(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3822383号

(P3822383)

(45)発行日　平成18年9月20日(2006.9.20)　(24)登録日　平成18年6月30日(2006.6.30)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02
A61K 35/22	(2006.01)	A61K	35/22
A61K 47/26	(2006.01)	A61K	47/26
A61K 9/19	(2006.01)	A61K	9/19
A61P 7/02	(2006.01)	A61P	7/02

請求項の数 8　(全 27 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平11-153856
(22)出願日　平成11年6月1日(1999.6.1)
(62)分割の表示　特願平7-516672の分割
原出願日　平成6年12月16日(1994.12.16)
(65)公開番号　特開2000-26309(P2000-26309A)
(43)公開日　平成12年1月25日(2000.1.25)
審査請求日　平成13年12月14日(2001.12.14)
(31)優先権主張番号　特願平5-318405
(32)優先日　平成5年12月17日(1993.12.17)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

前置審査

(73)特許権者　000181147
持田製薬株式会社
東京都新宿区四谷１丁目７番地
(74)代理人　100080159
弁理士　渡辺　望稔
(74)代理人　100090217
弁理士　三和　晴子
(72)発明者　国広　靖之
東京都新宿区四谷一丁目７番地
持田製薬株式会社内
(72)発明者　田中　亮
東京都新宿区四谷一丁目７番地
持田製薬株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】可溶性トロンボモジュリン含有組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

可溶性トロンボモジュリンと、マルトースと、非イオン性界面活性剤とを含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項２】

前記可溶性トロンボモジュリンが、ヒト尿由来トロンボモジュリンである請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項３】

前記可溶性トロンボモジュリンが、組換えヒトトロンボモジュリンである請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項４】

ヒト胎盤ｃＤＮＡライブラリーより釣り上げたＤＮＡを利用してアミノ末端のアミノ酸配列がアラニン－プロリン－アラニン－であるアミノ酸４９８残基よりなるヒトトロンボモジュリンを発現するベクターを調製し、これをＣＨＯ細胞に組み込んだ後、遺伝子増幅を行って得られる高発現株の培養液より精製して得られうる組換えヒトトロンボモジュリンと、マルトースと、非イオン性界面活性剤とを含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項５】

アミノ末端のアミノ酸配列がアラニン－プロリン－アラニン－であるアミノ酸４９８残基よりなる組換えヒトトロンボモジュリンと、マルトースと、非イオン性界面活性剤とを含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項６】
さらに、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる１種あるいは２種以上とを含有することを特徴とする請求項１～５のいずれかに記載の医薬組成物。
【請求項７】
凍結乾燥処理されている請求項１～６のいずれかに記載の医薬組成物。
【請求項８】
可溶性トロンボモジュリンに、マルトースおよび非イオン性界面活性剤を添加することを特徴とする可溶性トロンボモジュリンの安定化方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、１種または２種以上の可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる１種あるいは２種以上を必須成分として含有することを特徴とする組成物およびその組成物の製法に関する。
また、本発明は、１種または２種以上の可溶性トロンボモジュリンと、非イオン性界面活性剤を必須成分として含有することを特徴とする組成物およびその組成物の製法に関する。
また、本発明は、１種または２種以上の可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる１種あるいは２種以上と、非イオン性界面活性剤を必須成分として含有することを特徴とする組成物およびその組成物の製法に関する。
また、本発明は、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる１種あるいは２種以上を含有することを特徴とする可溶性トロンボモジュリンの安定化剤に関する。
また、本発明は、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる１種あるいは２種以上を添加することを特徴とする可溶性トロンボモジュリンの安定化方法に関する。
また、本発明は、非イオン性界面活性剤を含有することを特徴とする可溶性トロンボモジュリンの吸着防止剤に関する。
また、本発明は、非イオン性界面活性剤を添加することを特徴とする可溶性トロンボモジュリンの吸着防止方法に関する。
【０００２】
【従来の技術】
トロンボモジュリンはトロンビンを向凝固酵素から抗凝固酵素へと変換せしめるユニークな性質を持つ血管内皮表面に存在する蛋白質として、１９８１年エスモン（Ｅｓｍｏｎ）ら（プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓｏｆ ｔｈｅ ＵＳＡ）７８、２２４９－２２５４、１９８１）により報告された。続く論文において、ウサギ肺組織よりの単離精製に成功し、これを報告した（ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）２５７（２），８５９－８６４，１９８２）。さらに、ヒトトロンボモジュリンの全ＤＮＡ配列およびアミノ酸配列が報告され（エンボ・ジャーナル（ＥＭＢＯ Ｊｏｕｒｎａｌ）６，１８９１－１８９７，１９８７；バイオケミストリー（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）２６（１４），４３５０－４３５７，１９８７）、各ドメインの役割が明らかにされつつある。トロンボモジュリンはトロンビンと結合し、トロンビンの持つ血液凝固作用を失わせしめ、トロンビン－トロンボモジュリン複合体はプロテインＣを活性化することにより抗凝固作用を示すとされている。すなわち、トロンボモジュリンは血液凝固阻害作用と線溶促進作用の両方の作用を発揮する可能性があり、臨床応用が期待されている。
【０００３】

従来、血液凝固能異常に係わる疾患の治療剤としては、抗血液凝固作用をもったアンチトロンビンＩＩＩやヘパリンが、一方、血栓溶解作用をもったウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーター等が使用されている。しかしながら、これらの物質は、出血傾向等の副作用を有し、作用が抗血液凝固あるいは血栓溶解のいずれかに偏っている。従って、この両方の作用を発揮する可能性があるトロンボモジュリンあるいは基本的にトロンビンと親和性を有しプロテインＣの活性化を促進するというトロンボモジュリン活性を有したトロンボモジュリン様物質の臨床応用に期待が高まっている。

【０００４】

ヒトトロンボモジュリンは、溶解性が低く、特に医薬品として利用する場合、精製や製剤化等で問題を生じていた。すなわち、トロンボモジュリンは膜結合性であり、アミノ末端領域、ＥＧＦ様構造領域、Ｏ－グリコシル化部位領域、細胞膜貫通領域および細胞質内領域の５つからなる完全長のアミノ酸配列を持つものは精製過程あるいは製剤化等に際して溶解補助剤を添加する必要がある。このため溶解性の高いトロンボモジュリン様物質（以下可溶性トロンボモジュリンと呼ぶ）が望まれていた。抗原性等の安全性のことを考慮すると、天然型であるヒト尿由来可溶性トロンボモジュリンなどがより望まれている。このような可溶性トロンボモジュリンの例のうち、遺伝子工学的手法によるものとして、細胞膜貫通領域および細胞質内領域を除去した可溶性トロンボモジュリン（特開平１－６２１９号公報、特開平２－２５５６９９号公報、特開平３－１３３３８０号公報、特開平３－２５９０８４号公報、特開平４－２１０７００号公報、特表平３－５０３７５７号公報、特表平４－５０５５５４号公報、ＥＰ４７４２７３号公報、ＷＯ９１／０４２７６号公報、ＷＯ９１／０５８０３号公報、ＷＯ９１／１５５１４号公報、ＷＯ９２／００３２５号公報、ＷＯ９２／０３１４９号公報、ＷＯ９３／１５７５５号公報、土肥ら，日本薬学会，第１１３年会，講演要旨集３，演題番号３０ＥＭ１４－１，１９９３年）等が挙げられる。あるいは天然型としてヒト尿由来の可溶性トロンボモジュリン（特開昭６３－３０４２３号公報、特開昭６３－１４６８９８号公報、特開平３－８６９００号公報、特開平３－２１８３９９号公報、イシイ（Ｉｓｈｉｉ）ら，ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション（Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　ＣｌｉｎｉｃａｌＩｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ）７６，２１７８－２１８１，１９８５、平本ら，日本薬学会，第１０８年会，講演要旨集，演題番号６Ｆ０５　１１－１，１９８８年、矢谷ら，血液と脈管，２０，１９７－２００，１９８９、ヤマモト（Ｙａｍａｍｏｔｏ）ら，ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）１１３，４３３－４４０，１９９３）等の公知のものがある。

【０００５】

具体的には、遺伝子工学的手法によるものとして、特開平１－６２１９号公報には少なくともアミノ末端から３４５－４６２番目のアミノ酸配列を含む可溶性トロンボモジュリンが、特開平２－２５５６９９号公報には１１５のアミノ酸残基からなる可溶性トロンボモジュリンが、特開平３－１３３３８０号公報には少なくともアミノ末端から１－４９７番目のアミノ酸残基を含む可溶性トロンボモジュリンが、特開平３－２５９０８４号公報には４６８のアミノ酸残基からなる可溶性トロンボモジュリンが、特開平４－２１０７００号公報には硫酸化グリコサミノグリカンで修飾されない可溶性トロンボモジュリンが、特表平３－５０３７５７号公報にはヒト組織プラスミノーゲンアクチベーターのアミノ酸配列の一部を含んでいてもよい可溶性トロンボモジュリンが、特表平４－５０５５５４号公報にはヒト組織プラスミノーゲンアクチベーター等のアミノ酸配列の一部を含んでいてもよい可溶性トロンボモジュリンが、ＥＰ４７４２７３号公報には１９残基からなるトロンビン結合部位とプロテインＣ活性化部位とを含んでなる可溶性トロンボモジュリンが、ＷＯ９１／０４２７６号公報にはコンドロイチン及び／又はコンドロイチン硫酸を含む糖鎖を有する可溶性トロンボモジュリンが、ＷＯ９１／０５８０３号公報には硫酸化グリコサミノグリカンで修飾された可溶性トロンボモジュリンが、ＷＯ９１／１５５１４号公報にはメチオニンを他のアミノ酸に置換することによって酸化を防止した可溶性トロンボモジュリンが、ＷＯ９２／００３２５号公報には組換ヒト尿由来可溶性トロンボモジュリンお

よびその変異型物質が、ＷＯ９２／０３１４９号公報にはＯ－グリコシル化部位領域の糖鎖を修飾あるいはＯ－グリコシル化部位領域を欠失させた可溶性トロンボモジュリンが、ＷＯ９３／１５７５５号公報にはアミノ酸配列を修飾することによって蛋白分解酵素による分解を防止した可溶性トロンボモジュリンが、ＷＯ９３／２５６７５号公報にはアミノ酸配列を修飾することによってコファクター活性を修飾した可溶性トロンボモジュリンが、各々開示されている。さらに、土肥らはウシトロンボモジュリン由来の酸性アミノ酸配列を含む配列を付加した可溶性トロンボモジュリンを報告している（日本薬学会，第１１３年会，講演要旨集３，演題番号３０ＥＭ１４－１，１２８頁，１９９３年）。

【０００６】

また、ヒト尿由来の該物質として、特開昭６３－３０４２３号公報には非還元状態での分子量が２００，０００、４８，０００および４０，０００からなる可溶性トロンボモジュリンの混合物が、特開昭６３－１４６８９８号公報には非還元状態での分子量が３９，０００±１０，０００および３１，０００±１０，０００の可溶性トロンボモジュリンが、特開平３－８６９００号公報には非還元状態での分子量が５５，０００～５８，０００および６０，０００～６５，０００の可溶性トロンボモジュリンが、特開平３－２１８３９９号公報には非還元状態での分子量が７２，０００±３，０００および７９，０００±３，０００の可溶性トロンボモジュリンが、各々開示されている。さらに、イシイ（Ｉｓｈｉｉ）らは血漿中および尿中の可溶性トロンボモジュリンを（ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション（Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ）７６，２１７８－２１８１，１９８５）、平本らは血中あるいは尿中の数種の可溶性トロンボモジュリンを（日本薬学会，第１０８年会，講演要旨集，演題番号６Ｆ０５ １１－１，１９８８年）、矢谷らは尿中の還元状態での分子量が６３，０００の可溶性トロンボモジュリンを（血液と脈管，２０，１９７－２００，１９８９）、ヤマモト（Ｙａｍａｍｏｔｏ）らは４６８のアミノ酸残基からなる可溶性トロンボモジュリンを（ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）１１３，４３３－４４０，１９９３）、各々報告している。

【０００７】

しかしながら、可溶性トロンボモジュリンは化学的に十分安定とはいえず、例えば凍結乾燥下の状態でも、数ヶ月から数年に渡る長期間室温に放置すると、活性の低下、凝集物の出現等が起こり問題となっている。また、凍結乾燥工程の条件によっては、微量ではあるが変性することがあり問題となっている。可溶性トロンボモジュリンが変性して凝集体を生じ、凝集体が混在したままヒト血中に投与された場合、その凝集体は変性した蛋白質であるため、過敏症等の免疫反応を惹起する、あるいは塞栓症を誘発する危険性がある。従って、医薬品として使用するにあたっては、医療現場で強く求められている品質を長期間に渡り保証できる製剤を調製することは困難な現状である。

【０００８】

特定の糖類が特定の蛋白質を安定化することがこれまでにいくつか報告されている。しかしながら特定の蛋白質を不安定化する、あるいは安定化しないといった報告もいくつかある。例えば、蔗糖はチューブリンを不安定化する（バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ（Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ）５３２，１５５－１６０，１９７８）、また、グルコース等の糖類はガン壊死因子の活性を安定化するが、ラクトース、マルトース、蔗糖等の糖類は全く安定化効果を示さない（特開昭５９－５９６２５号公報）ことなどが報告されている。

【０００９】

トロンボモジュリンあるいはトロンボモジュリン様物質の製剤化について、これまでに報告がほとんどない。限られた情報であるが、例えば、特開平１－６２１９号公報、特開平２－２５５６９９号公報およびＷＯ９１／０４２７６号公報中の発明の詳細な説明において、注射剤の添加剤として、蔗糖、グリセリン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースの記載がある。これらの物質は増粘剤として添加されており、安定化効果につい

ての記載はおろか具体的な効果の実証がない。また、特開平１－６２１９号公報、特開平２－２５５６９９号公報、特開平３－２１８３９９号公報およびＷＯ９２／００３２５号公報中の発明の詳細な説明において、処方例にアルブミン、精製ゼラチン、あるいはマンニトールを添加した例が記述されているが、その製剤の安定性等、特徴、すなわち添加したことによる効果についての開示がまったくない。

【００１０】

そこで、ヒト尿由来可溶性トロンボモジュリンについて、アルブミン、精製ゼラチン、グリシン、グルコースおよびマンニトールとの組成物を調製し、さらなる試験を行ったところ、いずれも長期に渡る安定性が不十分であることが判った。このように、可溶性トロンボモジュリンを製剤化するにあたり、長期のしかも室温での保存に耐え得る技術の開示は未だなされていない。

また、可溶性トロンボモジュリンは比活性が非常に高いため、臨床使用時は１回の投与蛋白量が微量であり、更に輸液で非常に低濃度に希釈して持続投与する場合が多い。可溶性トロンボモジュリンについて輸液で低濃度に希釈したときにはガラス容器、プラスチック製容器あるいは輸液セットへの吸着が起こり、特にプラスチック製容器および輸液セットへの吸着が著しいことが判った。従って、実際に投与をするときに、有効投与量が減少してしまうおそれが生じることが判った。吸着を防止する手段として、塩基性アミノ酸によるセクレチンの吸着防止（特開昭５７－１６９４２５号公報）、セルロース誘導体や非イオン性界面活性剤、メチルシクロデキストリンによるセクレチン、インシュリン、主に低分子ペプタイドの吸着防止（特開昭５８－２０６５１３号公報、特開昭５９－７６０２４号公報、特開昭６０－１００５２４号公報）の例が報告されているが、可溶性トロンボモジュリンにおいて吸着を防止する技術についての開示は未だされていない。

【００１１】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、長期保存時でも安定性に優れた可溶性トロンボモジュリン含有組成物を提供することにある。更に低濃度に希釈したときも容器への吸着が起こらない可溶性トロンボモジュリン含有組成物を提供することにある。更に詳しくは、長期の室温保存時でも安全で安定性に優れた医薬品として使用可能な可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を提供することにある。更に、低濃度水溶液においても容器への吸着による配合量低下を起こさない医薬品として使用可能な可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を提供することにある。

また、本発明の目的は、可溶性トロンボモジュリンの安定化剤および安定化方法を提供することにある。

また、本発明の目的は、可溶性トロンボモジュリンの吸着防止剤および吸着防止方法を提供することにある。

【００１２】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは可溶性トロンボモジュリンの安定性に関する問題点を解消すべく、特に凍結乾燥した組成物について鋭意研究を行い、マルトース（α形、β形、またはα形とβ形の任意比率混合物であっても良く、以下、特に記載のない場合は、マルトースというときにはこれら全てを包含する）、ラクトース（α形、β形、またはα形とβ形の任意比率混合物であっても良く、以下、特に記載のない場合は、ラクトースというときにはこれら全てを包含する）、蔗糖、あるいはアルギニン（Ｄ体、Ｌ体またはラセミ体のいずれであっても良く、以下、特に記載のない場合は、アルギニンというときはこれら全てを包含する）およびその塩に優れた安定化効果、特に長期間に渡る安定化効果、を見いだした。更に、非イオン性界面活性剤に可溶性トロンボモジュリンを低濃度に希釈した場合の容器への吸着防止効果を見いだして本発明を完成した。

【００１３】

従って、本発明は下記のいずれかの発明を提供する。

（１）可溶性トロンボモジュリンと、マルトースと、非イオン性界面活性剤とを含有する

ことを特徴とする医薬組成物。
（２）前記可溶性トロンボモジュリンが、ヒト尿由来トロンボモジュリンである上記（１）に記載の医薬組成物。
（３）前記可溶性トロンボモジュリンが、組換えヒトトロンボモジュリンである上記（１）に記載の医薬組成物。
（４）ヒト胎盤ｃＤＮＡライブラリーより釣り上げたＤＮＡを利用してアミノ末端のアミノ酸配列がアラニン－プロリン－アラニン－であるアミノ酸４９８残基よりなるヒトトロンボモジュリンを発現するベクターを調製し、これをＣＨＯ細胞に組み込んだ後、遺伝子増幅を行って得られる高発現株の培養液より精製して得られうる組換えヒトトロンボモジュリンと、マルトースと、非イオン性界面活性剤とを含有することを特徴とする医薬組成物。
（５）アミノ末端のアミノ酸配列がアラニン－プロリン－アラニン－であるアミノ酸４９８残基よりなる組換えヒトトロンボモジュリンと、マルトースと、非イオン性界面活性剤とを含有することを特徴とする医薬組成物。
（６）さらに、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる１種あるいは２種以上とを含有することを特徴とする上記（１）～（５）のいずれかに記載の医薬組成物。
（７）凍結乾燥処理されている上記（１）～（６）のいずれかに記載の医薬組成物。
（８）可溶性トロンボモジュリンに、マルトースおよび非イオン性界面活性剤を添加することを特徴とする可溶性トロンボモジュリンの安定化方法。
【００１４】
可溶性トロンボモジュリンは、ヒト尿由来可溶性トロンボモジュリンであることが好ましい。また、可溶性トロンボモジュリンは、組換えヒト可溶性トロンボモジュリンであることも好ましい。従って、本発明の可溶性トロンボモジュリンは、前述の従来の技術で引用された公知文献中の可溶性トロンボモジュリンを含有し、これらの文献中の記載を引用し本発明の可溶性トロンボモジュリンの内容とする。
【００１５】
そして、ヒト尿由来可溶性トロンボモジュリンが以下の部分構造及び性質を有する物質であることがさらに好ましい。
イ）分子量　７２，０００±３，０００
［非還元状態でのドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ＰＡＧＥ）により測定］
ロ）等電点　３．９±０．２
ハ）末端アミノ酸配列
Ｎ末端　：
Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ
－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｈｉｓ－Ａｓｐ
－Ｃｙｓ－Ｐｈｅ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ
－Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－
Ｃ末端　：
－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｒｇ、または－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ａｒｇ
ニ）糖含量（重量％）
中性糖　：５．５±１．０％
［フェノール硫酸法で測定］
アミノ糖　：２．２±１．０％
［Ｅｌｓｏｎ－Ｍｏｒｇａｎ法（Ｂｌｉｘ変法）で測定］
シアル酸　：２．８±１．５％
［Ｗａｒｒｅｎ法で測定］
【００１６】
また、ヒト尿由来可溶性トロンボモジュリンが以下の部分構造及び性質を有する物質であ

ることがさらに好ましい。
イ）分子量　７９，０００±３，０００
［非還元状態でのＳＤＳ－ＰＡＧＥにより測定］
ロ）等電点　３．８±０．２
ハ）末端アミノ酸配列
Ｎ末端　：
Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ
－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｈｉｓ－Ａｓｐ
－Ｃｙｓ－Ｐｈｅ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ
－Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－
Ｃ末端　：
－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｒｇ、または－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ａｒｇ
ニ）糖含量（重量％）
中性糖　：６．２±１．０％
［フェノール硫酸法で測定］
アミノ糖　：３．１±１．０％
［Ｅｌｓｏｎ－Ｍｏｒｇａｎ法（Ｂｌｉｘ変法）で測定］
シアル酸　：３．８±１．５％
［Ｗａｒｒｅｎ法で測定］

【００１７】
また、２種あるいは３種以上の分子種の可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる１種あるいは２種以上を必須成分とする可溶性トロンボモジュリン含有組成物、並びに同組成物において非イオン性界面活性剤が添加された可溶性トロンボモジュリン含有組成物、および、可溶性トロンボモジュリンと非イオン性界面活性剤を必須成分とする可溶性トロンボモジュリン含有組成物を提供する。このときの可溶性トロンボモジュリンの好ましい態様は前記と同様である。
また、前記のいずれの組成物も凍結乾燥処理されているのが好ましい。

【００１８】
また、可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる１種あるいは２種以上を必須成分とする可溶性トロンボモジュリン含有組成物と、非イオン性界面活性剤を、それぞれ別々に用意し、用時両者を混合する組成物形態を提供する。このときの可溶性トロンボモジュリンの好ましい態様は前記と同様である。

【００１９】
また、可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界面活性剤から選ばれる１種あるいは２種以上とを溶解混合する工程を含む可溶性トロンボモジュリン含有組成物の製法を提供する。

【００２０】
そして、可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界面活性剤から選ばれる１種あるいは２種以上との溶液状態の組成物を凍結乾燥する工程を含む上述の可溶性トロンボモジュリン含有組成物の製法を提供する。

【００２１】
また、２種あるいは３種以上の分子種の可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界面活性剤から選ばれる１種あるいは２種以上とを溶解混合する工程を含む上述の可溶性トロンボモジュリン含有組成物の製法を提供する。

【００２２】
そして、２種あるいは３種以上の分子種の可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界面活性剤から選ばれる１

種あるいは２種以上との溶液状態の組成物を凍結乾燥する工程を含む上述の可溶性トロンボモジュリン含有組成物の製法を提供する。

【００２３】

そして、可溶性トロンボモジュリンに、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる１種あるいは２種以上を添加する可溶性トロンボモジュリンの安定化方法を提供する。また、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる１種あるいは２種以上からなる可溶性トロンボモジュリンの安定化剤を提供する。そして非イオン性界面活性剤を添加する可溶性トロンボモジュリンの吸着防止方法および非イオン性界面活性剤からなる可溶性トロンボモジュリンの吸着防止剤を提供する。

【００２４】

また、２種あるいは３種以上の分子種の可溶性トロンボモジュリンにマルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる１種あるいは２種以上を添加する可溶性トロンボモジュリンの安定化方法と、２種あるいは３種以上の分子種の可溶性トロンボモジュリンに非イオン性界面活性剤を添加する可溶性トロンボモジュリンの吸着防止方法を提供する。

【００２５】

また、本発明は、医薬として有効な量の可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる１種あるいは２種以上を必須成分とする可溶性トロンボモジュリン含有医薬組成物、並びに同組成物において医薬添加可能な非イオン性界面活性剤が添加された可溶性トロンボモジュリン含有医薬組成物、および、医薬として有効な量の可溶性トロンボモジュリンと、医薬添加可能な非イオン性界面活性剤が添加された可溶性トロンボモジュリン含有医薬組成物を提供し、長期保存時でも安定性に優れ、低濃度に希釈したときも容器への吸着が起こらない血液凝固疾患に係わる疾病の予防治療薬を提供する。このときの可溶性トロンボモジュリンの好ましい態様は前記と同様である。

【００２６】

【発明の実施の形態】

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明において用いられる可溶性トロンボモジュリンは、天然型あるいは遺伝子工学的に生産されたものいずれでもよい。また、遺伝子工学的手法により得られる改変型あるいはキメラ型の可溶性トロンボモジュリンであってもよい。例として、従来の技術に記載した可溶性トロンボモジュリンが挙げられる。医薬品とする場合、好ましくはヒトの可溶性トロンボモジュリンが望まれる。さらに好ましくは、天然型のヒト尿由来の可溶性トロンボモジュリンがよい。

また、具体例としては、特開平３－２１８３９９号公報に記載の非還元状態での分子量が７２，０００±３，０００（以下、ＵＴＭ１とする。）または／および７９，０００±３，０００（以下、ＵＴＭ２とする。）の可溶性トロンボモジュリンが、また、遺伝子工学的に生産されたものとして、ＷＯ９２／００３２５号公報に記載の組換ヒト尿由来可溶性トロンボモジュリン、あるいは特開平１－６２１９号公報において取得されている、アミノ末端のアミノ酸配列がＡｌａ－Ｐｒｏ－Ａｌａ－であるアミノ酸４９８残基よりなる可溶性トロンボモジュリンなどがあげられる。医薬品として用いる場合、可溶性トロンボモジュリンは医薬品として適用可能な程度まで精製されていればよい。

【００２７】

また、可溶性トロンボモジュリンは、上述のような可溶性トロンボモジュリンを単独で用いても、あるいは、２種あるいは３種以上の分子種の可溶性トロンボモジュリン混合物であってもよく、その混合比率は任意である。例えば、特開平３－２１８３９９号公報に開示される２種類のヒト尿中の可溶性トロンボモジュリンの混合物であってもよい。また、ＷＯ９１／０４２７６号公報に示されるような糖鎖構造の異なる可溶性トロンボモジュリンの混合物であってもよい。

このような可溶性トロンボモジュリンは、例えば、天然型については特開平３－２１８３

９９号公報あるいは特開平３－８６９００号公報等に記載の方法で、遺伝子組み換え型についてはＷＯ９２／００３２５号公報、特開平１－６２１９号公報あるいはＷＯ９１／０４２７６号公報等に記載の方法で製造する事ができる。

【００２８】

本発明で用いられる安定化剤は、還元性のある二糖類、蔗糖またはアミノ酸である。好ましい、本発明で用いられる安定化のための必須成分としては、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる１種あるいは２種以上が用いられる。アルギニンの塩の場合、無機酸、有機酸との塩があるがその種類としては医薬品として利用可能なものであればよい。好ましい例として塩酸塩、クエン酸塩、硫酸塩等が挙げられ、さらに塩酸塩が好ましい。安定化剤の添加量としては、特に限定されるものではないが、可溶性トロンボモジュリン１ｍｇ力価あたり０．１ｍｇ～１０００ｍｇ程度が例示される。より好ましくは可溶性トロンボモジュリン１ｍｇ力価あたり０．５ｍｇ～５００ｍｇ程度である。さらに好ましくは可溶性トロンボモジュリン１ｍｇ力価あたり０．５ｍｇ～１００ｍｇ程度である。蔗糖に関しては、凍結乾燥体とした場合、可溶性トロンボモジュリンに対する蔗糖の比率が高いと保存中に崩壊しやすいため、可溶性トロンボモジュリン１ｍｇ力価あたり０．５ｍｇ～５０ｍｇ程度にするのが好ましい。また、蔗糖を用いた場合、崩壊を抑制する目的でデキストラン等の高分子を適宜添加してもよい。

【００２９】

なお、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる安定化剤は可溶性トロンボモジュリンを含有する溶液（組成物）１ｍＬ当たり１００ｍｇ以下であることがより好ましい。これらの安定化剤はその量により安定化効果ばかりでなく賦形効果、緩衝効果、等張化効果あるいは分散効果等さまざまな効果を発揮するので、その組成物の使用目的に応じて添加量が決定される。

【００３０】

本発明で用いられる吸着防止剤は、界面活性剤であり、好ましい成分としては、非イオン性界面活性剤であり、それは医薬品として利用可能なものが好ましいが、特に限定されるものではない。エチレンオキサイドプロピレンオキサイド共重合体、ポリ（オキシアルキレン）モノ－及びトリ－ソルビタンエステル（ソルビトールの脂肪酸エステル及び様々のモル数のエチレンオキサイドと共重合したその無水物）、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等が好ましい。エチレンオキサイドプロピレンオキサイド共重合体としては、プルロニックＦ６８、ポロクサマー１８８等、ポリ（オキシアルキレン）モノ－及びトリ－ソルビタンエステルとしては、ポリソルベート８０（オレートエステル）、ポリソルベート２０（ラウレートエステル）、ポリソルベート４０（パルミテートエステル）、ポリソルベート６９（ステアレートエステル）等、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油としては、ＨＣＯ４０、ＨＣＯ６０等が挙げられる。これらの非イオン性界面活性剤から選ばれる１種あるいは２種以上を用いることができる。１種を用いる場合は、エチレンオキサイドプロピレンオキサイド共重合体、あるいはポリ（オキシアルキレン）モノ－及びトリ－ソルビタンエステルが好ましく、プルロニックＦ６８、ポリソルベート８０、あるいはポリソルベート２０が好ましく、さらにプルロニックＦ６８が好ましい。

【００３１】

吸着防止剤としての非イオン性界面活性剤の添加量は特に限定されるものではないが、可溶性トロンボモジュリン含有組成物を水溶液とした場合に、当該水溶液中において０．０００５wt%以上であることが望ましい。また、これらの物質が生体内に投与された場合に、それ自体が薬理作用を呈しない程度の低い量であることが望ましく、かかる意味で可溶性トロンボモジュリン水溶液中で１wt%以下の濃度であることが望ましい。これらの吸着防止成分は効果が濃度に依存し、また容器の材質や表面積にも影響を受けるため、組成物の臨床使用時における希釈倍率や希釈に用いる容器の材質や大きさなどによって添加量を調節することができる。好ましくは、当該水溶液中において上記濃度範囲すなわち０．０００００５～１wt%となる量であれば、本発明の目的を達成する上で適当である。さらに、生体内に投与される際は、０．０００１～０．０１wt%となる量が好ましい。

【００３２】
本発明で用いられる安定化剤および吸着防止剤の必須成分のマルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界面活性剤はそれぞれ単独で用いてもよいし、これらから選ばれる２種以上を組み合わせて用いることもできる。組み合わせの例としては、マルトースおよび非イオン性界面活性剤、ラクトースおよび非イオン性界面活性剤、蔗糖および非イオン性界面活性剤、アルギニンおよび非イオン性界面活性剤、マルトースおよびアルギニン、ラクトースおよびアルギニン、蔗糖およびアルギニン、マルトースおよびラクトース、マルトースおよび蔗糖、ラクトースおよび蔗糖、マルトース・ラクトースおよび蔗糖、マルトース・アルギニンおよび非イオン性界面活性剤、ラクトース・アルギニンおよび非イオン性界面活性剤、あるいは、蔗糖・アルギニンおよび非イオン性界面活性剤等が挙げられ、混合比率は任意である。また、上記のうち、非イオン性界面活性剤は１種あるいは２種以上を組み合わせて用いることができる。
【００３３】
このうち、マルトース、ラクトース、蔗糖あるいはアルギニンから選ばれる１種と、非イオン性界面活性剤の組み合わせが好ましく、組み合わせる非イオン性界面活性剤としては、プルロニックＦ６８、ポリソルベート８０、あるいはポリソルベート２０が好ましく、さらにプルロニックＦ６８が好ましい。すなわち、マルトースおよびプルロニックＦ６８、ラクトースおよびプルロニックＦ６８、蔗糖およびプルロニックＦ６８あるいはアルギニンおよびプルロニックＦ６８の組み合わせが好ましく、混合比率は任意である。
【００３４】
本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物は、可溶性トロンボモジュリンおよびマルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる１種あるいは２種以上の必須成分に加えて、その使用目的に応じた保存剤、防腐剤、緩衝剤、増粘剤、界面活性剤等の任意の添加剤を含有していてもよい。また、本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物は、可溶性トロンボモジュリンおよびマルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる１種あるいは２種以上の必須成分、および非イオン性界面活性剤に加えて、その使用目的に応じた安定化剤、保存剤、防腐剤、緩衝剤、増粘剤、界面活性剤等の任意の添加剤を含有していてもよい。また、本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物は、可溶性トロンボモジュリンおよび非イオン性界面活性剤に加えて、その使用目的に応じた安定化剤、保存剤、防腐剤、緩衝剤、増粘剤、界面活性剤等の任意の添加剤を含有していてもよい。医薬として用いる凍結乾燥製剤は、その製剤化の目的に応じて、医薬製造上許容できる、保存剤、安定化剤、結合剤、賦形剤、崩壊剤、湿潤剤、滑沢剤、着色剤、芳香剤、矯味剤、懸濁化剤、乳化剤、溶解補助剤、緩衝剤、等張化剤、界面活性剤、吸着防止剤、無痛化剤等を含有させることは任意である。特に、ｐＨ調節の為の緩衝剤、浸透圧調節の為の等張化剤の含有は好ましい。本発明はこれらの物質の影響を受けるものではないが、塩濃度が高いと、凍結乾燥を行う際にケーキの形成に害を及ぼすため好ましくない。
【００３５】
本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物の製造方法は、前記の方法で得られる可溶性トロンボモジュリンを含有する溶液にマルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界面活性剤から選ばれる１種あるいは２種以上を加えて溶解し、溶液を得ることにより行われる。
【００３６】
可溶性トロンボモジュリンの凍結乾燥物にマルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界面活性剤から選ばれる１種あるいは２種以上を加えて蒸留水や生理食塩水に溶解してもよい。また、適当な緩衝液に溶解してもよい。すなわち、可溶性トロンボモジュリンとマルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界面活性剤から選ばれる１種あるいは２種以上を溶解混合し溶液状態の組成物とすればよい。また、いずれの方法においてもマルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界面活性剤から選ばれる１種あるいは２種以上

はその溶液として加えてもよい。医薬品として使用する場合にはこれらの添加剤は医薬品に使える規格を満たすものが好ましい。

【００３７】

さらにこれらの溶液を通常の方法により凍結乾燥を行い、ケーキ状のあるいは粉末状に変換された組成物とすることができる。医薬品として使用する場合には、上記の溶液を無菌濾過した後、アンプル、バイアル等に投与量単位で分注することが望ましく、さらに所望により通常の方法で凍結乾燥してもよい。

【００３８】

また、医薬として使用する場合、本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物は、一般に使用されている投与方法、すなわち、非経口投与方法、例えば静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与等によって投与することが好ましい。凍結乾燥製剤とした場合は、用時、注射用水等に溶解して、患者に投与することができる。経口投与した場合には、消化管内で分解を受けるため、該投与方法は効果的ではないが、消化管内での分解を受けにくい製剤、例えばリポソームやマイクロスフェアー、ナノスフェアーに内包した形態で経口投与することも可能である。また、直腸、鼻腔内、舌下等の粘膜から吸収せしめる投与方法も可能である。

１日投与量としては、例えば特開平３－２１８３９９号公報に記載されるように０．００５～５００ｍｇ力価、好ましくは０．１～１０ｍｇ力価が例示されるが、患者の年齢、体重、症状等に応じて適宜増減することができる。

【００３９】

このようにして得られた本発明の組成物は、凍結・乾燥・保存・加熱および再溶解の過程いずれにおいても安定であり、室温において長期の保存性に優れる。今回見いだされた安定化の為の必須成分および吸着防止剤の成分はいずれも極めて高い安全性を有しており、本発明の組成物を医薬品として用いる場合に、長期間に渡り活性の低下や凝集塊等の心配がなく、極めて高い品質を維持する事ができる。また、本発明の組成物は低濃度の水溶液としたときも容器への吸着が防止され、医療現場において輸液にて希釈して投与する場合も吸着により有効量を減ずることなく投与が可能となる。以上のように、安全でかつ室温における長期の保存性に優れた血液凝固疾患に係わる疾病の予防治療薬を提供するとが可能となった。更に、臨床使用時の容器への吸着が防止された血液凝固疾患に係わる疾病の予防治療薬を提供することが可能となった。また、本発明の組成物、製法、安定化剤、安定化方法、吸着防止剤あるいは吸着防止方法は可溶性トロンボモジュリンの精製工程でも利用でき、さらに各種用途に用いるための可溶性トロンボモジュリンの原体の保存にも利用できる。

【００４０】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を説明する。

（可溶性トロンボモジュリンの取得例１）

ヒト尿中可溶性トロンボモジュリンの精製

特開平３－２１８３９９号公報の方法に準じてヒト尿中可溶性トロンボモジュリンを調製した。すなわち、原尿１００Ｌを１０％　ＮａＯＨでｐＨ８．５に調整し、析出した沈澱物を除去した。次いで、尿のｐＨを４Ｍ　ＨＣｌでｐＨ５．５に調整後、アクリロニトリル繊維で濾過し尿中のウロキナーゼを吸着除去し、通過尿を分画分子量４万の限外濾過膜を使用して脱塩濃縮した。

【００４１】

ｐＨを７．３に調整後、６０℃で１５分間処理した。０．０６８Ｍ　ＮａＣｌを含有する０．０５Ｍ　燐酸緩衝液（ｐＨ６．５）で予めコンディショニングしておいたＤＥＡＥセルロース（ワットマン社製）の３００ｍＬカラムに濃縮尿を通過させて活性画分を吸着させ、コンディショニングに使用したと同じ緩衝液７５０ｍＬで洗浄後、０．０５Ｍ　ＮａＣｌを含む酢酸緩衝液（ｐＨ４．０）で活性画分を溶出した。

【００４２】

溶出液は、分画分子量３万の限外濾過膜で濃縮し、２Ｍ　ＮａＯＨでｐＨ７．５に調整し、０．１Ｍ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ベンザミジン塩酸塩および０．５ｍＭ　$CaCl_2$を含む０．０２Ｍ　トリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．５）で予めコンディショニングしたＤＩＰ－トロンビン－アガロースの２．５ｍＬカラムを通過させて活性画分を吸着させた。

【００４３】

次いで、コンディショニングに使用したと同じ緩衝液２５ｍＬで洗浄後、１ＭＮａＣｌ、１ｍＭ　ベンザミジン塩酸塩および０．５ｍＭ　ＥＤＴＡを含む０．０２Ｍ　トリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．５）で溶出し、この溶出液をコンディショニングに使用したと同じ緩衝液に対して透析後、再度前回と同様の条件にコンディショニングしたＤＩＰ－トロンビン－アガロースクロマトグラフィーで精製した。２回目のＤＩＰ－トロンビン－アガロースクロマトグラフィーにおいても同容のカラムを用い、コンディショニングで使用したと同じ緩衝液１０ｍＬで洗浄後、１０ｍＬの０．８Ｍ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ベンザミジン塩酸塩および０．５ｍＭ　$CaCl_2$ を含む０．０２Ｍ　トリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．５）で洗浄し、１Ｍ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ベンザミジン塩酸塩および０．５ｍＭ　ＥＤＴＡを含む０．０２Ｍ　トリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．５）で活性画分を溶出した。

【００４４】

溶出液は、分画分子量３万の限外濾過膜で濃縮し、予め０．１４Ｍ　ＮａＣｌを含む０．０１Ｍ　燐酸緩衝液（ｐＨ７．０）でコンディショニングしておいたセファクリルＳ－３００（ファルマシアファインケミカル社製）の５００ｍＬカラムでゲル濾過し、活性画分を採取した（ＵＴＭ０）。また、別の実験では非還元状態下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥで分子量７２，０００±３，０００に相当する活性画分を（ＵＴＭ１）、あるいは、分子量７９，０００±３，０００に相当する活性画分を採取した（ＵＴＭ２）。これらの画分は一晩蒸留水に対して透析した後凍結乾燥した。

【００４５】

このようにして得られた天然型のヒト尿中可溶性トロンボモジュリンＵＴＭ１およびＵＴＭ２はそれぞれ以下の部分構造および性質を有する。

（１）ＵＴＭ１

イ）分子量　７２，０００±３，０００

［非還元状態でのドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ＰＡＧＥ）により測定］

ロ）等電点　３．９±０．２

ハ）末端アミノ酸配列（配列表の配列番号１のアミノ酸配列）

Ｎ末端　：

Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－
Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｈｉｓ－Ａｓｐ－
Ｃｙｓ－Ｐｈｅ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－
Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－

Ｃ末端　：

－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｒｇ、または－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ａｒｇ

ニ）糖含量（重量％）

中性糖　：５．５±１．０％

［フェノール硫酸法で測定］

アミノ糖　：２．２±１．０％

［Ｅｌｓｏｎ－Ｍｏｒｇａｎ法（Ｂｌｉｘ変法）で測定］

シアル酸　：２．８±１．５％

［Ｗａｒｒｅｎ法で測定］

【００４６】

（２）ＵＴＭ２

イ）分子量　７９，０００±３，０００

［非還元状態でのＳＤＳ－ＰＡＧＥにより測定］

ロ）等電点　３．８±０．２
ハ）末端アミノ酸配列（配列表の配列番号１のアミノ酸配列）
Ｎ末端　：
Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－
Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｈｉｓ－Ａｓｐ－
Ｃｙｓ－Ｐｈｅ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－
Ａｌａ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－
Ｃ末端　：
－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｒｇ、または－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ａｒｇ
ニ）糖含量（重量％）
中性糖　：６．２±１．０％
［フェノール硫酸法で測定］
アミノ糖　：３．１±１．０％
［Ｅｌｓｏｎ－Ｍｏｒｇａｎ法（Ｂｌｉｘ変法）で測定］
シアル酸　：３．８±１．５％
［Ｗａｒｒｅｎ法で測定］

【００４７】
（可溶性トロンボモジュリンの取得例２）
遺伝子組換え型ヒト可溶性トロンボモジュリンの製造（ＲＴＭ１）
ＷＯ９２／００３２５号公報の方法で製造した。すなわち、ヒト胎盤ｃＤＮＡライブラリーより釣り上げたＤＮＡを利用してアミノ酸４５６残基よりなる可溶性トロンボモジュリン（ｒｕＴＭ－Ａｌａ）を発現するベクターを調製し、これをＣＨＯ細胞に組み込んだ後、遺伝子増幅を行って高発現株を得た。この高発現株の培養液をＤＩＰ－トロンビン－アガロースカラムとゲル濾過により精製し目的物を得た（ＲＴＭ１）。

【００４８】
（可溶性トロンボモジュリンの取得例３）
遺伝子組換え型ヒト可溶性トロンボモジュリンの製造（ＲＴＭ２）
ＷＯ９２／００３２５号公報の方法に準じて製造した。すなわち、ヒト胎盤ｃＤＮＡライブラリーより釣り上げたＤＮＡを利用してアミノ末端のアミノ酸配列がＡｌａ－Ｐｒｏ－Ａｌａ－であるアミノ酸４９８残基よりなる可溶性トロンボモジュリンを発現するベクターを調製し、これをＣＨＯ細胞に組み込んだ後、遺伝子増幅を行って高発現株を得た。この高発現株の培養液をＤＩＰ－トロンビン－アガロースカラムとゲル濾過により精製し目的物を得た（ＲＴＭ２）。

【００４９】
本発明を詳細に説明するために実験例により効果を具体的に説明するが、本発明はこれらによって、なんら限定されるものではない。
（実験例１）
前述の可溶性トロンボモジュリンの取得例１で得られたＵＴＭ０を用いて、下記に示した凍結乾燥された注射剤を調製した。これらを５０℃の恒温槽に保存し、３ヶ月目および６ヶ月目に残存力価を、６ヶ月目に該物質の凝集体生成率を測定した。測定方法は以下の方法により行った。結果を表１および表２に示す。尚、力価残存率は４℃にて同一時間保存した該物質の力価に対する％で表した。なお、本実験で用いたＵＴＭ０はＵＴＭ１とＵＴＭ２とがそれぞれ６９％、３１％含まれていた。
製剤例１　ＵＴＭ０　７５ｍｇ力価とマルトース３００ｍｇを加え、注射用蒸留水３０ｍＬにて溶解した。この溶液を無菌ろ過後、無菌ガラスバイアルに１ｍＬずつ分注した後、凍結乾燥し、用時溶解型の注射剤を調製した。
以下同様に下記の成分を用いて製剤例２から９の製剤を調製した。

製剤例２	ＵＴＭ０	７５ｍｇ力価
	ラクトース	３００ｍｇ
製剤例３	ＵＴＭ０	７５ｍｇ力価
	蔗糖	３００ｍｇ
製剤例４	ＵＴＭ０	７５ｍｇ力価
	塩酸アルギニン	６００ｍｇ
製剤例５	ＵＴＭ０	７５ｍｇ力価
	グルコース	３００ｍｇ
製剤例６	ＵＴＭ０	７５ｍｇ力価
	マンニトール	３００ｍｇ
製剤例７	ＵＴＭ０	７５ｍｇ力価
	グリシン	６００ｍｇ
製剤例８	ＵＴＭ０	７５ｍｇ力価
	精製ゼラチン	６００ｍｇ
製剤例９	ＵＴＭ０	７５ｍｇ力価
	ヒト血清アルブミン	３００ｍｇ

【００５０】
（力価の測定方法）
トロンビン共存下でのプロテインＣ活性化能を合成基質Ｇｌｕ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ－ｐ－ＮＡ（カビ社製）を用い、持田製薬（株）で精製したヒト尿中可溶性トロンボモジュリン（ＵＴＭ０）を標準物質として使用した。
すなわち、０．０５％ポリソルベート２０／トリス塩酸緩衝液（ｐＨ８．４）で適当濃度に希釈した標準物質もしくは本発明の可溶性トロンボモジュリン含有製剤２０μＬに２０ｍＭ　$CaCl_2$／トリス塩酸緩衝液（ｐＨ８．４）６０μＬ、さらに牛トロンビン（持田製薬製）４０Ｕ／ｍＬ溶液を２０μＬ添加し、室温で２０分間反応する。次いでヒトプロテインＣ（アメリカンダイアグノスティカ社製）１２Ｕ／ｍＬ溶液を２０μＬ添加し、室温で２０分間反応後、反応液にヒトアンチトロンビンＩＩＩ（ミドリ十字製）とヘパリン（持田製薬製）の混合液（終濃度はそれぞれ０．１５Ｕ／ｍＬ、１５Ｕ／ｍＬ）８０μＬを添加し、室温で２０分間反応する。次いで、反応液を１２５μＬ採取し、前記合成基質３ｍＭ溶液１２５μＬを添加し、室温で経時的に４０５ｎｍの波長における吸光度を測定し、反応初期速度を求める。標準溶液について得られた反応初期速度から検量線を作成し、試料の力価を算出した。力価は特開平３－２１８３９９号公報の記載に従ってウサギ肺トロンボモジュリンに換算した。
【００５１】
（凝集体生成率の測定法）
可溶性トロンボモジュリンの凝集体生成率をＴＳＫ－ｇｅｌ™　Ｇ３０００SW_{XL}（東洋曹達製）を用いたゲル濾過法により測定した。
【００５２】

表　1

		添　加　剤		力価残存率（%）	
		種　類	量（mg）	3ヶ月	6ヶ月
実施例	製剤例1	マルトース	300	99.6	98.9
	製剤例2	ラクトース	300	99.8	99.3
	製剤例3	蔗糖	300	98.4	98.7
	製剤例4	塩酸アルギニン	600	99.6	99.6
比較例	製剤例5	グルコース	300	96.0	97.6
	製剤例6	マンニトール	300	91.3	89.3
	製剤例7	グリシン	600	92.9	82.2
	製剤例8	精製ゼラチン	600	89.0	95.6
	製剤例9	ＨＳＡ	300	87.7	84.8

【００５３】

表　2

		添　加　剤		凝集体生成率（%）	
		種　類	量（mg）	凍結乾燥直後	6ヶ月
実施例	製剤例1	マルトース	300	0.0	0.8
	製剤例2	ラクトース	300	——	0.0
	製剤例3	蔗糖	300	——	0.6
	製剤例4	塩酸アルギニン	600	0.0	0.0
比較例	製剤例5	グルコース	300	1.4	3.4
	製剤例6	マンニトール	300	0.0	4.0
	製剤例7	グリシン	600	——	5.7

表１および表２に示すように、マルトース、ラクトース、蔗糖および塩酸アルギニンを添加した場合、グルコース、マンニトール、グリシン、精製ゼラチン、ヒト血清アルブミン

（ＨＳＡ）等の他の一般的な添加剤を添加した場合に比較してヒト尿中可溶性トロンボモジュリンが有意に安定化された。すなわち、ヒト可溶性トロンボモジュリンの保存安定性が有意に増大した。その効果は、ラクトースおよび塩酸アルギニンでより顕著であった。

【００５４】

（実験例２）

前述の可溶性トロンボモジュリンの取得例１で得られたＵＴＭ１あるいはＵＴＭ２を用いて、下記に示した凍結乾燥された組成物を調製した。これらを４０℃湿度７５％の恒温槽に保存し、６ヶ月目に残存力価と該物質の凝集体生成率を測定した。測定方法は上記実験例１の方法により行った。結果を表３および表４に示す。尚、力価残存率は実験開始時の力価に対する％で表した。

組成物例１　ＵＴＭ２　２．５ｍｇ力価とマルトース１０ｍｇを加え、精製水１ｍＬにて溶解した。この溶液を凍結乾燥した。

以下同様に下記の成分で構成されている組成物例２から８の組成物を調製した。

組成物例２	ＵＴＭ１	２．５ｍｇ力価
	ラクトース	１０ｍｇ
組成物例３	ＵＴＭ２	２．５ｍｇ力価
	塩酸アルギニン	２０ｍｇ
組成物例４	ＵＴＭ１	２．５ｍｇ力価
	蔗糖	１０ｍｇ
組成物例５	ＵＴＭ１	２．５ｍｇ力価
	マンニトール	１０ｍｇ
組成物例６	ＵＴＭ１	２．５ｍｇ力価
	グリシン	２０ｍｇ
組成物例７	ＵＴＭ１	２．５ｍｇ力価
	精製ゼラチン	２０ｍｇ
組成物例８	ＵＴＭ１	２．５ｍｇ力価
	ＨＳＡ	１０ｍｇ

【００５５】

【表１】

表　3

	組成物例	可溶性トロンボモジュリン		添加剤		力価残存率(%)	
		種類	mg力価	種類	量(mg)	凍結乾燥直後	6ヶ月
実施例	1	UTM2	2.5	マルトース	10	100.2	99.1
	2	UTM1	2.5	ラクトース	10	—	102.3
	3	UTM2	2.5	塩酸アルギニン	20	—	100.9
	4	UTM1	2.5	蔗糖	10	—	99.6
比較例	5	UTM1	2.5	マンニトール	10	99.8	96.5
	6	UTM1	2.5	グリシン	20	—	96.2
	7	UTM1	2.5	精製ゼラチン	20	102.3	87.3
	8	UTM1	2.5	HSA	10	—	90.9

【００５６】

表　4

	組成物例	可溶性トロンボモジュリン		添加剤		凝集体生成率(%)
		種類	μg力価	種類	量(μg)	
実施例	1	UTM2	2.5	マルトース	10	0.7
	2	UTM1	2.5	ラクトース	10	0.4
	3	UTM2	2.5	塩酸アルギニン	20	0.0
	4	UTM1	2.5	蔗糖	10	0.0
比較例	5	UTM1	2.5	マンニトール	10	4.0
	6	UTM1	2.5	グリシン	20	2.9

表３および表４に示すように、マルトース、ラクトース、蔗糖および塩酸アルギニンを添加した場合、他の一般的な添加剤を添加した場合に比較してヒト尿中可溶性トロンボモジュリンが顕著に安定化された。特に長期間に渡る安定化効果が顕著であった。

【００５７】

（実験例３）
溶液安定性試験
前述の可溶性トロンボモジュリンの取得例１で得られたＵＴＭ０を用いて、マルトース、ラクトース、蔗糖あるいは塩酸アルギニンを０．５ないし５ｍｇ／ｍＬ含有する０．０５ｍｇ力価／ｍＬの可溶性トロンボモジュリン溶液を調製した。これらを室温に保存し、２４時間後に残存力価を測定した。測定方法は前記実験例１の方法により行った。いずれの組成物においても顕著な活性の低下は認められなかった。
【００５８】
可溶性トロンボモジュリンが変性して凝集体を生じ、凝集体が混在したままヒト血中に投与された場合、その凝集体は変性した蛋白質であるため、過敏症等の免疫反応を惹起する、あるいは塞栓症を誘発する危険性がある。従って、凝集体生成率が低いことは、注射用医薬製剤において重要な利点である。さらに、製剤を開発する場合、室温で長期間保存可能かどうかは、一般に４０℃、６ヶ月間保存での安定性を目安として判断するが、本発明で得られる可溶性トロンボモジュリン含有製剤は前述の実験例で示されるように、より過酷な条件である５０℃、６ヶ月間の保存でも極めて安定であった。また、溶液状態での保存性もよく、凍結乾燥型の組成物を医薬として用いる場合にも再溶解後に安心して使えることが確認された。
【００５９】
（実験例４）
前述の可溶性トロンボモジュリンの取得例１で得られたＵＴＭ０を用いて、下記に示した溶液状の組成物を調製し、力価を測定した。他に、対照としてＵＴＭ０　２．５ｍｇ力価を生理食塩液２ｍｌにて溶解した溶液を用意し、力価を測定した。これら０．２４ｍｌをシリンジを用いてプラスチック製容器に入った生理食塩液（１００ｍｌ）に混注し、可溶性トロンボモジュリンの理論終濃度を約０．００３ｍｇ力価／ｍｌとした。混注後３時間目に液を採取し、残存力価を測定した。力価測定方法は前記実験例１の方法により行った。
組成物例９　　ＵＴＭ０　２．５ｍｇ力価とポリソルベート８０　５ｍｇを加え、生理食塩液２ｍｌにて溶解した。
組成物例１０　ＵＴＭ０　２．５ｍｇ力価と精製ゼラチン　１０ｍｇを加え、生理食塩液２ｍｌにて溶解した。
【００６０】

表　5

	組成物例	添加剤		容器内保存後の残存率（%）
		種類	終濃度（%）	プラボトル
実施例	9	ポリソルベート８０	０．０００６	９６．９
比較例	10	精製ゼラチン	０．００１２	８７．５
対照例		――――	――――	７９．６

表５に示すように、ヒト尿中可溶性トロンボモジュリンはプラスチック製容器に対して著しい吸着を示した。ポリソルベート８０を添加するとゼラチン添加に比べて、顕著に吸着が防止された。

【００６１】

（実験例５）

前述の可溶性トロンボモジュリンの取得例１で得られたＵＴＭ０を用いて、下記に示した溶液状の組成物を調製し、力価を測定した。他に対照としてＵＴＭ０２．５ｍｇ力価を生理食塩液２ｍｌにて溶解した溶液を用意し、力価を測定した。これら１ｍｌを輸液セット（テルフュージョン^{R}　ＴＳ－Ａ２００ＣＫ、テルモ製）を装着した生理食塩液（大塚生食注、５００ｍｌ、プラスチック製容器）に混注し、可溶性トロンボモジュリンの理論終濃度を約０．００２５ｍｇ力価／ｍｌとした。混注直後に輸液セットを通して得られた液、また、３時間後にプラボトルから直接採取して得られた液について残存力価を測定した。力価測定方法は前記実験例１の方法により行った。

組成物例１１　ＵＴＭ０　２．５ｍｇ力価とポリソルベート８０　１ｍｇを加え、生理食塩液２ｍｌにて溶解した。

以下同様に下記の成分で構成されている組成物例２から６の組成物を調製した。

組成物例１２	**ＵＴＭ０**	**２．５ｍｇ力価**
	ポリソルベート８０	**０．５ｍｇ**
組成物例１３	**ＵＴＭ０**	**２．５ｍｇ力価**
	ポリソルベート２０	**１ｍｇ**
組成物例１４	**ＵＴＭ０**	**２．５ｍｇ力価**
	ポリソルベート２０	**０．５ｍｇ**
組成物例１５	**ＵＴＭ０**	**２．５ｍｇ力価**
	プルロニックＦ６８	**５ｍｇ**
組成物例１６	**ＵＴＭ０**	**２．５ｍｇ力価**
	プルロニックＦ６８	**１ｍｇ**

【００６２】

表　6

		添加剤		輸液セット通過後の残存率 (%)	プラボトル内保存後の残存率 (%)
		種　類	終濃度　(%)		
実施例	11	ポリソルベート80	0.0001	87.4	103.3
	12	ポリソルベート80	0.00005	86.2	87.0
	13	ポリソルベート20	0.0001	84.2	91.3
	14	ポリソルベート20	0.00005	83.6	83.4
	15	プルロニックF68	0.0005	94.8	92.2
	16	プルロニックF68	0.0001	92.7	87.5
対照例		――――	――――	63.3	79.1

表6に示すように、ポリソルベート80、ポリソルベート20、プルロニックF68を添加した場合、その濃度が0.00005wt%以上でヒト尿中可溶性トロンボモジュリン希薄水溶液の輸液セット並びにプラスチック製容器中での活性が維持されることが判明した。

【0063】

（実験例6）

前述の可溶性トロンボモジュリンの取得例1で得られたUTM0を用いて、下記に示した凍結乾燥された注射剤を調製した。これらを50℃の恒温槽に保存し、3カ月および6カ月目に力価残存率を測定した。測定方法は上記実験例1の方法により行った。結果を表7に示す。尚、力価残存率は凍結乾燥直後の力価に対する%で表した。

製剤例10　UTM0　150mg力価、塩酸アルギニン1200mgおよびプルロニックF68　60mgを加え、注射用蒸留水60mLにて溶解した。この溶液を無菌ろ過後、無菌ガラスバイアルに2mLずつ分注した後、凍結乾燥し、用時溶解型の注射剤を調製した。

以下同様に下記の成分を用いて製剤11から13の製剤を調製した。

製剤例１１　ＵＴＭ０　１５０ｍｇ力価
塩酸アルギニン　１２００ｍｇ
ポリソルベート８０　６０ｍｇ
精製ゼラチン　３００ｍｇ
製剤例１２　ＵＴＭ０　１５０ｍｇ力価
マルトース　６００ｍｇ
プルロニックＦ６８　６０ｍｇ
製剤例１３　ＵＴＭ０　１５０ｍｇ力価
マルトース　６００ｍｇ
プルロニックＦ６８　６０ｍｇ
精製ゼラチン　３００ｍｇ

【００６４】

表　７

	添加剤		力価残存率（%）	
	種類	量（mg）	3カ月	6カ月
製剤例１０	塩酸アルギニン プルロニックＦ６８	１２００ ６０	１００．４	１０１．０
製剤例１１	塩酸アルギニン ポリソルベート８０ 精製ゼラチン	１２００ ６０ ３００	９９．３	１００．２
製剤例１２	マルトース プルロニックＦ６８	６００ ６０	１００．４	１００．１
製剤例１３	マルトース プルロニックＦ６８ 精製ゼラチン	６００ ６０ ３００	９９．２	９９．７

表７に示すように、アルギニンあるいはマルトースと非イオン性界面活性剤を組み合わせて添加した場合、ヒト尿中可溶性トロンボモジュリンの長期間に渡る保存安定性が有意に増大した。従って、長期保存時でも安定性に優れ、低濃度に希釈したときも容器への吸着が起こらない可溶性トロンボモジュリン含有組成物が得られることが確認できた。

【００６５】
（製剤実施例）
次に実施例によって本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によってなんら限定されるものではない。
（実施例１）
ＵＴＭ０　１０ｍｇ力価
ラクトース　１００ｍｇ
精製ゼラチン　１００ｍｇ
上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。
【００６６】
（実施例２）
ＵＴＭ０　２５ｍｇ力価
ラクトース　１００ｍｇ
プルロニックＦ６８　１０ｍｇ
リン酸水素二ナトリウム・１２水和物　０．７７ｍｇ
リン酸二水素ナトリウム・２水和物　０．１８ｍｇ
塩化ナトリウム　２．７３ｍｇ
上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。
【００６７】
（実施例３）
ＵＴＭ０　２５ｍｇ力価
Ｌ－アルギニン塩酸塩　２００ｍｇ
ポリソルベート８０　１０ｍｇ
リン酸水素二ナトリウム・１２水和物　０．７７ｍｇ
リン酸二水素ナトリウム・２水和物　０．１８ｍｇ
塩化ナトリウム　２．７３ｍｇ
上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。
【００６８】
（実施例４）
ＵＴＭ０　２５ｍｇ力価
Ｌ－アルギニン塩酸塩　２００ｍｇ
プルロニックＦ６８　１０ｍｇ
上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。
【００６９】
（実施例５）
ＵＴＭ０　５０ｍｇ力価
マルトース　１００ｍｇ
精製ゼラチン　１００ｍｇ
リン酸水素二ナトリウム・１２水和物　２３．２ｍｇ
リン酸二水素ナトリウム・２水和物　５．５ｍｇ
塩化ナトリウム　８１．８ｍｇ
上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無

菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【００７０】

（実施例６）

実施例５と同成分の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。別に、０．１％ポリソルベート８０水溶液を無菌的に調製し、１．０ｍｌずつ分注して熔閉し、溶解用溶液アンプルとした。

【００７１】

（実施例７）

ＵＴＭ０	２５ｍｇ力価
蔗糖	１００ｍｇ
精製ゼラチン	１００ｍｇ

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【００７２】

（実施例８）

実施例７と同成分の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。別に、０．１％ポリソルベート８０水溶液を無菌的に調製し、１．０ｍｌずつ分注して熔閉し、溶解用溶液アンプルとした。

【００７３】

（実施例９）

ＵＴＭ１	２５ｍｇ力価
ラクトース	８００ｍｇ
精製ゼラチン	１００ｍｇ
リン酸水素二ナトリウム・１２水和物	２３．２ｍｇ
リン酸二水素ナトリウム・２水和物	５．５ｍｇ

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【００７４】

（実施例１０）

ＵＴＭ２	５０ｍｇ力価
Ｌ－アルギニン塩酸塩	２００ｍｇ
精製ゼラチン	１００ｍｇ

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【００７５】

（実施例１１）

ＵＴＭ１	１０ｍｇ力価
蔗糖	１００ｍｇ
ポリソルベート８０	５０ｍｇ
リン酸水素二ナトリウム・１２水和物	２３．２ｍｇ
リン酸二水素ナトリウム・２水和物	５．５ｍｇ

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【００７６】

（実施例１２）

ＵＴＭ２　５０ｍｇ力価
Ｌ－アルギニン塩酸塩　２００ｍｇ
精製ゼラチン　１００ｍｇ
ポリソルベート８０　１０ｍｇ
上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【００７７】
（実施例１３）
ＲＴＭ１　２５ｍｇ力価
ラクトース　２００ｍｇ
ポリソルベート８０　１０ｍｇ
リン酸水素二ナトリウム・１２水和物　０．７７ｍｇ
リン酸二水素ナトリウム・２水和物　０．１８ｍｇ
塩化ナトリウム　８１．８ｍｇ
上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【００７８】
（実施例１４）
ＲＴＭ１　２５ｍｇ力価
ラクトース　２００ｍｇ
プルロニックＦ６８　１０ｍｇ
リン酸水素二ナトリウム・１２水和物　０．７７ｍｇ
リン酸二水素ナトリウム・２水和物　０．１８ｍｇ
塩化ナトリウム　８１．８ｍｇ
上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【００７９】
（実施例１５）
ＲＴＭ２　２５ｍｇ力価
ラクトース　１００ｍｇ
精製ゼラチン　１００ｍｇ
上記成分を注射用蒸留水に溶解した全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【００８０】
（実施例１６）
実施例１５と同成分の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。別に、０．１％ポリソルベート８０水溶液を無菌的に調製し、１．０ｍｌずつ分注して熔閉し、溶解用溶液アンプルとした。

【００８１】
（実施例１７）
ＲＴＭ２　１０ｍｇ力価
マルトース　１００ｍｇ
精製ゼラチン　１００ｍｇ
リン酸水素二ナトリウム・１２水和物　０．７７ｍｇ
リン酸二水素ナトリウム・２水和物　０．１８ｍｇ
塩化ナトリウム　８１．８ｍｇ

上記成分を注射用蒸留水に溶解した全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【００８２】

（実施例１８）

ＲＴＭ２	１０ｍｇ力価
マルトース	１００ｍｇ
精製ゼラチン	１００ｍｇ
プルロニックＦ６８	１０ｍｇ
リン酸水素二ナトリウム・１２水和物	０．７７ｍｇ
リン酸二水素ナトリウム・２水和物	０．１８ｍｇ
塩化ナトリウム	８１．８ｍｇ

上記成分を注射用蒸留水に溶解した全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【００８３】

（実施例１９）

ＵＴＭ０	２５ｍｇ力価
Ｌ－アルギニン塩酸塩	１００ｍｇ
ラクトース	１００ｍｇ
ポリソルベート８０	１０ｍｇ
リン酸水素二ナトリウム・１２水和物	０．７７ｍｇ
リン酸二水素ナトリウム・２水和物	０．１８ｍｇ
塩化ナトリウム	２．７３ｍｇ

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【００８４】

（実施例２０）

ＵＴＭ０	２５ｍｇ力価
Ｌ－アルギニン塩酸塩	１００ｍｇ
マルトース	１００ｍｇ
プルロニックＦ６８	１０ｍｇ

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【００８５】

（実施例２１）

ＵＴＭ１	１０ｍｇ力価
ラクトース	１００ｍｇ
蔗糖	１００ｍｇ
ポリソルベート８０	５０ｍｇ
リン酸水素二ナトリウム・１２水和物	２３．２ｍｇ
リン酸二水素ナトリウム・２水和物	５．５ｍｇ

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を１０ｍＬとし、無菌濾過した後１．０ｍＬずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【００８６】

【発明の効果】

本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物は、凍結・乾燥・保存・加熱および再溶解

の過程いずれにおいても安定であり、特に、凍結乾燥した本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物については室温において長期間に渡る保存性に優れる。今回見いだされた安定化のための必須成分および吸着防止剤はいずれも極めて高い安全性を有しており、本発明の組成物を医薬品として用いる場合に、長期間に渡り活性の低下や凝集物の出現等の心配がなく、極めて高い品質を維持する事ができる。とくに凍結乾燥製剤は、５０℃で６ヶ月の保存でも十分に安定である。また、本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物は低濃度の水溶液としたときも容器への吸着が防止され、医療現場において輸液にて希釈して投与する場合も吸着により有効量を減ずることなく投与が可能となる。従って、安全でかつ室温における長期の保存性に優れた、血液凝固疾患に係わる疾病の予防治療薬を提供することが可能である。更に、臨床使用時の容器への吸着が防止された、血液凝固疾患に係わる疾病の予防治療薬を提供することが可能である。また、本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物、その製法、可溶性トロンボモジュリンの安定化剤、安定化方法、吸着防止剤あるいは吸着防止方法は可溶性トロンボモジュリンの精製工程でも利用でき、さらに各種用途に用いるための可溶性トロンボモジュリンの原体の保存にも利用できる。

【００８７】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

⟨110⟩ Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.

⟨120⟩ Composition Containing Soluble Thrombomodulins

⟨130⟩ MD0397JP01

⟨141⟩ 1999-06-01

⟨160⟩ 1

⟨210⟩ 1

⟨211⟩ 28

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ human

⟨400⟩ 1

Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly
1 5

Gly Ser Gln Cys Val Glu His Asp
10 15

Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro
20

Ala Thr Phe Leu
25

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
Ｃ０７Ｋ 14/435 (2006.01) Ｃ０７Ｋ 14/435 ＺＮＡ

(72)発明者 畠 誠七
東京都新宿区四谷一丁目７番地 持田
製薬株式会社内
(72)発明者 鈴木 茂治
東京都新宿区四谷一丁目７番地 持田
製薬株式会社内
(72)発明者 工藤 弓夫
東京都新宿区四谷一丁目７番地 持田
製薬株式会社内

審査官 ▲高▼岡 裕美

(56)参考文献 特開平０３－２１８３９９（ＪＰ，Ａ）
特開平０５－１７０６６４（ＪＰ，Ａ）
特開平０８－５０４７８４（ＪＰ，Ａ）
特開昭６１－１３７８２８（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K 38/00-58
A61K 9/00-72
A61K 47/00-48