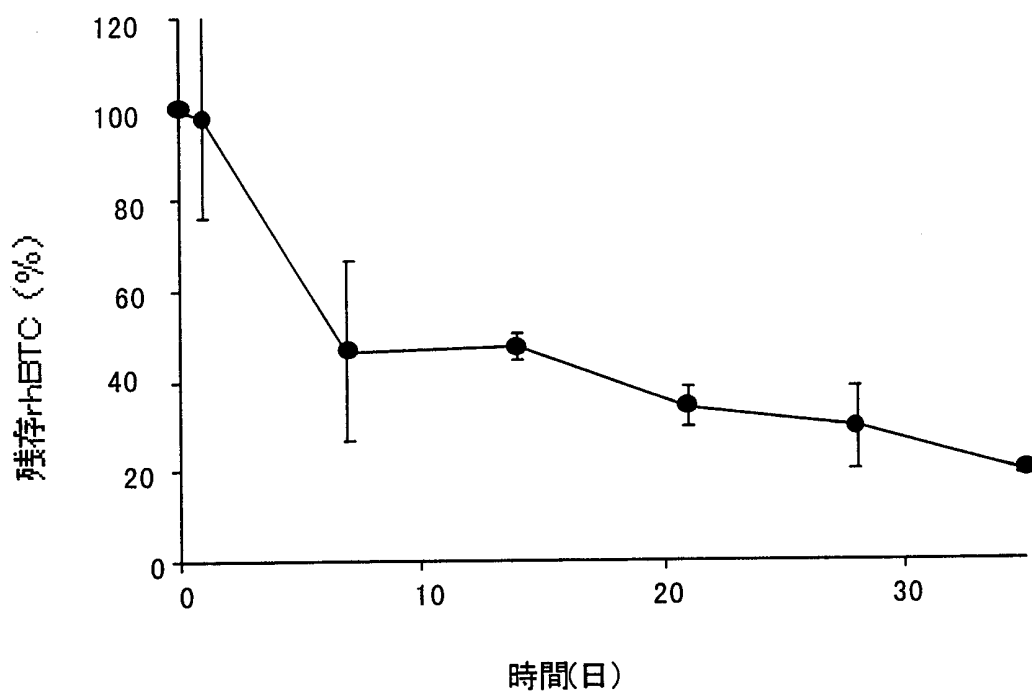


図 4

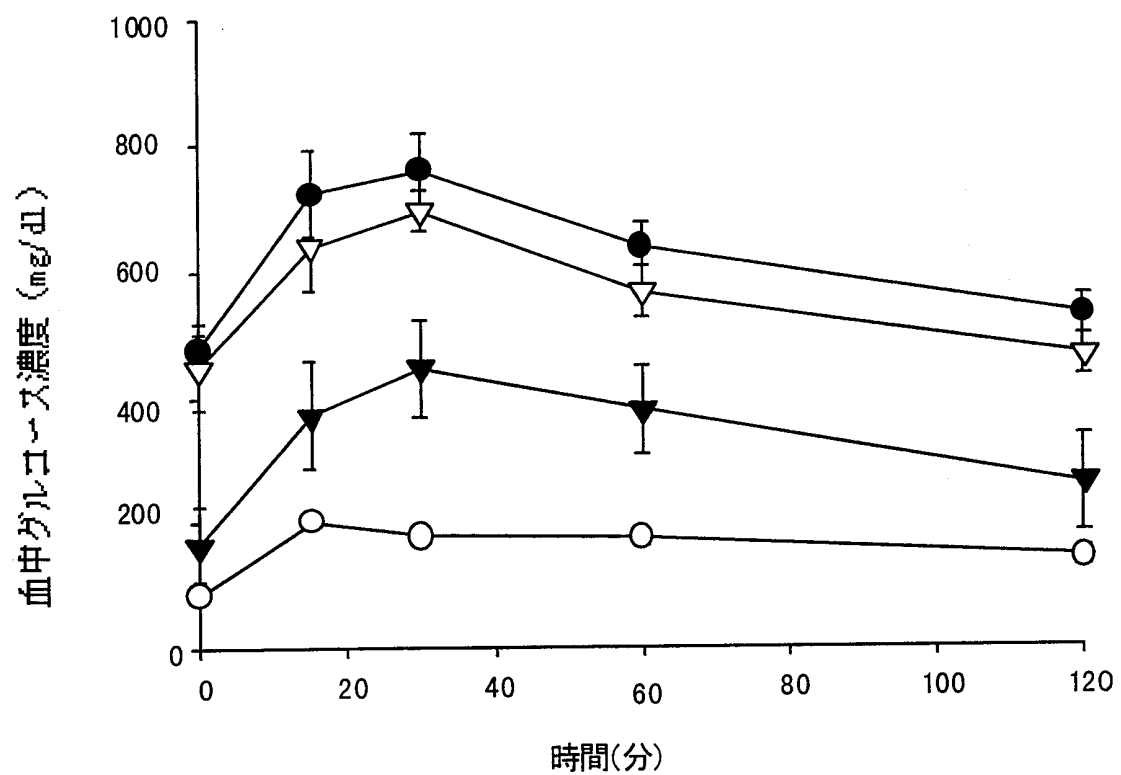
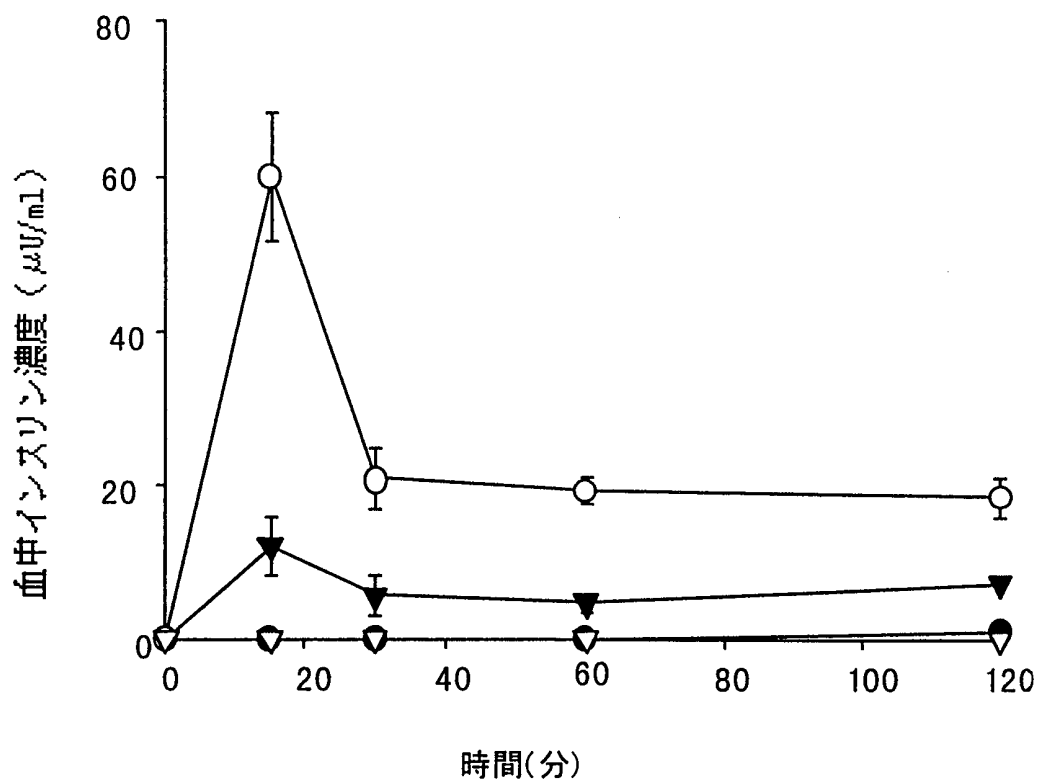


図 5



1/3

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Betacellulin Protein-containing Preparation

<130> 2567WOOP

<150> JP 10-310343

<151> 1998-10-30

<160> 8

<210> 1

<211> 80

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

20 25 30

Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

35 40 45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys

50 55 60

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr

65 70 75 80

<210> 2

<211> 80

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 2

Asp Gly Asn Thr Thr Arg Thr Pro Glu Thr Asn Gly Ser Leu Cys Gly

1 5 10 15

2/3

Ala Pro Gly Glu Asn Cys Thr Gly Thr Thr Pro Arg Gln Lys Val Lys

20 25 30

Thr His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile His

35 40 45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Asp Glu Gln Thr Pro Ser Cys Ile Cys

50 55 60

Glu Lys Gly Tyr Phe Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr

65 70 75 80

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile

1 5 10

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val

1 5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Glu Gln Thr Pro Ser Cys

1 5

<210> 6

<211> 11

3/3

<212> PRT

<213> Human

<400> 6

Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 240

<212> DNA

<213> Human

<400> 7

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60

AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120

CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180

TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA CTTGTTTTAC 240

<210> 8

<211> 240

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 8

GATGGGAACA CAACCAGAAC ACCAGAAACC AATGGCTCTC TTTGTGGAGC TCCTGGGGAA 60

AACTGCACAG GTACCACCCC TAGACAGAAA GTGAAAACCC ACTTCTCTCG GTGCCCCAAG 120

CAGTACAAGC ATTACTGCAT CCATGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGACGA GCAAACCTCC 180

TCCTGCATCT GTGAGAAAGG CTACTTTGGG GCTCGGTGTG AGCGAGTGA CCTGTTTTAC 240

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05989

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ A61K 38/00, 38/08, 38/10, 38/17 A61P 3/10

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.⁷ A61K 38/00 - 38/40

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/CAPULS (STN), Medline (STN), WPI/L (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 97/17086, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 15 May, 1997 (15.05.97) & JP, 9-188630, A & EP, 862451, A	1-25
Y	EP, 647449, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 12 April, 1995 (12.04.95) & JP, 7-69917, A	1-13, 16-22
Y	US, 5538739, A (Sandoz Ltd.), 23 July 1996 (23.07.96) & JP, 3-68511, A	1-13, 16-22
Y	EP, 793959, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 10 September 1997 (10.09.97), especially Example 4 & JP, 9-295933, A	1-8, 14-22
Y	WO, 96/30050, A (The Regents of the University of California), 03 October, 1996 (03.10.96), especially, Examples 9-12 & JP, 11-502413, A	19, 23, 25

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
10 February, 2000 (10.02.00)

Date of mailing of the international search report
29 February, 2000 (29.02.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05989

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 26,27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claims 26 and 27 relates to a method for treatment of the human body by therapy , which does not require an international search report by this International Search Authority in accordance with PCT Article 17(2) (a)(i) and Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claim 1 to 22, 24 and 26 relate to sustained release preparations of a beta cellulin protein, its mutein or a salt thereof and it is recognized that the special technical feature of these claims resides in the sustained release preparations. Claims 23, 25 and 27 relate to preparations of a betacellulin protein, its mutein or a salt thereof for topical administration to the pancreas and it is recognized that the special technical feature of these claims resides in the topical administration to the pancreas. Such being the case, these groups of inventions differ from each other in the special technical feature and are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K 38/00, 38/08, 38/10, 38/17 A61P 3/10

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. Cl⁷ A61K 38/00 - 38/40

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/CAPULS(STN), Medline(STN), WPI/L(DIALOG)

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
Y	WO 97/17086 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 15 May 1997 (15.05.97) & JP 9-188630 A & EP 862451 A	1-25
Y	EP 647449 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 12 April 1995 (12.04.95) JP 7-69917 A	1-13 16-22
Y	US 5538739 A (Sandoz Ltd.) 23 July 1996 (23.07.96) & JP 3-68511 A	1-13 16-22
Y	EP 793959 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 10 September 1997 (10.09.97) 特に実施例4 & JP 9-295933 A	1-8 14-22

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」 国際出願日前の出願または特許であるが、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 10.02.00

国際調査報告の発送日

29 02 00

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)
 大宅 郁治
 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
Y	WO 96/30050 A (The Regents of the University of California) 3 October 1996 (03.10.96) 特に実施例 9 ~ 12 & JP 11-502413 A	19、23、 25

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 26、27 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲26及び27は、治療による人体の処置方法を包含するものであるので、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1~22、24、26は、ベータセルリン蛋白質若しくはそのムテイン又はその塩の徐放性製剤に関するものであり、その特別の技術的特徴は徐放性製剤にあるものと認める。また、請求の範囲23、25、27は、ベータセルリン蛋白質若しくはそのムテイン又はその塩の膀胱への局所投与剤に関するものであり、その特別の技術的特徴は膀胱への局所投与にあるものと認める。このように、これらの発明群の特別の技術的特徴は異なることから、これら2つの発明群が単一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明であるとは認められない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。