

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4460762号
(P4460762)

(45) 発行日 平成22年5月12日(2010.5.12)

(24) 登録日 平成22年2月19日(2010.2.19)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 38/55 (2006.01)

A 6 1 K 37/64

A 6 1 K 9/08 (2006.01)

A 6 1 K 9/08

A 6 1 K 47/06 (2006.01)

A 6 1 K 47/06

C 0 7 K 14/81 (2006.01)

C 0 7 K 14/81

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 19 (全 54 頁)

(21) 出願番号 特願2000-515626 (P2000-515626)

(86) (22) 出願日 平成10年10月13日(1998.10.13)

(86) 国際出願番号 PCT/JP1998/004609

(87) 国際公開番号 W01999/018994

(87) 国際公開日 平成11年4月22日(1999.4.22)

審査請求日 平成17年5月19日(2005.5.19)

(31) 優先権主張番号 特願平9-281659

(32) 優先日 平成9年10月15日(1997.10.15)

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

(31) 優先権主張番号 特願平9-308523

(32) 優先日 平成9年11月11日(1997.11.11)

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 303046299

旭化成ファーマ株式会社

東京都千代田区神田神保町一丁目105番地

(74) 代理人 110000109

特許業務法人特許事務所サイクス

(72) 発明者 油井 雅樹

静岡県田方郡函南町大土肥5番地 フォン
ティーマ小高309

(72) 発明者 横沢 彰

静岡県富士市鈴川西町3-8-306

(72) 発明者 村田 智代

静岡県田方郡大仁町吉田774-1

(72) 発明者 鶴田 一壽

静岡県富士市大淵345-96

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トロンボモジュリン水溶液注射剤の貯蔵・流通時の品質保持方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

凍結又は凍結乾燥されていない液状のトロンボモジュリン水溶液注射剤の貯蔵・流通時における品質保持方法であって、有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH5以上、7.0以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分とを含有せしめたトロンボモジュリン水溶液のpHが5以上7.0以下であり、(a)該トロンボモジュリン水溶液は、さらに、非イオン性界面活性剤を含有し、容器に無菌充填されていること、又は、(b)該トロンボモジュリン水溶液が、空隙部割合が15%以下であるようにシリンジ容器に無菌充填されているプレフィルドシリンジ製剤であること、のいずれかを特徴とするトロンボモジュリン水溶液注射剤を液状で長期に貯蔵・流通せしめることからなる方法。

【請求項2】

有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH5以上、7.0以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分と、非イオン性界面活性剤とを含有し、pHがpH5以上7.0以下であるトロンボモジュリン水溶液が、容器に無菌充填されていることを特徴とするトロンボモジュリン水溶液注射剤を液状で長期に貯蔵・流通せしめることからなる請求項1に記載の方法。

【請求項3】

有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH5以上、7.0以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分とを含有し、pHがpH5以上7.0以下であるトロンボモジュリン水溶液が、空隙部割合が15%以下であるようにシリンジ容器に無菌充填されているプレフ

ィルドシリンジ製剤であることを特徴とするトロンボモジュリン水溶液注射剤を液状で長期に貯蔵・流通せしめることからなる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

凍結又は凍結乾燥されていない液状のトロンボモジュリン水溶液注射剤の貯蔵・流通時における品質保持方法であって、有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH 5 以上、7.0 以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分と、非イオン性界面活性剤とを含有し、pH が pH 5 以上 7.0 以下であるトロンボモジュリン水溶液が、空隙部割合が 15 % 以下であるようにシリンジ容器に無菌充填されているプレフィルドシリンジ製剤であることを特徴とするトロンボモジュリン水溶液注射剤を液状で長期に貯蔵・流通せしめることからなる方法。

10

【請求項 5】

可溶性トロンボモジュリンが、分子量（非還元状態での SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による測定）が 6.6 万 ± 1 万であり、トロンピンによるプロテイン C の活性化を促進する作用を有し、且つ注射用蒸留水に少なくとも 6 mg / ml の濃度として溶解可能な可溶性であるペプチドであることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

可溶性トロンボモジュリンが、
(i) 配列番号 1 の 19 - 516 のアミノ酸配列からなる可溶性トロンボモジュリン、又は
(i i) 上記アミノ酸配列の 1 個又は複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加されたアミノ酸配列からなり、且つトロンピンによるプロテイン C の活性化を促進する作用を有する可溶性トロンボモジュリンのいずれかである請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 7】

可溶性トロンボモジュリンが、配列番号 1 の 19 - 516 のアミノ酸配列からなる可溶性トロンボモジュリン、配列番号 2 の 19 - 516 のアミノ酸配列からなる可溶性トロンボモジュリン、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA を宿主細胞にトランスフェクトして得られる可溶性トロンボモジュリン、又は、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA を宿主細胞にトランスフェクトして得られる可溶性トロンボモジュリンのいずれかの可溶性トロンボモジュリンである請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 8】

緩衝液成分がリン酸塩緩衝液成分、又は酢酸塩緩衝液成分の少なくとも 1 つであることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

トロンボモジュリン水溶液の pH が、5.5 ~ 6.5 であることを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

プレフィルドシリンジ製剤におけるシリンジ容器の内径が、8.6 mm 以下であることを特徴とする請求項 1、又は請求項 3 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 11】

有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH 5 以上、7.0 以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分と、非イオン性界面活性剤とを含有し、pH が pH 5 以上 7.0 以下であるトロンボモジュリン水溶液が、容器に無菌充填されていることを特徴とする長期安定性および振盪安定性において優れ、液状で長期貯蔵・流通せしめるための凍結又は凍結乾燥されていないトロンボモジュリン水溶液注射剤。

【請求項 12】

有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH 5 以上、7.0 以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分とを含有し、pH が pH 5 以上 7.0 以下であるトロンボモジュリン水溶液が、空隙部割合が 15 % 以下であるようにシリンジ容器に無菌充填されているプレフ

50

ィルドシリンジ製剤であることを特徴とする長期安定性および振盪安定性において優れ、液状で長期貯蔵・流通せしめるための凍結又は凍結乾燥されていないトロンボモジュリン水溶液注射剤。

【請求項 1 3】

有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH 5 以上、7.0 以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分と、非イオン性界面活性剤とを含有し、pH が pH 5 以上 7.0 以下であるトロンボモジュリン水溶液が、空隙部割合が 15 % 以下であるようにシリンジ容器に無菌充填されているプレフィルドシリンジ製剤であることを特徴とする長期安定性および振盪安定性において優れ、液状で長期貯蔵・流通せしめるための凍結又は凍結乾燥されていないトロンボモジュリン水溶液注射剤。

10

【請求項 1 4】

該プレフィルドシリンジ製剤が、皮下注用、又は筋肉注射用製剤である請求項 1 2 ~ 1 3 のいずれかに記載のトロンボモジュリン水溶液注射剤。

【請求項 1 5】

可溶性トロンボモジュリンが、配列番号 1 の 1 9 - 5 1 6 のアミノ酸配列からなる可溶性トロンボモジュリン、配列番号 2 の 1 9 - 5 1 6 のアミノ酸配列からなる可溶性トロンボモジュリン、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA を宿主細胞にトランスフェクトして得られる可溶性トロンボモジュリン、又は、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA を宿主細胞にトランスフェクトして得られる可溶性トロンボモジュリンのいずれかの可溶性トロンボモジュリンである請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれかに記載のトロンボモジュリン水溶液注射剤。

20

【請求項 1 6】

トロンボモジュリン水溶液の pH が、5.5 ~ 6.5 であることを特徴とする請求項 1 1 ~ 1 5 のいずれかに記載のトロンボモジュリン水溶液注射剤。

【請求項 1 7】

シリンジ容器に無菌充填されているプレフィルドシリンジ製剤が、シリンジ容器でのトロンボモジュリン水溶液の存在量が、空隙部割合として 10 % 以下であることを特徴とする請求項 1 2 ~ 1 6 のいずれかに記載のトロンボモジュリン水溶液注射剤。

【請求項 1 8】

プレフィルドシリンジ製剤におけるシリンジ容器の内径が、8.6 mm 以下であることを特徴とする請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれかに記載のトロンボモジュリン水溶液注射剤。

30

【請求項 1 9】

該水溶液が無菌充填されたプレフィルドシリンジが、フィルム又は箱に包まれていることを特徴とする請求項 1 2 ~ 1 8 のいずれかに記載の注射剤。

【発明の詳細な説明】

産業上の利用分野

本発明は、凍結又は凍結乾燥されていない液状のトロンボモジュリン水溶液注射剤の貯蔵・流通時における品質保持方法、又は貯蔵・流通において安定なトロンボモジュリン水溶液注射剤に関する。

従来の技術

40

トロンボモジュリン（以下、TM と略記することがある）は、トロンビンと特異的に結合し、トロンビンによるプロテイン C の活性化を著しく促進する作用を有する物質である。プロテイン C は、血液凝固線溶系において重要な役割を演じているビタミン K 依存性のたん白質であり、トロンビンの作用により活性化され、活性型プロテイン C となる。この活性型プロテイン C は、生体内で血液凝固系因子の活性型第 V 因子、および活性型第 V I I 因子を失活させ、また血栓溶解作用を有するプラスミノーゲンアクチベーターの産生に参与していることが知られている〔鈴木宏治、医学のあゆみ、第 1 2 5 巻、9 0 1 頁（1 9 8 3 年）〕。

したがって、トロンボモジュリンは、このトロンビンによるプロテイン C の活性化を促進して抗血液凝固作用と血栓溶解作用を示す活性型プロテイン C を大量に生産せしめるもの

50

であり、抗血液凝固剤又は血栓溶解剤として有用であるとされている。また、従来トロンボモジュリンの用途としては、例えば、急性冠動脈症候群（ACS；acute coronary syndrome）（例えば、心筋梗塞、不安定狭心症、冠動脈血行再建術など）、血栓症（例えば、急性期又は慢性期の脳血栓症、動脈又は静脈の急性又は慢性の末梢血栓症等）、塞栓症（例えば、急性期又は慢性期の脳塞栓症、動脈又は静脈の急性又は慢性の末梢塞栓症等）、末梢血管閉塞症（例えば、バージャー病、レイノー病等）、閉塞性動脈硬化症、血管炎（例えば、全身性エリテマトーデス（SLE）、ベーチェット病、川崎病等）、心臓手術に続発する機能性障害、移植臓器の合併症、血管内血液凝固症候群（DIC）、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症、糖尿病、肝VOD（Liver veno-occlusive disease；劇症肝炎や骨髄移植後の肝静脈閉塞症）、深部静脈血栓症（DVT；Deep venous thrombosis）等の疾患の治療及び予防に用いられることが期待されている。

10

従来、トロンボモジュリンは、ヒトを始めとする種々の動物種の血管内皮細胞上に発現している糖蛋白質として発見取得されたが、発明者らのグループにより、始めてクローニングに成功した。即ち、遺伝子工学的手法を用いてヒト肺cDNAライブラリーから、シグナルペプチドを含むヒトトロンボモジュリン前駆体の遺伝子をクローニングし、そしてトロンボモジュリンの全遺伝子配列を解析し、18アミノ酸残基のシグナルペプチドを含む575残基のアミノ酸配列が明らかにされている（特開昭64-6219号公報）。シグナルペプチドが切断されたマチュアなトロンボモジュリンは、そのマチュアなペプチドのN末端側よりN末端領域（1-226番目）、6つのEGF様構造をもつ領域（227-462番目）、O型糖鎖付加領域（463-498番目）、膜貫通領域（499-521）、そして細胞質内領域（522-557番目）の5つの領域から構成されており、そして全長のトロンボモジュリンと同じ活性を有する部分（即ち、最小活性単位）は、6つのEGF様構造をもつ領域のうちN末端側から4、5、6番目のEGF様構造からなる部分であることが知られている〔M. Zushira, J. Biol. Chem., 246, 10351-10353（1989）〕。

20

少なくとも、膜貫通領域を含有しないように調製されたトロンボモジュリンにおいては、界面活性剤の非存在下でも綺麗に溶解することができる性質（以下、可溶性ということがある）を有し、例えば、N末端領域と6つのEGF様構造をもつ領域とO型糖鎖付加領域の3つの領域のみからなる（即ち、配列番号1の19～516位のアミノ酸配列からなる）トロンボモジュリンは、組換え技術の応用により取得できること、そしてその組換え体トロンボモジュリンは、天然のトロンボモジュリンの活性を有していることが確認されている（特開昭64-6219号公報）。

30

因みに、遺伝子においては、自然の変異または取得時の変異により、多くのケースで認められる通り、ヒトにおいても多形性の変異が見つけられており、上述の575残基のアミノ酸配列からなるヒトトロンボモジュリン前駆体の第473位のアミノ酸においてValであるものと、Alaであるものが現在確認されている。このアミノ酸をコードする塩基配列においては、第1418位において、それぞれTとCとの変異に相当する〔Wenら、Biochemistry 26, 4350-4357（1987）〕。しかし、活性及び物性においては、全く相違なく、両者は実質的に同一と考えることができる。したがって、上述の配列番号1のアミノ酸配列からなるトロンボモジュリンは、配列番号2のアミノ酸配列からなるトロンボモジュリンの多形性のペプチドであり、実質的に同一と判断できる。

40

ところで、このトロンボモジュリンは、医薬組成物として広く安定的に供給する場合には、凍結乾燥製剤として供給することが行われている。この凍結乾燥の過程で、トロンボモジュリン含有溶液を凍結乾燥すると、微量ではあるが一部が変性によって高分子化し、トロンボモジュリン分子がいくつか会合した多量体が生成することが明らかとなった。この課題を解決するために、本発明者らは、鋭意検討した結果、アミノ酸またはその塩類を添加することにより、凍結乾燥時のトロンボモジュリンの変性が防止されることを確認し、先に出願した（特開平6-321805号公報）。

50

発明が解決しようとする課題

しかしながら、簡便に用いることができ、また製造費用の安価な、凍結乾燥製剤以外の、新たな製剤を提供することが求められている。

課題を解決するための手段

本発明者らは、凍結乾燥製剤以外の新たな製剤を開発する目的で、凍結乾燥工程を行わずに、用時溶解する必要のないトロンボモジュリンの水溶液注射用製剤の開発を検討した。トロンボモジュリンの水溶液注射用製剤に必要とされる品質としては、先ず第一に、5から室温での長期保存において残存力価が大きく下がらないこと（長期安定性）が必要であるが、調べてみると、必ずしもこの長期安定性を得ることは容易ではなかった。またさらに意外なことに、水溶液注射用製剤を振盪したときに、白濁を生ずることがあることが確認された。輸送等の流通の過程において、程度の差はあっても、製剤が振盪されることは十分に予想され、粉体である従来の凍結乾燥製剤においては全く問題となることはなく、全く予想もされなかった振盪安定性に関する課題が、本発明者らにより新たに確認された。注射剤において、不溶物が存在することは、特に循環器疾患を有する患者にとって致命的な問題を引き起こす可能性があり、振盪により白濁して不溶物が生ずる振盪安定性に関する問題は極めて大きな障害である。

以上まとめると、水溶液注射剤は、凍結乾燥製剤に比べると使用時における注射用蒸留水への溶解の必要もなく簡便に投与でき、また製造工程で凍結乾燥操作を必要とせず製造上簡便且つ経済的であるなどの利点があるが、上述の通り、単純にトロンボモジュリンを溶液にするだけでは、長期安定性に劣り、振盪安定性についても満足のいくものは得られず、長期に貯蔵・流通せしめることのできる水溶液注射剤を作成することは困難であった。本発明者らは、前記の問題を解決するために鋭意研究を行った結果、特定の条件によりこれらの問題点をことごとく解決できることを確認して、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、凍結又は凍結乾燥されていない液状のトロンボモジュリン水溶液注射剤の貯蔵・流通時における品質保持方法であって、有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH 5以上、7.0以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分とを含有せしめたトロンボモジュリン水溶液のpHが5以上7.0以下であり、(a)該トロンボモジュリン水溶液は、さらに、界面活性剤を含有し、容器に無菌充填されていること、又は、(b)該トロンボモジュリン水溶液が実質的な空隙部を存在せしめないようにシリンジ容器に無菌充填されているプレフィルドシリンジ製剤であること、のいずれかを特徴とするトロンボモジュリン水溶液注射剤を液状で長期に貯蔵・流通せしめることからなる方法である。

したがって、本発明の貯蔵・流通時における品質保持方法の第一の態様は、有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH 5以上、7.0以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分と、界面活性剤とを含有し、pHがpH 5以上7.0以下であるトロンボモジュリン水溶液が、容器に無菌充填されていることを特徴とするトロンボモジュリン水溶液注射剤を液状で長期に貯蔵・流通せしめることからなる上記に記載の方法である。

また、本発明の第二の態様は、有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH 5以上、7.0以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分とを含有し、pHがpH 5以上7.0以下であるトロンボモジュリン水溶液が、実質的な空隙部を存在せしめないようにシリンジ容器に無菌充填されているプレフィルドシリンジ製剤であることを特徴とするトロンボモジュリン水溶液注射剤を液状で長期に貯蔵・流通せしめることからなる上記に記載の方法である。

また、好ましい本発明の第三の態様は、有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH 5以上、7.0以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分と、界面活性剤とを含有し、pHがpH 5以上7.0以下であるトロンボモジュリン水溶液が、実質的な空隙部を存在せしめないようにシリンジ容器に無菌充填されているプレフィルドシリンジ製剤であることを特徴とするトロンボモジュリン水溶液注射剤を液状で長期に貯蔵・流通せしめることからなる上記記載の方法である。

また、本発明の方法は、有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH 5以上、7.0以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分とを含有せしめたトロンボモジュリン水溶液のp

10

20

30

40

50

Hが5以上7.0以下であり、(a)該トロンボモジュリン水溶液は、さらに、界面活性剤を含有し、容器に無菌充填されていること、又は、(b)該トロンボモジュリン水溶液が実質的な空隙部を存在せしめないようにシリンジ容器に無菌充填されているプレフィルドシリンジ製剤であること、のいずれかを特徴とする凍結又は凍結乾燥されていない液状のトロンボモジュリン水溶液の長期および振盪における安定化方法である。

本発明の方法に用いられるトロンボモジュリン水溶液注射剤は、有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH5以上、7.0以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分とを含有せしめたトロンボモジュリン水溶液のpHが5以上、7.0以下であり、(a)該トロンボモジュリン水溶液は、さらに、界面活性剤を含有し、容器に無菌充填されていること、又は、(b)該トロンボモジュリン水溶液が実質的な空隙部を存在せしめないようにシリンジ容器に無菌充填されているプレフィルドシリンジ製剤であること、のいずれかを特徴とする長期安定性および振盪安定性において優れ、液状で長期貯蔵・流通せしめるための凍結又は凍結乾燥されていないトロンボモジュリン水溶液注射剤である。

即ち、トロンボモジュリン水溶液注射剤の第1の態様としては、有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH5以上、7.0以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分と、界面活性剤とを含有し、pHがpH5以上、7.0以下であるトロンボモジュリン水溶液が、容器に無菌充填されていることを特徴とする長期安定性および振盪安定性において優れ、液状で長期貯蔵・流通せしめるための凍結又は凍結乾燥されていないトロンボモジュリン水溶液注射剤である。

また、トロンボモジュリン水溶液注射剤の第2の態様としては、有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH5以上、7.0以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分とを含有し、pHがpH5以上、7.0以下であるトロンボモジュリン水溶液が、実質的な空隙部を存在せしめないようにシリンジ容器に無菌充填されているプレフィルドシリンジ製剤であることを特徴とする長期安定性および振盪安定性において優れ、液状で長期貯蔵・流通せしめるための凍結又は凍結乾燥されていないトロンボモジュリン水溶液注射剤である。

また、トロンボモジュリン水溶液注射剤の第3の態様としては、有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH5以上、7.0以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分と、界面活性剤とを含有し、pHがpH5以上、7.0以下であるトロンボモジュリン水溶液が、実質的な空隙部を存在せしめないようにシリンジ容器に無菌充填されているプレフィルドシリンジ製剤であることを特徴とする長期安定性および振盪安定性において優れ、液状で長期貯蔵・流通せしめるための凍結又は凍結乾燥されていないトロンボモジュリン水溶液注射剤である。

本発明でトロンボモジュリンとは、トロンピンに結合し、トロンピンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有する物質であれば特に限定されない。可溶性トロンボモジュリンとは、上記のトロンボモジュリンとしての活性を有し、界面活性剤の非存在下でも容易に溶解し得る物質であり、例えば、注射用蒸留水に対して、少なくとも1mg/ml以上、好ましくは3mg/ml以上、特に好ましくは6mg/ml以上の溶解性が得られるものが好ましい。また、可溶性トロンボモジュリンとしては、例えば、分子量(非還元状態でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による測定)が6.6万±1万であり、トロンピンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有し、且つ注射用蒸留水に少なくとも6mg/mlの濃度として溶解可能な可溶性であるペプチドが好ましい例として挙げられる。他の可溶性トロンボモジュリンとしては、配列番号1の19-29のアミノ酸配列を含有するアミノ酸配列からなり、トロンピンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有し、且つ可溶性であるペプチドである可溶性トロンボモジュリンが例示される。またさらに他の可溶性トロンボモジュリンとしては、(i)配列番号1の19-516のアミノ酸配列からなる可溶性トロンボモジュリン、又は(ii)上記アミノ酸配列の1個又は複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加されたアミノ酸配列からなり、且つトロンピンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有する可溶性トロンボモジュリンのいずれかも好ましい例として示される。

さらに、トロンボモジュリンとしては、通常、トロンボモジュリンの最小活性単位とされ

る、6つのEGF様構造を持つ領域のうちのN末端側から4、5、6番目の構造（例えば、ヒト型のトロンプモジュリンとしては、配列番号1および配列番号2の367-480位）を少なくとも有するアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。このなかで特に好ましい可溶性トロンプモジュリンとしては、配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列をコードするDNAをベクターにより宿主細胞にトランスフェクトして調製される形質転換細胞が産生し得るペプチドが挙げられる。この形質転換細胞が産生し得るペプチド（可溶性トロンプモジュリン）としては、配列番号1および配列番号2の19-516位のアミノ酸配列からなるペプチドが好ましい例として挙げられる。その他に宿主細胞によっては、シグナル部分がそのままや、前記配列番号1および配列番号2の17-516位のアミノ酸配列からなるペプチド、又はそれらの混合物であってもよい。勿論これらのペプチドは極めて溶解性が高いもので、前述の溶解性を十分に有するものである。さらに、これらのペプチドは、前記のアミノ酸配列を有すればよいのであって、糖鎖が付いていても、又付いていなくともよく、特に限定されるものではない。また、ヒト尿等から取得できる可溶性ペプチドも利用することができる。宿主細胞の種類により、糖鎖の種類や、付加位置や付加の程度は相違するものであり、いずれも用いることができる。配列番号1および配列番号2の367-480位からなるペプチド自体は、振盪安定性が高く、その点ではいずれにしても好ましい水溶液製剤となるが、上記の分子量（非還元状態で6.6万±1万）の可溶性トロンプモジュリン、例えば、前述の配列番号1の19-516のアミノ酸配列からなる可溶性トロンプモジュリン、配列番号2の19-516のアミノ酸配列からなる可溶性トロンプモジュリン、配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするDNAを宿主細胞にトランスフェクトして得られる可溶性トロンプモジュリン、又は、配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードするDNAを宿主細胞にトランスフェクトして得られる可溶性トロンプモジュリンのいずれかの可溶性トロンプモジュリンにおいては、本発明の構成により振盪安定性を高める必要があると理解される。

宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、COS-1細胞、COS-7細胞、VERO（ATCC CCL-81）細胞、BHK細胞、イヌ腎由来MDCK細胞、ハムスターAV-12-664細胞等が、またヒト由来細胞としてHeLa細胞、WI38細胞、ヒト293細胞等が挙げられる。CHO細胞においては、DHFR⁺ CHO細胞がさらに好ましい。

また、遺伝子操作の過程において、大腸菌等の微生物も多く使われ、それぞれに適した宿主-ベクター系を使用することが好ましく、上述の宿主細胞においても、適宜のベクター系を選択することができる。

遺伝子組換え技術に用いるトロンプモジュリンの遺伝子は、クローニングされており、そしてトロンプモジュリンの遺伝子組換え技術を用いた製造例が開示されており、さらにはその精製品を得るための精製方法も知られている（特開昭64-6219号公報、特開平2-255699号公報、特開平5-213998号公報、特開平5-310787号公報、特開平7-155176号公報、J. Biol. Chem., 264, 10351-10353, 1989）。したがって本発明のトロンプモジュリンは、上記の報告に記載されている方法を用いることにより、あるいはそれらに記載の方法に準じることにより製造することができる。例えば特開昭64-6219号公報では、全長のトロンプモジュリンをコードするDNAを含むプラスミドpSV2TMJ2を含む、Escherichia coli K-12 strain DH5（ATCC 寄託番号67283号）を開示しているが、本出願人は、再度、同じ菌株（Escherichia coli DH5/pSV2TMJ2）を日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に所在の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に平成8年6月19日に寄託した。受託番号はFERM BP-5570である。この全長のトロンプモジュリンをコードするDNAを原料として、公知の遺伝子操作技術によって、本発明のトロンプモジュリンを調製することができる。

本発明に用いられる可溶性トロンプモジュリンは、従来公知の方法またはそれに準じて調製すればよいが、例えば、前記山本らの方法（特開昭64-6219号公報、実施例参照

10

20

30

40

50

)、又は特開平5-213998号公報を参考にすることができる。すなわちヒト由来のトロンボモジュリン遺伝子を遺伝子操作技術により、例えば、配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNAとなし、さらに必要に応じた改変を行うことも可能である。この改変としては、例えば、配列番号2のアミノ酸配列をコードするDNAとなすために、配列番号1のアミノ酸配列の第473位のアミノ酸をコードするコドン(特に、第1418位の塩基)に、メソッド イン エンザイモロジー(Method in Enzymology)、第100巻、第468頁(1983年)、アカデミックプレス(Academic Press)に記載の方法に従って、部位特異的変異を行う。例えば、配列番号3の塩基配列を含むDNA断片及び配列番号5に示された塩基配列を有する変異用合成DNAを用い、上記部位特異的変異を行い、配列番号2のアミノ酸配列をコードするDNAとなすことができる。このようにして、調製したDNAを、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞に組み込んで、形質転換細胞とし、適宜選択し、この細胞を培養して得た培養液から、公知の方法により精製された可溶性トロンボモジュリンが製造できる。前述の通り配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNAを前記宿主細胞にトランスフェクトすることが好ましい。本発明に用いられるトロンボモジュリンの生産方法は、上記の方法に限定されるものではなく、例えば、トロンボモジュリン又は可溶性トロンボモジュリンを産生する組織または組織培養液やヒト尿等から抽出精製することも、又は必要によりさらに蛋白分解酵素により切断処理することも可能である。

次いで上記により取得された培養上清、または培養物からのトロンボモジュリンの単離精製方法は、公知の手法〔堀尾武一編集；蛋白質・酵素の基礎実験法〕に準じて行なうことができる。例えば、トロンボモジュリンと逆の電荷を持つ官能基を固定化したクロマトグラフィー担体と、トロンボモジュリンの間の相互作用を利用したイオン交換クロマトグラフィーの使用も好ましい。また、トロンボモジュリンとの特異的親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーも好ましい例として挙げられる。吸着体の好ましい例として、トロンボモジュリンのリガンドであるトロンピンやトロンボモジュリンの抗体を利用する例が挙げられる。これらの抗体としては、適宜の性質、或いは適宜のエピトープを認識するトロンボモジュリンの抗体を利用することができ、例えば、特公平5-42920号公報、特開昭64-45398号公報、特開平6-205692号公報などに記載された例が挙げられる。また、トロンボモジュリンの分子量サイズを利用した、ゲル濾過クロマトグラフィーや限外濾過が挙げられる。そしてまた、疎水性基を固定化したクロマトグラフィー担体と、トロンボモジュリンのもつ疎水性部位との間の疎水結合を利用した疎水性クロマトグラフィーが挙げられる。これらの手法は適宜組み合わせることができる。精製の程度は、使用目的等により選択できるが、例えば電気泳動、好ましくはSDS-PAGEの結果が単一バンドとして得られるか、もしくは単離精製品のゲル濾過HPLCまたは逆相HPLCの結果が単一のピークになるまで純粋化することが望ましい。

精製法を具体的に例示すれば、トロンボモジュリン活性を指標に精製する方法が挙げられ、例えばイオン交換カラムのQ-セファロースFFで培養上清または培養物を粗精製しトロンボモジュリン活性を有する画分を回収し、ついでアフィニティークラムのDIR-TB(diiisopropylphosphoryl thrombin agarose)で主精製しトロンボモジュリン活性が強い画分を回収し、回収画分を濃縮し、ゲルろ過にかけトロンボモジュリン活性画分を純品として取得する精製方法〔五味ら；Blood、75、1396-1399、1990〕が挙げられる。指標とするトロンボモジュリン活性としては、例えばトロンピンによるプロテインC活性化の促進活性が挙げられる。その他に、好ましい精製法を例示すると以下の通りである。

トロンボモジュリンと良好な吸着条件を有する適当なイオン交換樹脂を選定し、イオン交換クロマト精製を行なう。特に好ましい例としては、0.18M NaClを含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したQ-セファロースFFを用いる方法である。適宜洗浄後、例えば0.3M NaClを含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で溶出し粗精製品のトロンボモジュリンを得ることができる。

次に、例えばトロンボモジュリンと特異的親和性を持つ物質を樹脂に固定化しアフィニテ

10

20

30

40

50

イークロマト精製を行なうことができる。好ましい例としてDIP - トロンピン - アガロースカラムの例と、抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体カラムの例が挙げられる。DIP - トロンピン - アガロースカラムは、予め、例えば、100mM NaCl及び0.5mM塩化カルシウムを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で平衡化せしめ、上記の粗精製品をチャージして、適宜の洗浄を行い、例えば、1.0M NaCl及び0.5mM塩化カルシウムを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で溶出し精製品のトロンボモジュリンを取得することができる。また抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体カラムにおいては、予めCNBrにより活性化したセファロース4B(ファルマシア社)に、抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体を溶解した0.5M NaCl含有0.1M NaHCO₃緩衝液(pH8.3)に接触させ、セファロース4Bに抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体をカップリングさせた樹脂を充填したカラムを、予め例えば1.0M NaClを含む20mMリン酸塩緩衝液(pH7.3)で平衡化し、適宜の洗浄の後、例えば、0.3M NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液(pH3.0)にて溶出せしめる方法が例示される。

次に得られた上記精製可溶性トロンボモジュリン溶液を、塩濃度、pHの測定精度及びTMの分子種にもよるが、通常例えば比伝導度25~34ms/cm、pH3~4の条件下にて平衡化せしめた、陽イオン交換体、好ましくは強陽イオン交換体であるSP - セファロースFF(ファルマシア社)にチャージする。上記の比伝導度としては、30±3ms/cmが、より好ましく、またpHは、pH3.0~3.7が好ましく、さらに好ましくはpH3.5±0.1の条件が例示される。これらの条件は、適当な濃度の塩を添加した緩衝液を使用することが好ましく、種々の態様が考えられるが、例えば0.25~0.32M、好ましくは0.3±0.1MのNaClを含む50~150mMのpH3~4の緩衝液が例示される。緩衝液の種類としては特に限定されないが、例えば、グリシン塩酸、クエン酸 - クエン酸2ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸が例示される。上記の条件をさらに具体的に示せば、300mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液(pH3.5)が例示される。比伝導度は、例えば、ポータブル伝導度計(東亜電波工業株式会社製、PシリーズCM-11P、換算基準温度25度)により簡単に測定することができる。

上記のカラムを例えば300mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液(pH3.5、比伝導度31ms/cm)で洗浄を開始し、素通り画分の吸光度280nmのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの素通り画分を得、適当な緩衝液で中和し、血清由来物及び抗体由来物を実質的に含有しない程度まで精製された可溶性TMを高純度精製品として取得することができる。後記する通り、このカラムを使用すると血清由来物や抗体由来物を効率および再現性よく除去できることが確認される。勿論、これらは、適宜限外濾過により濃縮することができる。

さらに、ゲル濾過による緩衝液交換を行なうことも好ましい。例えば、50mM NaClを含む20mMリン酸塩緩衝液(pH7.3)で平衡化せしめたSepahcyl S-300カラムもしくはS-200カラムに、限外濾過により濃縮した高純度精製品をチャージし、50mM NaClを含む20mMリン酸塩緩衝液(pH7.3)で展開分画し、トロンピンによるプロテインCの活性化の促進活性の確認を行ない活性画分を回収し緩衝液交換した高純度精製品を取得することができる。

多くの精製工程においては、塩類を含有する溶出液等を用いることから、最終的に本発明に合致するpHや緩衝液成分や界面活性剤を含む溶液を用いることができれば、特に、最終的に添加や調製を必要とせず、本発明の水溶液注射用製剤となるが、通常は、可溶性トロンボモジュリンに本発明に必要な成分等を追加する方法が簡便であり好ましい。

また本発明における緩衝液成分は、pHをpH5以上、7.0以下に調整でき、同pHの間において緩衝能を有するものであれば特に限定されない。さらに好ましくは、pH5.5~6.5が例示される。例えば、リン酸や、カルボン酸及び/又はその水溶性塩からなる群から選ばれた一種以上の有効量が用いられる。カルボン酸及び/又はその水溶性塩としては、例えば酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、

10

20

30

40

50

酒石酸、フマル酸、リンゴ酸及び／又はその水溶性塩からなる群から選ばれた一種以上が挙げられ、特に好ましくはリン酸、酢酸及び／又はそれらの水溶性塩などが挙げられる。水溶性塩としては製剤学的に許容されるものであれば特に制限はなく、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などが挙げられる。

本発明における容器としては、無菌充填することに適した材料、形状であれば特に限定されないが、例えば、ガラス製シリンジ（さらに、ゴム製キャップおよびゴム製ストッパーにより無菌充填）や、ガラス製バイアル（および栓）、ガラス製アンプルが挙げられ、その他にそれぞれのプラスチック製品を用いることもできる。本発明において、シリンジ容器に封入せしめたプレフィルドシリンジ製剤として提供されることは最も好ましい態様である。プレフィルドシリンジ製剤は、予め水溶液注射剤がシリンジ容器に充填された状態で、貯蔵・流通される製剤であり、容器に注射針が予め付いていても付いていなくともよく、注射針が付いていない場合には、使用時には必要に応じて、注射針を付けて使用されることが通常である。また、注射針を使わずに、プレフィルドシリンジ内の水溶液注射剤自体の圧力を高め、皮膚を透過せしめる方法も挙げられる。この場合に、プレフィルドシリンジ前方の水溶液注射剤の射出口は、比較的狭くすることが好ましく、また圧力を高める手法としては、例えば、ガス（窒素ガス、ヘリウムガス、炭酸ガス等）やバネ等による圧力を利用する方法が挙げられる。

上記のpHにおいて緩衝能を有する緩衝液成分は、その種類その他、その濃度や無菌充填する容器の種類とも関係するが、例えば、使用を予定している容器に、検討する緩衝液を充填予定量（例えば1ml、或いは0.5ml等）を充填して、後記の測定法1に記載の5096時間の加熱処理を行った後のpHの変動が±0.3以内に抑制できる緩衝液成分の種類又はその濃度を選択することが好ましい。前述の代表的な緩衝液成分において、使用される濃度としては、通常0.1mM以上、好ましくは1mM以上が例示され、上限としては、通常は、1000mM以下、好ましくは200mM以下、特に好ましくは25mM以下又は20mM以下が例示される。ガラス製品が予めサルファー処理されていることも好ましい。また、ガラス製シリンジの内壁はシリコンコートされていてもよい。

本願発明の水溶液注射用製剤のための緩衝液の作製方法の例としては、リン酸塩緩衝液の場合には、リン酸二水素ナトリウム（ NaH_2PO_4 、又はその2水塩）の所定の濃度の水溶液とリン酸水素二ナトリウム（ Na_2HPO_4 、又はその12水塩）の所定の濃度の水溶液とを、所定量ずつ混合して目的とするpHに調整する。またはリン酸二水素ナトリウム（ NaH_2PO_4 、又はその2水塩）の所定の濃度の水溶液に、水酸化ナトリウム水溶液を滴下して、目的とするpHに調整してもよい。またpHの微調整のために、薄めた塩酸又はリン酸を滴下してもよい。酢酸塩緩衝液で代表されるカルボン酸塩緩衝液の場合には、酢酸の所定の濃度の水溶液と酢酸ナトリウムの所定の濃度の水溶液とを、所定量ずつ混合して目的とするpHに調整する。または酢酸の所定の濃度の水溶液に、水酸化ナトリウム水溶液を滴下して、目的とするpHに調整してもよい。またpHの微調整のために、薄めた酢酸を滴下してもよい。

本発明の水溶液注射用製剤のpHは、通常pH5.0以上、7.0以下であり、好ましくはpH5.5～6.5である。特に好ましくは約pH6.0が挙げられる。また、pH5.5～6.0が好ましい例として挙げられる。

リン酸塩緩衝液においては、その濃度を0.2～200mMの広い濃度範囲で振ったところ、pH7.3ではリン酸塩緩衝液濃度による影響が大きく、リン酸塩緩衝液濃度が濃くなるほど力価の低下が見られ、例えば200mMでは大きく残存力価を減少させる。しかし、リン酸塩緩衝液を用いる場合であっても、pHを5～7.0の範囲にて厳密に管理すれば、熱安定性（長期安定性）において好ましい品質が得られる。pH5.5～6.5、特に約pH6.0に設定すれば好ましく、余りpH7.0に近い設定をした場合には、若干の変動でも熱安定性において影響があるので、避けることが好ましい。

酢酸塩緩衝液においては、その濃度を0.2～200mMの広い濃度範囲で振っても、緩衝液濃度による影響はなく、またリン酸塩と酢酸塩を組み合わせた緩衝液においては、pH5.0～7.0の範囲において熱安定性において好ましい品質となる。

また酢酸以外のカルボン酸塩緩衝液においても、酢酸塩緩衝液と同じ濃度、pH範囲で酢酸塩緩衝液と同等の熱安定性を示す。またリン酸塩緩衝液に更に酢酸塩緩衝液成分やカルボン酸塩緩衝液成分を添加しても、同等の熱安定性を示す。

また本発明における界面活性剤としては、例えば非イオン性界面活性剤が好ましく、例えばポリソルベート類〔ポリソルベート80（商品名：T w e e n 8 0）、ポリソルベート20（商品名：T w e e n 2 0）など〕、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油類〔ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60（商品名：H C O - 6 0、商品名：クレモフォールRH60）、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油50（商品名：H C O - 5 0、商品名：クレモフォールRH50）など〕、ポリオキシエチレンヒマシ油類〔商品名：C O - 6 0 T X、商品名：C O - 5 0 T X、商品名：クレモフォールELなど〕、エチレンオキサイドプロピレンオキサイド重合体〔ポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコール（商品名：プルロニックF68）など〕、セスキオレイン酸ソルビタンが挙げられる。これらの界面活性剤は、複数を混合して用いてもよく、上記の群から選ばれた一種以上を用いることができる。

振盪安定性において、ポリソルベート80（商品名：T w e e n 8 0）は少なくとも0.01%で、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60（商品名：H C O - 6 0）及びポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコール（商品名：プルロニックF68）は少なくとも0.1%で白濁防止効果を示す。ポリソルベート80（商品名：T w e e n 8 0）は0.01%添加でも白濁防止効果を示し、特に好ましい例として挙げられる。

本発明で用いる界面活性剤の濃度は、通常0.001%以上、好ましくは0.01%以上が例示され、上限としては、通常1%以下、好ましくは0.1%以下が例示される。

上記添加物の他に本発明においては、第3成分として、等張化剤（例えば、塩化ナトリウムなど）、防腐剤（例えばパラオキシ安息香酸エステル類など）等を添加してもよい。

前述の通り、添加方法は特に限定されないが、例えば、添加物を直接トロンボモジュリン含有溶液に添加する方法、またはあらかじめ添加物を水、注射用蒸留水あるいは適当な緩衝液に溶解して添加する方法などが挙げられる。

また、例えば製剤化工程においては、シリンジや、アンプルまたはバイアルに、水、注射用蒸留水あるいは適当な緩衝液1ml当たりトロンボモジュリンを0.05mg以上、好ましくは0.1mg以上、特に好ましくは1mg以上添加することが好ましい例として挙げられる。トロンボモジュリンの添加量の上限としては特に限定されないが、例えば、15mg以下、好適には10mg以下、特に好ましくは6mg以下が例示される。これら濃度のトロンボモジュリン及び上記添加物を含有する溶液を、例えば0.3～10ml無菌状態において充填し、常法により水溶液注射用製剤として調製できる。まず容器を滅菌するためには、常法、例えば、乾熱滅菌、オートクレーブ、 γ 線滅菌を考慮して採用すればよく、乾熱滅菌としては、例えば250℃以上で30分間以上、オートクレーブとしては、例えば121℃20分間以上、 γ 線滅菌としては、例えば20～60kGy（キログレー）の照射量の γ 線を照射する方法が挙げられる。滅菌に際しては、ガラス製のアンプルやバイアルは、乾熱滅菌を採用することが普通であり、またバイアルのゴム栓については、オートクレーブを採用することが普通である。シリンジについてはオートクレーブを使用することもできるが、通常は、 γ 線滅菌を採用することが普通である。また、容器に充填するトロンボモジュリン水溶液は、通常、0.22又は0.2ミクロンの濾過滅菌用のフィルターで濾過することが好ましい。滅菌した容器に滅菌濾過したトロンボモジュリン水溶液を無菌条件下で充填して、本発明の注射剤が調製される。この注射剤は、フィルムや箱に包装されていることも好ましい。

本願発明の水溶液注射用製剤としては、前述の通り、好ましくはプレフィルドシリンジが例示され、バイアルあるいはアンプルであってもよく、特にアンプルを用いる場合には、市販されているサルファ処理アンプルを用いることが好ましい。サルファ処理アンプルとは、SO₂ガスを接触させるか、または好ましくは硫酸アンモニウム水溶液を吹きつけた後、加熱処理して作成される。通常、1～10%の硫酸アンモニウム水溶液を吹きつけた

10

20

30

40

50

後、630～700 で加熱処理する方法が例示される。通常、これらは使用する前に、アンプル洗浄機等により、水を付加した状態で超音波処理後水洗浄し、ついで、乾燥滅菌のために300～350 程度で数分間加熱せしめることにより使用されるものである。また、本発明の第二の態様である、有効量の可溶性トロンボモジュリンと、pH5以上、7.0以下の間において緩衝能を有する緩衝液成分とを含有し、pHがpH5以上7.0以下であるトロンボモジュリン水溶液が、実質的な空隙部を存在せしめないようにシリンジ容器に無菌充填されているプレフィルド製剤であることを特徴とするトロンボモジュリン水溶液注射剤を液状で長期に貯蔵・流通せしめることからなる方法に関して説明すると、以下の通りである。

可溶性トロンボモジュリンや緩衝液成分、およびトロンボモジュリン水溶液注射剤について10
の定義は、前述と同様である。

本発明におけるシリンジ容器としては、市販されている注射用シリンジを利用することが好ましいが、通常は、内径（直径）約8.6mm、約6.3mm、約4.6mm等のプレフィルドシリンジ用のシリンジ容器が例示される。トロンボモジュリン水溶液の充填量により選択されるが、振盪安定性の点からは、約4.6mmのシリンジ容器が最も好ましく、約6.3mmのシリンジ容器も十分に好ましい。約8.6mmのシリンジ容器においては、空隙部割合を50%以下とする配慮が必要となり、結局、約8.6mm以下のシリンジ容器においては、空隙部割合を50%以下とすれば振盪安定性が確保される。

容器の形状や内径によっては、該トロンボモジュリン水溶液注射剤は、その表面張力により、実質的に振盪されないことがある。本発明で振盪可能部位とは、25 で振幅5cm、180往復/分の振盪条件において、振盪により該トロンボモジュリン水溶液注射剤が移動し、実質的に振盪され得る実質的な容器の部位を言い、空隙部割合とは、容器の振盪可能部位の容積から容器の振盪可能部位に存在するトロンボモジュリン水溶液の存在量を差引いた空隙容積を、容器の振盪可能部位の容積で除した百分率を意味する。振盪可能部位のトロンボモジュリン水溶液の存在量は、例えば、トロンボモジュリン水溶液を充填した容器を、上記の振盪条件にて2分間振盪後上下左右の種々の方向を鉛直線方向に保持したまま5秒静置後に容器の下方に移動している溶液量を確認、測定する実験を繰り返すことにより、振盪可能、即ち移動可能な溶液の存在量が確認できる。また同時に振盪可能部位の確認ができ、その容積を算出すればよい。勿論、容器の形状が単純なシリンジにおいては、振盪可能部位は、シリンジおよびストッパー（及びキャップ）により囲まれたスペース自体である。特に、約4.6mmのシリンジ容器においては実質的な振盪がなされず、特に空隙部割合を考慮する必要はない。

通常は、キャップの付いたシリンジ容器に、通常の手法により水溶液注射剤を充填した後、ストッパーを打栓するが、打栓方法としては、真空打栓や、ペントチューブ方式（或いはスリーブ方式）を採用することができる。

上述の真空打栓等により打栓する際には、比較的容易に、空隙部割合を例えば15%以下とすることができる。したがって、本発明において、実質的な空隙部を存在せしめないと、典型的には空隙部割合が15%以下の場合が好ましい例として理解される。また、空隙部割合が10%以下である場合も好ましく、また5%以下である場合も好ましい。皮下注射や筋肉注射に適したプレフィルドシリンジ用のシリンジ容器（通常は数mL、好ましくは2mL以下、さらに好ましくは1mL以下、特に好ましくは0.5mL以下）、例えば少なくとも約8.6mm以下の内径を有するシリンジ容器においては、上述の空隙部割合とすれば、振盪安定性に優れたプレフィルドシリンジ製剤が容易に調製される。

また、上記のシリンジ容器の他に、界面活性剤の添加を考慮すると、バイアルやアンプルを容器として用いることができる。通常のバイアルやアンプルは、内径が比較的大きいものであり、空隙部割合を低下させたり、調整することが比較的困難であるため、空隙部割合を厳密に調節する必要がある場合には避ける方が無難である。

かくして得られる水溶液注射剤は、長期安定性として、5 で少なくとも12ヶ月、好ましくは18ヶ月約80%以上の力価を保持できるものであって、その他の条件が整えば場合によっては、2年間、好ましくは3年間まで貯蔵・流通できる場合も想定される。

10

20

30

40

50

また、25 で振幅 5 cm、180 往復 / 分、1 ヶ月間の振盪条件においても白濁を生ずることがないものである。これらの十分な安定性を有する本発明の水溶液注射剤は、液状において長期に貯蔵・流通することができる。

本発明の貯蔵・流通は、トロンボモジュリン水溶液注射剤が凍結しない温度以上、室温以下であり、具体的には、0 より高く、20 以下であることが例示され、好ましくは 5 前後が例示される。期間は、温度等の条件によるが、通常 12 ヶ月、好ましくは 18 ヶ月、更に好ましくは 2 年間程度が例示される。

また、本発明においては、皮下投与又は筋肉注射に用いる用いる場合も提供される。すなわち、本発明の第四の態様としては、前述のプレフィルドシリンジ製剤を皮下投与用又は筋肉注射用に用いるものである。

また、本発明の第五の態様としては、可溶性トロンボモジュリンを有効成分とする水溶液注射剤であって、1 回 / 2 ~ 5 日の間隔で皮下又は筋肉注射するための持続性製剤を用いことを特徴とする可溶性トロンボモジュリンの血中濃度を持続させる方法である。

また、本発明の第六の態様としては、可溶性トロンボモジュリンを有効成分とする水溶液注射剤であって、1 回 / 2 ~ 5 日の間隔で皮下又は筋肉注射するための持続性製剤である。

トロンボモジュリンはもともと血管内皮細胞表面に存在するものであり、またその作用部位は血管内であることから、トロンボモジュリンを投与する場合には、静脈注射で行なうことが直接的であり、従来より最も好ましいと信じられていた。例えば、特開昭 64 - 6219 号公報には点滴静注の例が記載されている。

しかしながら、患者の容体や利便に合わせた選択肢となり得る他の便利な従来にない製剤等の開発は必要である。

これまでの報告や発表では、トロンボモジュリンが静脈投与以外の投与により積極的に使用されることは必ずしも明確ではなかったが、本発明者らが確認したところ、配列番号 1 の 19 - 516 位のアミノ酸配列からなる可溶性トロンボモジュリン（配列番号 1 のアミノ酸配列をコードする DNA を宿主細胞にトランスフェクトして得られる可溶性トロンボモジュリン）を皮下投与すると、可溶性トロンボモジュリンの血中濃度が確認されるばかりでなく、特に配列番号 1 の 367 - 480 位のアミノ酸配列からなる可溶性トロンボモジュリンに比べても、血中のこのトロンボモジュリン濃度が著しく持続することがはじめて確認された。

したがって、本発明によれば、好ましい持続性製剤が提供される。

この持続性製剤には、さらに、局部麻酔剤を含有せしめることも好ましい。または防腐剤を含有せしめることも好ましい。

この局部麻酔剤として、塩酸プロカインまたはベンジルアルコールが好ましい例として挙げられる。局部麻酔剤の添加量は、通常、注射液量の 0.5 ~ 10 %、好ましくは 1 ~ 5 % が例示される。

さらに必要に応じて、特開平 6 - 321805 号公報、特開昭 64 - 6219 号公報等の開示される通り、アミノ酸、塩類、糖質、界面活性剤、アルブミン、ゼラチン等を添加しても良いし、また、防腐剤を添加することも好ましく、例えば、パラオキシ安息香酸エステル類が好ましい例として挙げられ、パラオキシ安息香酸エチルやパラオキシ安息香酸メチル、又はパラオキシ安息香酸エステル類の混合物が特に好ましい例として挙げられる。防腐剤の添加量は、通常 0.01 ~ 1.0 % が例示され、好ましくは 0.1 ~ 0.3 % が挙げられる。

本発明の持続性製剤に用いる可溶性トロンボモジュリンとしては、可溶性トロンボモジュリンであれば全て使用可能であって、特に限定されないが、例えば、配列番号 1 の 19 - 516 のアミノ酸配列からなる可溶性トロンボモジュリン、配列番号 2 の 19 - 516 のアミノ酸配列からなる可溶性トロンボモジュリン、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA を宿主細胞にトランスフェクトして得られる可溶性トロンボモジュリン、又は、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA を宿主細胞にトランスフェクトして得られる可溶性トロンボモジュリンのいずれかの可溶性トロンボモジュリンが好ま

10

20

30

40

50

しい例として挙げられる。

本発明の持続性としては、例えば血中濃度半減期 ($T_{1/2}$) が 16 時間以上であることや、平均血漿滞留時間 (MRT) が 36 時間以上であることが好ましい例として挙げられる。

本発明の持続性製剤としては、注射液の形態で提供されることが好ましい。本発明の持続性製剤としては、凍結乾燥製剤を使用時に溶解して使用する形態で提供されることも考慮されるが、前述のトロンボモジュリン水溶液注射剤が無菌充填されたプレフィルドシリンジ製剤をそのまま皮下用、又は筋肉内注射剤として用いることが、極めて都合がよい。

本発明の持続性製剤を調製するに際して、これら添加物の添加方法は特に限定されない。添加物を直接トロンボモジュリン含有溶液に添加したり、またはあらかじめ添加物を水、注射用蒸留水あるいは適当な緩衝液に溶解して互いに添加混合する方法にて溶液を調製する。例えば、シリンジ、またはバイアル、場合によってはアンプルに、水、注射用蒸留水あるいは適当な緩衝液 1 ml 当たり 0.05 ~ 15 mg、好適には 0.1 ~ 6 mg のトロンボモジュリン及び上記添加物を含有する溶液を、例えば 0.5 ~ 10 ml 充填し、そのままに水溶液注射用製剤として調製するか、バイアルやアンプルにおいては凍結乾燥することもできる。通常この持続性製剤には、可溶性トロンボモジュリンを 0.01 ~ 100 mg 含有させることが挙げられる。

本発明のトロンボモジュリン水溶液注射剤あるいは持続性製剤の投与回数は、通常のように、1 日 1 ~ 3 回投与としてもよいが、例えば 1 回 / 2 ~ 5 日投与として投与することもできる。特に皮下注射や筋肉注射の場合には、持続性であるために、例えば 1 回 / 2 ~ 5 日投与として投与することが特に好ましい。血管注射の場合の 1 回の投与量としては、点滴静注で最大量を投与する例も挙げられるが、血管内へのワンショット投与における 1 回の投与量としては、通常は、可溶性トロンボモジュリンとして 1 mg / kg (体重) 以下が例示される。最低量としては、通常、0.001 mg / kg (体重) 以上、好ましくは 0.005 mg / kg (体重) 以上が例示される。皮下注射や筋肉注射の場合の 1 回の投与量は、皮下注射や筋肉注射ができる液量に溶解し得る量が上限となる。皮下注射や筋肉注射に適した液量としては、通常は数 ml、好ましくは 2 ml 以下、さらに好ましくは 1 ml 以下、特に好ましくは 0.5 ml 以下が例示される。したがって、皮下注射や筋肉注射の場合の 1 回の投与量としては、可溶性トロンボモジュリンとして 20 mg 以下が通常であり、最低量は上記と同様に 0.001 mg / kg (体重) 以上、好ましくは 0.005 mg / kg (体重) 以上が例示される。

本発明の持続性製剤は、皮下に投与しても、筋肉内に投与しても、同様に持続性が発揮されるが、特に皮下投与が好ましい。

本発明によれば、著しく血中濃度持続時間を延長させることが可能であり、投与回数を減少させることができるとともに、静脈注射剤に比べて少量で有効な可溶性トロンボモジュリン製剤を提供することが可能となる。患者の注射時の痛みを軽減させ、場合によれば、自己注射も可能となるものであり、患者の通院等の利便が著しく貢献するものである。

さて、本発明の可溶性トロンボモジュリン水溶液注射剤の急性毒性を調べたところ、各群 5 匹の雌雄 SD ラットを用いて、トロンボモジュリン量として 180 mg / kg の用量で静脈内投与しても死亡例は 1 例も見られなかった。また 180 mg / kg の用量で皮下注射を行なった際も死亡例は 1 例も見られなかった。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 の他の情報は、ヒトトロンボモジュリンの部分的なアミノ酸配列である。

配列番号 2 の他の情報は、ヒトトロンボモジュリンの部分的なアミノ酸配列である。

配列番号 3 の他の情報は、ヒトトロンボモジュリン遺伝子の部分的な塩基配列である。

配列番号 4 の他の情報は、ヒトトロンボモジュリン遺伝子の部分的な塩基配列である。

配列番号 5 の他の情報は、変異用の合成 DNA である。

実施例

以下、実施例及び比較例により本発明を具体的に説明するが、本発明は何らこれらによって限定されるものではない。

参考例 1

実施例に用いる可溶性トロンボモジュリンは、前記山本らの方法（特開昭 64 - 6219 号公報の実施例 10 に記載の方法）に従って行った。すなわち配列番号 3 の DNA を、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞に組み込んで、形質転換細胞とし、この細胞の培養により可溶性トロンボモジュリンの生産を行った。

参考例 2

強陰イオン交換樹脂カラムによる粗精製

参考例 1 で取得した - 20℃凍結培養上清 11 L を溶解し、0.2 μm のメンブレンフィルター（ミリポア社、ミリパック 20）で濾過した。

濾過した培養上清については、150 mM NaCl を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.4）で平衡化した Q-Sepharose（ファルマシア社）カラム（直径 90 mm、高さ 6.5 cm）に供した。次に 180 mM NaCl を含む 20 mM 酢酸塩緩衝液で洗浄し、更に 180 mM NaCl を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.4）で洗浄を行ない、300 mM NaCl を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.4）で溶出を開始し、溶出液の吸光度 280 nm のピーク立ち上がりからの 0.5 カラムボリューム容量の溶出液を粗精製品として取得した。

10

参考例 3

アフィニティーカラム（トロンピンカラム）による主精製

参考例 2 で得られた溶出画分 400 ml を 100 mM NaCl 及び 0.5 mM 塩化カルシウムを含む 20 mM トリス緩衝液（pH 7.4）に対して透析した。透析後、100 mM NaCl 及び 0.5 mM 塩化カルシウムを含む 20 mM トリス緩衝液（pH 7.4）で平衡化した DIP-トロンピン-アガロース（PAESE LOREI 社、06-148-1035、直径 50 mm、高さ 6 cm）に供した。200 mM NaCl 及び 0.5 mM 塩化カルシウムを含む 20 mM トリス緩衝液（pH 7.4）で洗浄後、1.0 M NaCl 及び 0.5 mM 塩化カルシウムを含む 20 mM トリス緩衝液（pH 7.4）で溶出を開始し、溶出液の吸光度 280 nm のピーク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を主精製品として取得した。

20

参考例 4

アフィニティーカラム（抗体 B）による主精製

アフィニティーカラムは以下のように作製した。即ち、抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体 B は、その抗体を産生するハイブリドーマを培養することにより得た培養上清、あるいは、ハイブリドーマを組織適合性動物、ヌードマウス等の腹腔内にて増殖させて得た腹水より、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、プロテイン A カラム等の分離精製操作により精製した。次に、ファルマシア社のマニュアル（Affinity Chromatography principles & methods）に従い、精製抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体 B を 0.5 M NaCl 含有 0.1 M NaHCO₃ 緩衝液（pH 8.3）に溶解し、CNBr-activated Sepharose 4B（ファルマシア社、52-1153-00-AI）と接触反応させ、セファロース 4B に抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体 B をカップリングし、抗トロンボモジュリンモノクローナル（抗体 B）結合 Sepharose 4B を作製した。次いでこの抗トロンボモジュリンモノクローナル（抗体 B）結合 Sepharose 4B をカラムに充填しモノクローナル（抗体 B）カラムを作製した。

30

40

参考例 2 で得られた溶出画分 400 ml を、1.0 M NaCl を含む 20 mM リン酸塩緩衝液（pH 7.3）で平衡化したモノクローナル抗体（抗体 B）カラム（直径 50 mm、高さ 6 cm）に供した。1.0 M NaCl を含む 20 mM リン酸塩緩衝液（pH 7.3）を流し、更に 100 mM 酢酸塩緩衝液（pH 5.0）を流し洗浄し、0.3 M NaCl を含む 100 mM グリシン塩酸緩衝液（pH 3.0）で溶出を開始し、溶出液の吸光度 280 nm のピーク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を主精製品として取得した。

参考例 5

50

強陽イオン交換樹脂カラムによる高純度精製

1. トロンピンカラム溶出液の精製 (SP非吸着画分)

参考例3で得られた溶出液200mlに100mMグリシン塩酸緩衝液(pH3.5)を加え希釈した液を、次に1.0Mグリシン塩酸緩衝液(pH2.0)でpH3.5に調製した。この希釈pH調製した溶出液を300mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液(比伝導度31ms/cm、pH3.5)で平衡化したSP-Sepharose(ファルマシア社)カラム(直径26mm、高さ3cm)に供した。300mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液(同上)で洗浄を開始し、洗浄液の吸光度280nmのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの洗浄液を得、直ちに500mMリン酸塩酸緩衝液(pH7.3)でpH7に中和し、中和した洗浄液を高純度精製品として取得した。

10

2. モノクローナル抗体カラム溶出液の精製 (SP非吸着画分)

参考例4で得られた溶出液180mlを1.0Mグリシン塩酸緩衝液(pH2.0)にてpH3.5に調製した液を、300mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液(同上)で平衡化したSP-Sepharose(ファルマシア社)カラム(直径26mm、高さ3cm)に供した。300mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液(同上)で洗浄を開始し、洗浄液の吸光度280nmのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの洗浄液を得、直ちに500mMリン酸塩酸緩衝液(pH7.3)でpH7に中和し、中和した洗浄液を高純度精製品として取得した。

20

3. トロンピンカラム溶出液の精製 (SP吸着画分)

参考例3で得られた溶出液200mlに100mMグリシン塩酸緩衝液(pH3.5)を加え希釈した液を、次に1.0Mグリシン塩酸緩衝液(pH2.0)でpH3.5に調製した。この希釈、pH調製した液を、100mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液(pH3.5)で平衡化したSP-Sepharose(ファルマシア社)カラム(直径26mm、高さ3cm)に供した。100mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液(pH3.5)で洗浄し、300mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液(pH3.5)で溶出し、溶出液の吸光度280nmのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を得、直ちに500mMリン酸塩酸緩衝液(pH7.3)でpH7に中和し、中和した溶出液を高純度精製品として取得した。

30

4. 抗体カラム溶出液の精製 (SP吸着画分)

参考例4で得られた溶出液180mlに100mMグリシン塩酸緩衝液(pH3.5)を加え希釈した液を、次に1.0Mグリシン塩酸緩衝液(pH2.0)でpH3.5に調製した。この希釈、pH調製した液を、100mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液(pH3.5)で平衡化したSP-Sepharose(ファルマシア社)カラム(直径26mm、高さ3cm)に供した。100mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液(pH3.5)で洗浄し、300mM NaClを含む100mMグリシン塩酸緩衝液(pH3.5)で溶出し、溶出液の吸光度280nmのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を得、直ちに500mMリン酸塩酸緩衝液(pH7.3)でpH7に中和し、中和した溶出液を高純度精製品として取得した。

40

参考例6

ポリスルホン中空系による高純度精製品の濃縮

参考例5で得られた高純度精製品をそれぞれ、50mM NaClを含む20mMリン酸塩酸緩衝液(pH7.3)で湿潤化した1mのポリスルホン中空系(旭化成工業社製)を用い濃縮し、それぞれ5mlの濃縮液を取得した。

参考例7

ゲル濾過カラムによる高純度精製品の緩衝液交換

参考例6で得られたそれぞれの濃縮液5mlを、50mM NaClを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)で平衡化したそれぞれのSepharose S-300カラム(ファルマシア社、直径16mm、高さ90cm)に供した。50mM NaClを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)で展開し分画した。各画分は

50

測定法 1 のトロンピンによるプロテイン C 活性化を促進する活性の測定法方により活性の確認を行ない活性画分を回収し緩衝液交換した高純度精製品を取得した。

以下の実施例及び比較例では、参考例 2、4、5 の 2、6、7 の順により精製したトロンボモジュリン高純度精製品を用いた。また、緩衝液成分の濃度を調整する場合やリン酸ナトリウム緩衝液以外の緩衝液成分を用いる場合には、上記で得られた高純度精製品を各緩衝液に対して透析して緩衝液成分を交換した。さらに、適当な濃度の緩衝液を添加することでトロンボモジュリン濃度を調整した。pH の調整は薄めた塩酸あるいは水酸化ナトリウム水溶液を適量添加することで行った。

取得されたトロンボモジュリンは、注射用蒸留水に少なくとも 6 mg / ml の濃度で可溶であることが確認された。また、以下の分子量の測定により、6.6 万 ± 1 万（非還元状態）であることが確認された。

10

分子量の測定

電気泳動用グラジエントゲル（SDS ポリアクリルアミド濃度勾配ゲル、商品名：パジェル 5 / 20 %、アトー社製、ゲルサイズ 90 × 73 × 1.0 mm）にて、非還元状態において、25、20 mA の定電流で約 90 分間泳動を行い、分子量標準物質〔ファルマシア社製、低分子電気泳動用キット：1 バイアル中に、フォスフォリラーゼ b（分子量 94,000）、ウシ血清アルブミン（分子量 67,000）、卵白アルブミン（分子量 43,000）、カルボニルアンヒドラーゼ（分子量 30,000）、トリプシンインヒビター（分子量 20,100）、α - ラクトアルブミン（分子量 14,400）及びショ糖を含む〕との比較により、トロンボモジュリンの分子量を測定した。染色はクマシーブリリアントブルー染色による。

20

参考例 8

配列番号 1 の 367 - 480 位のアミノ酸からなる可溶性トロンボモジュリンを以下のように取得した。すなわち特開平 5 - 213998 号公報の実施例 1 - (1) - (b) に記載の方法で取得したプラスミドを、実施例 1 - (2) に記載の方法に従って細胞へトランスフェクションし、実施例 3 - (3) に記載の方法に従って精製し、更に緩衝液交換して高純度精製品を取得した。

取得されたトロンボモジュリンは、注射用蒸留水に少なくとも 6 mg / ml の濃度で可溶であることが確認された。また、上記の分子量の測定により、2.5 万 ± 0.5 万（非還元状態）であることが確認された。

30

緩衝液成分の濃度を調整する場合やリン酸ナトリウム緩衝液以外の緩衝液成分を用いる場合には、上記で得られた高純度精製品を各緩衝液に対して透析して緩衝液成分を交換した。さらに、適当な濃度の緩衝液を添加することでトロンボモジュリン濃度を調整した。pH の調整は薄めた塩酸あるいは水酸化ナトリウム水溶液を適量添加することで行った。

参考例 9

配列番号 2 の 19 - 516 位のアミノ酸からなる可溶性トロンボモジュリンを以下のように取得した。すなわち、メソッド イン エンザイモロジー（Method in Enzymology）、第 100 巻、第 468 頁（1983 年）、アカデミックプレス（Academic Press）に記載の方法に従って、配列番号 3 の塩基配列を含む DNA 断片を、配列番号 5 に示された塩基配列を有する変異用合成 DNA を用いて部位特異的変異を行い、配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする DNA となし、以下参考例 1 ~ 7 に準じて、上記のトロンボモジュリンを取得した。

40

取得されたトロンボモジュリンは、注射用蒸留水に少なくとも 6 mg / ml の濃度で可溶であることが確認された。また、上記の分子量の測定により、6.6 万 ± 1 万（非還元状態）であることが確認された。

緩衝液成分の濃度を調整する場合やリン酸ナトリウム緩衝液以外の緩衝液成分を用いる場合には、上記で得られた高純度精製品を各緩衝液に対して透析して緩衝液成分を交換した。さらに、適当な濃度の緩衝液を添加することでトロンボモジュリン濃度を調整した。pH の調整は薄めた塩酸あるいは水酸化ナトリウム水溶液を適量添加することで行った。

実施例 1

50

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 0.2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM 、ポリソルベート 80 (商品名: Tween 80) を 0.01% となるように添加した後、 pH を 6.0 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプル (内径 12 mm) に 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。このときの振盪可能部位における空隙部割合は約 35% であった。

実施例 2

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 0.2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM 、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60 (商品名: HCO-60) を 0.1% となるように添加した後、 pH を 6.0 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

10

実施例 3

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、酢酸ナトリウム緩衝液濃度を 20 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM 、ポリソルベート 80 (Tween 80) を 0.01% となるように添加した後、 pH を 6.0 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

実施例 4

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、酢酸ナトリウム緩衝液濃度を 20 mM に調整し、更に NaCl を 150 mM 、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60 (HCO-60) を 0.1% となるように添加した後、 pH を 6.0 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

20

実施例 5

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、酢酸ナトリウム緩衝液濃度を 200 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM 、ポリソルベート 80 (Tween 80) を 0.01% となるように添加した後、 pH を 6.0 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

30

実施例 6

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、酢酸ナトリウム緩衝液濃度を 20 mM に調整し、さらに、 NaCl を 150 mM 、ポリソルベート 80 (Tween 80) を 0.01% となるように添加した後、 pH を 5.5 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

実施例 7

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、酢酸ナトリウム緩衝液濃度を 20 mM に調整し、さらに、 NaCl を 150 mM 、ポリソルベート 80 (Tween 80) を 0.01% となるように添加した後、 pH を 5.0 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

40

実施例 8

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、酢酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM 、ポリソルベート 80 (Tween 80) を 0.01% となるように添加した後、 pH を 6.0 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

実施例 9

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、酢酸ナトリウム緩衝液濃度を 2

50

mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加した後、pHを5.5に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合:35%)

実施例10

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、酢酸ナトリウム緩衝液濃度を2mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加した後、pHを5.0に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合:35%)

10

実施例11

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、酢酸ナトリウム緩衝液濃度を0.2mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合:35%)

実施例12

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、酢酸ナトリウム緩衝液濃度を0.2mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加した後、pHを5.5に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合:35%)

20

実施例13

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、酢酸ナトリウム緩衝液濃度を0.2mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加した後、pHを5.0に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合:35%)

実施例14

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を200mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合:35%)

30

実施例15

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を200mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加した後、pHを5.0に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合:35%)

40

実施例16

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を20mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合:35%)

実施例17

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を20mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween80)を0.01%となるように添加した後、pHを5.0に調整した。この薬液を2ml用

50

アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

実施例 18

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を2mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

実施例 19

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を2mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加した後、pHを5.0に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

10

実施例 20

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を20mMに、酢酸ナトリウム緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加した後、pHを7.0に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

20

実施例 21

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を20mMに、酢酸ナトリウム緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween 80)を6.01%となるように添加した後、pHを6.5に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

実施例 22

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を20mMに、酢酸ナトリウム緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

30

実施例 23

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を20mMに、酢酸ナトリウム緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加した後、pHを5.5に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

実施例 24

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を20mMに、酢酸ナトリウム緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加した後、pHを5.0に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

40

実施例 25

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、マロン酸ナトリウム緩衝液濃度を20mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80(Tween 80)を0.01%となるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を2ml用アンプルに2ml分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

50

実施例 2 6

参考例 7 の トロンボモジュリン 濃度を 1 m g / m l に、コハク酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M、ポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) を 0 . 0 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

実施例 2 7

参考例 7 の トロンボモジュリン 濃度を 1 m g / m l に、グルタル酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M、ポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) を 0 . 0 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

10

実施例 2 8

参考例 7 の トロンボモジュリン 濃度を 1 m g / m l に、酒石酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M、ポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) を 0 . 0 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

実施例 2 9

参考例 7 の トロンボモジュリン 濃度を 1 m g / m l に、フマル酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M、ポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) を 0 . 0 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

20

実施例 3 0

参考例 7 の トロンボモジュリン 濃度を 1 m g / m l に、リンゴ酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M、ポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) を 0 . 0 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

30

実施例 3 1

参考例 7 の トロンボモジュリン 濃度を 1 m g / m l に、プロピオン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M、ポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) を 0 . 0 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

実施例 3 2

参考例 7 の トロンボモジュリン 濃度を 1 m g / m l に、クエン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M、ポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) を 0 . 0 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

40

実施例 3 3

参考例 7 の トロンボモジュリン の濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に、プロピオン酸ナトリウム緩衝液濃度が 2 0 m M となるように調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M、ポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) を 0 . 0 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

実施例 3 4

50

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に、グルタル酸ナトリウム緩衝液濃度が 2 0 m M となるように調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M 、ポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) を 0 . 0 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

実施例 3 5

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に、コハク酸ナトリウム緩衝液濃度が 2 0 m M となるように調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M 、ポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) を 0 . 0 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

10

実施例 3 6

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に、酒石酸ナトリウム緩衝液濃度が 2 0 m M となるように調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M 、ポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) を 0 . 0 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

実施例 3 7

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に、フマル酸ナトリウム緩衝液が 2 0 m M となるように調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M 、ポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) を 0 . 0 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

20

実施例 3 8

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に、リンゴ酸ナトリウム緩衝液が 2 0 m M となるように調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M 、ポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) を 0 . 0 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

30

実施例 3 9

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M 、ポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) を 0 . 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

実施例 4 0

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M 、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 6 0 (H C O - 6 0) を 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

40

実施例 4 1

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、更に N a C l を 1 5 0 m M 、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 6 0 (H C O - 6 0) を 0 . 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

実施例 4 2

50

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M 、ポリオキシエチレン (1 6 0) ポリオキシプロピレン (3 0) グリコール (商品名 : プルロニック F 6 8) を 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合 : 3 5 %)

実施例 4 3

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M 、ポリオキシエチレン (1 6 0) ポリオキシプロピレン (3 0) グリコール (プルロニック F 6 8) を 0 . 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合 : 3 5 %)

10

実施例 4 4

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に調整し、さらにポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) を 0 . 0 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合 : 3 5 %)

実施例 4 5

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ (ウエスト社製、基本組成 : プロモブチルゴム) を装着した内径 6 . 3 m m のガラス製シリンジ (ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l ロングタイプシリンジ、針なし) に 1 m l 分注し、空隙部割合が 5 % となるように真空度を調整してストッパー (ウエスト社製、基本組成 : プロモブチルゴム) を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

20

実施例 4 6

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ (ウエスト社製、基本組成 : プロモブチルゴム) を装着した内径 6 . 3 m m のガラス製シリンジ (ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l ロングタイプシリンジ、針なし) に 1 m l 分注し、空隙部割合が 1 0 % となるように真空度を調整してストッパー (ウエスト社製、基本組成 : プロモブチルゴム) を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

30

実施例 4 7

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ (ウエスト社製、基本組成 : プロモブチルゴム) を装着した内径 6 . 3 m m のガラス製シリンジ (ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l ロングタイプシリンジ、針なし) に 1 m l 分注し、空隙部割合が 1 5 % となるように真空度を調整してストッパー (ウエスト社製、基本組成 : プロモブチルゴム) を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

40

実施例 4 8

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ (ウエスト社製、基本組成 : プロモブチルゴム) を装着した内径 6 . 3 m m のガラス製シリンジ (ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l ロングタイプシリンジ、針なし) に 1 m l 分注し、空隙部割合が 2 5 % となるように真空度を調整してストッパー (ウエスト社製、基本組成 : プロモブチルゴム) を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

50

実施例 4 9

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 8 . 6 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l スタンダードタイプシリンジ、針なし）に 1 m l 分注し、空隙部割合が 5 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 5 0

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 8 . 6 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l スタンダードタイプシリンジ、針なし）に 1 m l 分注し、空隙部割合が 1 0 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

10

実施例 5 1

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 8 . 6 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l スタンダードタイプシリンジ、針なし）に 1 m l 分注し、空隙部割合が 1 5 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

20

実施例 5 2

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 8 . 6 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l スタンダードタイプシリンジ、針なし）に 1 m l 分注し、空隙部割合が 2 5 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

30

実施例 5 3

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6 . 3 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l ロングタイプシリンジ、針なし）に 0 . 5 m l 分注し、空隙部割合が 1 0 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

40

実施例 5 4

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6 . 3 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l ロングタイプシリンジ、針なし）に 0 . 5 m l 分注し、空隙部割合が 1 5 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓

50

し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 5 5

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6 . 3 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l ロングタイプシリンジ、針なし）に 0 . 5 m l 分注し、空隙部割合が 3 0 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 5 6

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6 . 3 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l ロングタイプシリンジ、針なし）に 0 . 5 m l 分注し、空隙部割合が 4 0 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 5 7

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 8 . 6 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l スタンダードタイプシリンジ、針なし）に 0 . 5 m l 分注し、空隙部割合が 4 0 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 5 8

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 8 . 6 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l スタンダードタイプシリンジ、針なし）に 0 . 5 m l 分注し、空隙部割合が 5 0 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 5 9

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 4 . 6 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、0 . 5 m l シリンジ、針付）に 0 . 5 m l 分注し、空隙部割合が 1 0 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 6 0

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 4 . 6 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、0 . 5 m l シリンジ、針付）に 0 . 5 m l 分注し、空隙部割合が 1 5 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロン

10

20

30

40

50

ボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 6 1

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg / ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 6.0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 4.6 mm のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、0.5 ml シリンジ、針付）に 0.3 ml 分注し、空隙部割合が 15 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 6 2

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg / ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 6.0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 4.6 mm のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、0.5 ml シリンジ、針付）に 0.3 ml 分注し、空隙部割合が 35 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 6 3

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg / ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 6.0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 4.6 mm のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、0.5 ml シリンジ、針付）に 0.3 ml 分注し、空隙部割合が 50 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 6 4

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg / ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 5.0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6.3 mm のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 ml ロングタイプシリンジ、針なし）に 1 ml 分注し、空隙部割合が 10 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 6 5

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg / ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 5.5 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6.3 mm のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 ml ロングタイプシリンジ、針なし）に 1 ml 分注し、空隙部割合が 10 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 6 6

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg / ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 6.5 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6.3 mm のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 ml ロングタイプシリンジ、針なし）に 1 ml 分注し、空隙部割合が 10 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 6 7

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、 pH を 7.0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6.3 mm のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、 1 mL ロングタイプシリンジ、針なし）に 1 mL 分注し、空隙部割合が 10% となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 6 8

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 20 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、 pH を 6.0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6.3 mm のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、 1 mL ロングタイプシリンジ、針なし）に 1 mL 分注し、空隙部割合が 10% となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

10

実施例 6 9

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 200 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、 pH を 6.0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6.3 mm のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、 1 mL ロングタイプシリンジ、針なし）に 1 mL 分注し、空隙部割合が 10% となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

20

実施例 7 0

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg/ml に、酢酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、 pH を 6.0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6.3 mm のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、 1 mL ロングタイプシリンジ、針なし）に 1 mL 分注し、空隙部割合が 10% となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

30

実施例 7 1

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg/ml に、酢酸ナトリウム緩衝液濃度を 20 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、 pH を 6.0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6.3 mm のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、 1 mL ロングタイプシリンジ、針なし）に 1 mL 分注し、空隙部割合が 10% となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

40

実施例 7 2

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg/ml に、酢酸ナトリウム緩衝液濃度を 200 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、 pH を 6.0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6.3 mm のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、 1 mL ロングタイプシリンジ、針なし）に 1 mL 分注し、空隙部割合が 10% となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 7 3

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 0.1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、 pH を 6.0

50

に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径6.3mmのガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1mlロングタイプシリンジ、針なし）に1ml分注し、空隙部割合が10%となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 7 4

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を0.3mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を2mMに調整し、さらにNaClを150mMとなるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径6.3mmのガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1mlロングタイプシリンジ、針なし）に1ml分注し、空隙部割合が10%となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

10

実施例 7 5

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を3mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を6mMに調整し、さらにNaClを150mMとなるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径6.3mmのガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1mlロングタイプシリンジ、針なし）に1ml分注し、空隙部割合が10%となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

20

実施例 7 6

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を6mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を12mMに調整し、さらにNaClを150mMとなるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径6.3mmのガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1mlロングタイプシリンジ、針なし）に1ml分注し、空隙部割合が10%となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 7 7

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を3mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を6mMに調整し、さらにNaClを150mMとなるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径6.3mmのガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1mlロングタイプシリンジ、針なし）に0.5ml分注し、空隙部割合が15%となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

30

実施例 7 8

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を6mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を12mMに調整し、さらにNaClを150mMとなるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径6.3mmのガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1mlロングタイプシリンジ、針なし）に0.5ml分注し、空隙部割合が15%となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

40

実施例 7 9

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を1mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を2mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80（Tween 80）を0.01%となるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を、先端部にキ

50

ヤップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径6.3mmのガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1mlロングタイプシリンジ、針なし）に1ml分注し、空隙部割合が10%となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 8 0

参考例7のトロンボモジュリン濃度を3mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を6mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80（Tween80）を0.01%となるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径6.3mmのガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1mlロングタイプシリンジ、針なし）に1ml分注し、空隙部割合が10%となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

10

実施例 8 1

参考例7のトロンボモジュリン濃度を6mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を12mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリソルベート80（Tween80）を0.01%となるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径6.3mmのガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1mlロングタイプ、針なし）に0.5ml分注し、空隙部割合が15%となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

20

実施例 8 2

参考例7のトロンボモジュリン濃度を6mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を12mMに調整し、さらにNaClを150mM、ポリオキシエチレンヒマシ油（クレモフォールEL）を0.01%となるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径6.3mmのガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1mlロングタイプシリンジ、針なし）に0.5ml分注し、空隙部割合が15%となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

30

実施例 8 3

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を20mMに、酢酸ナトリウム緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、さらにNaClを150mMとなるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径6.3mmのガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1mlロングタイプシリンジ、針なし）に1ml分注し、空隙部割合が10%となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

40

実施例 8 4

参考例7のトロンボモジュリンの濃度を1mg/mlに、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を20mMに、プロピオン酸ナトリウム緩衝液濃度が20mMとなるように調整し、さらにNaClを150mMとなるように添加した後、pHを6.0に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径6.3mmのガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1mlロングタイプシリンジ、針なし）に1ml分注し、空隙部割合が10%となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

50

実施例 8 5

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に、グルタル酸ナトリウム緩衝液濃度が 2 0 m M となるように調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6 . 3 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l ロングタイプシリンジ、針なし）に 1 m l 分注し、空隙部割合が 1 0 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 8 6

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に、コハク酸ナトリウム緩衝液濃度が 2 0 m M となるように調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6 . 3 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l ロングタイプシリンジ、針なし）に 1 m l 分注し、空隙部割合が 1 0 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 8 7

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に、酒石酸ナトリウム緩衝液濃度が 2 0 m M となるように調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6 . 3 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l ロングタイプシリンジ、針なし）に 1 m l 分注し、空隙部割合が 1 0 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 8 8

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に、フマル酸ナトリウム緩衝液が 2 0 m M となるように調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6 . 3 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l ロングタイプシリンジ、針なし）に 1 m l 分注し、空隙部割合が 1 0 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 8 9

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に、リンゴ酸ナトリウム緩衝液が 2 0 m M となるように調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を装着した内径 6 . 3 m m のガラス製シリンジ（ベクトン・ディッキンソン社製、1 m l ロングタイプシリンジ、針なし）に 1 m l 分注し、空隙部割合が 1 0 % となるように真空度を調整してストッパー（ウエスト社製、基本組成：プロモブチルゴム）を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 9 0

参考例 9 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M 、ポリソルベート 8 0 （T w e e n 8 0 ）を 0 . 0 1 % となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調

10

20

30

40

50

製した。(空隙部割合: 35%)

実施例 9 1

参考例 9 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 6.0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ(ウエスト社製、基本組成: プロモブチルゴム)を装着した内径 6.3 mm のガラス製シリンジ(ベクトン・ディッキンソン社製、1 ml ロングタイプシリンジ、針なし)に 1 ml 分注し、空隙部割合が 10% となるように真空度を調整してストッパー(ウエスト社製、基本組成: プロモブチルゴム)を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

実施例 9 2

参考例 8 のトロンボモジュリン(配列番号 1 の 367 - 480 位のアミノ酸からなる)の濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 20 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM、ポリソルベート 80(Tween 80)を 0.01% となるように添加した後、pH を 6.0 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

比較例 1

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 20 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 7.3 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

比較例 2

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 20 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 6.0 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

比較例 3

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 0.2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 6.0 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

比較例 4

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、酢酸ナトリウム緩衝液濃度を 20 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 6.0 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

比較例 5

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 200 mM となるように調整し、さらに NaCl を 150 mM、ポリソルベート 80(Tween 80)を 0.01% となるように添加した後、pH を 7.3 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

比較例 6

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 20 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM、ポリソルベート 80(Tween 80)を 0.01% となるように添加した後、pH を 7.3 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

比較例 7

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM、ポリソルベート 80(Tween 80)

10

20

30

40

50

を 0.01% となるように添加した後、pH を 7.3 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

比較例 8

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 20 mM に、酢酸ナトリウム緩衝液濃度が 20 mM となるように調整し、さらに NaCl を 150 mM、ポリソルベート 80 (Tween 80) を 0.01% となるように添加した後、pH を 7.3 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 35%)

比較例 9

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 7.3 に調整した。この薬液を 2 ml 用アンプルに 2 ml 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。このときの振盪可能部位における空隙部割合は 35% であった。

比較例 10

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 7.3 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ(ウエスト社製、基本組成: プロモブチルゴム)を装着した内径 6.3 mm のガラス製シリンジ(ベクトン・ディッキンソン社製、1 ml ロングタイプシリンジ、針なし)に 1 ml 分注し、空隙部割合が 10% となるように真空度を調整してストッパー(ウエスト社製、基本組成: プロモブチルゴム)を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

比較例 11

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 6.0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ(ウエスト社製、基本組成: プロモブチルゴム)を装着した内径 8.6 mm のガラス製シリンジ(ベクトン・ディッキンソン社製、1 ml スタンダードタイプシリンジ、針なし)に 0.5 ml 分注し、空隙部割合が 60% となるように真空度を調整してストッパー(ウエスト社製、基本組成: プロモブチルゴム)を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

比較例 12

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 6.0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ(ウエスト社製、基本組成: プロモブチルゴム)を装着した内径 8.6 mm のガラス製シリンジ(ベクトン・ディッキンソン社製、1 ml スタンダードタイプシリンジ、針なし)に 0.5 ml 分注し、空隙部割合が 70% となるように真空度を調整してストッパー(ウエスト社製、基本組成: プロモブチルゴム)を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

比較例 13

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を 1 mg/ml に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 20 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM となるように添加した後、pH を 7.3 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ(ウエスト社製、基本組成: プロモブチルゴム)を装着した内径 6.3 mm のガラス製シリンジ(ベクトン・ディッキンソン社製、1 ml ロングタイプシリンジ、針なし)に 1 ml 分注し、空隙部割合が 10% となるように真空度を調整してストッパー(ウエスト社製、基本組成: プロモブチルゴム)を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。

比較例 14

参考例 9 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

比較例 1 5

参考例 8 のトロンボモジュリンの濃度を 1 m g / m l に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2 0 m M に調整し、さらに N a C l を 1 5 0 m M となるように添加した後、p H を 6 . 0 に調整した。この薬液を 2 m l 用アンプルに 2 m l 分注して熔閉し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤を調製した。(空隙部割合: 3 5 %)

試験例 1

実施例 1 ~ 4 及び比較例 1 ~ 4 の水溶液注射用製剤を、下記測定法 1 により熱安定性に関する力価の残存率(残存力価%)を測定した。測定法 1 では、5 0 9 6 時間の保存後の力価が 6 6 % 以上であるものを適と判定した。なおアレニウスプロットによる予測から、5 0 9 6 時間の保存後の力価が 6 6 % 以上であるものは、5 保存で 8 0 % 以上力価を保持している期間が 3 年と推定される。また、測定法 2 により振盪安定性試験に関する評価を行った。そして、測定法 1 と測定法 2 の測定結果のいずれにおいても満足すべき結果を得たものに対して、総合評価として、適、不適を判断した。その結果は、第 1 表に示した。

第 1 表

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時の pH	界面活性剤 濃度、種類	測定 法1	測定法2			総合 評価
				残存 力価 (%)	外観	濁度	残存 力価 (%)	
比較例 1	20mM リン酸ナトリウム	7.3	なし	55.4	白濁			不適
比較例 2	20mM リン酸ナトリウム	6.0	なし	79.1	白濁			不適
比較例 3	0.2mM リン酸ナトリウム	6.0	なし	83.4	白濁	2.930	98.4	不適
実施例 1	0.2mM リン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	84.7	無色 澄明	0.000	100.6	適
実施例 2	0.2mM リン酸ナトリウム	6.0	0.1% HCO-60	85.4	無色 澄明	0.002	101.0	適
比較例 4	20mM 酢酸ナトリウム	6.0	なし	86.7	白濁	2.930	99.6	不適
実施例 3	20mM 酢酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	87.8	無色 澄明	0.002	101.8	適
実施例 4	20mM 酢酸ナトリウム	6.0	0.1% HCO-60	84.4	無色 澄明	0.002	102.5	適

即ち、リン酸ナトリウム緩衝液および酢酸ナトリウム緩衝液のいずれにおいても、p H 6 . 0 においては、熱安定性における残存力価はすべて 6 6 % 以上であったが、p H 7 . 3 の比較例 1 では 6 6 % 以下であった。また、0 . 0 1 % T w e e n 8 0、又は 0 . 1 % H C O - 6 0 の界面活性剤が併存した場合に、振盪安定性において白濁を生ずることがなく、総合評価が「適」である水溶液注射用製剤が調製された。

< 測定法 1 > 熱安定性試験 (5 0 で 9 6 時間加熱処理)

測定する水溶液注射用製剤を、5 0 で 9 6 時間加熱処理を行い、以下の手順でトロンボモジュリン力価を測定し、熱処理せずに凍結保存していた試料の力価を 1 0 0 % として、熱処理した試料の力価の残存率(残存力価%)を比較する。

トロンボモジュリン力価の測定は、トロンビンによるプロテイン C 活性化を促進する作用 (A P C アッセイ法) で測定する。すなわち、1 0 0 m M の N a C l、3 m M の塩化カルシウム、0 . 1 % のウシ血清アルブミン (シグマ社)、0 . 2 2 5 N I H U のヒトトロン

ピン（シグマ社）を含む50mMトリス塩酸緩衝液（pH8.5）37.5μLに、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用製剤から適宜調製した試料溶液5μL（但し、試料溶液5μL中のトロンボモジュリン量を、0.35～1.4ngの範囲となるように適宜の希釈率で希釈する）を加えて37で15分静置し、約300μg/mlのウシプロテインC（ライフテクノロジー社）を7.5μL添加して37で更に30分静置し、プロテインCを活性化させる。次に約100μg/mlのヘパリン（和光純薬工業社）と約6μg/mlのアンチトロンビンIII（ライフテクノロジー社）を含む液7.5μLを添加して反応を停止させる。次に、合成基質（BOC-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA）100μg/mlを含む基質反応液500μLを添加し、37で20分間静置する。酢酸50μLを添加して基質切断反応を停止させる。反応液を蛍光光度計を用いて、励起波長380nm、発光波長440nmで蛍光強度を測定し、生成した活性型プロテインC量を求め、更にトロンボモジュリン力価標準品との比較からトロンボモジュリン力価を計算する。

<測定法2> 振盪安定性試験（180往復/分の振盪処理）

測定する水溶液注射用製剤を、25の恒温振盪機中にて、振幅5cm、1分間に180往復の条件で1ヵ月間振盪処理を行い、処理前後の外観変化を観察する。必要に応じて濁度（650nmにおける吸光度）及びトロンボモジュリン力価の残存率を測定する。なお、振盪方向は、容器の長軸と平行方向とする。トロンボモジュリン力価の測定法は、測定法1と同一の測定法による。

試験例2

実施例3、5～13、及び比較例1の水溶液注射用製剤について、前述の測定法1および測定法2の測定を行い、同様に総合評価を行った。その結果は、第2表に示した。

第2表

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時の pH	界面活性剤 濃度、種類	測定 法1	測定法2			総合 評価
				残存 力価 (%)	外観	濁度	残存 力価 (%)	
比較例 1	20mM リン酸ナトリウム	7.3	なし	55.4	白濁			不適
実施例 5	200mM 酢酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	85.4	無色 澄明			適
実施例 3	20mM 酢酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	87.8	無色 澄明			適
実施例 6	20mM 酢酸ナトリウム	5.5	0.01% Tween80	90.3	無色 澄明			適
実施例 7	20mM 酢酸ナトリウム	5.0	0.01% Tween80	75.1	無色 澄明			適
実施例 8	2mM 酢酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	85.4	無色 澄明			適
実施例 9	2mM 酢酸ナトリウム	5.5	0.01% Tween80	79.0	無色 澄明			適
実施例 10	2mM 酢酸ナトリウム	5.0	0.01% Tween80	75.7	無色 澄明			適
実施例 11	0.2mM 酢酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	84.4	無色 澄明			適
実施例 12	0.2mM 酢酸ナトリウム	5.5	0.01% Tween80	80.9	無色 澄明			適
実施例 13	0.2mM 酢酸ナトリウム	5.0	0.01% Tween80	77.4	無色 澄明			適

即ち、酢酸ナトリウム緩衝液の濃度を0.2～200mMの広い濃度範囲で振ったが、緩衝液濃度による影響はなく、pHを5.0～6.0の範囲にすれば、熱安定性における残存力価はすべて66%以上であった。また、0.01% Tween80が併存した場合に、振盪安定性において白濁を生ずることがなく、総合評価が「適」である水溶液注射用製

剤が調製された。

試験例 3

実施例 14 ~ 19 及び比較例 5 ~ 7 の水溶液注射用製剤について、前述の測定法 1 および測定法 2 の測定を行い、同様に総合評価を行った。その結果は、第 3 表に示した。

第 3 表

	保存時の緩衝液濃度、組成	保存時の pH	界面活性剤濃度、種類	測定法 1	測定法 2			総合評価
				残存力価 (%)	外観	濁度	残存力価 (%)	
比較例 5	200mM リン酸ナトリウム	7.3	0.01% Tween80	7.1	無色澄明			不適
実施例 14	200mM リン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	73.7	無色澄明			適
実施例 15	200mM リン酸ナトリウム	5.0	0.01% Tween80	67.8	無色澄明			適
比較例 6	20mM リン酸ナトリウム	7.3	0.01% Tween80	54.1	無色澄明			不適
実施例 16	20mM リン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	88.2	無色澄明			適
実施例 17	20mM リン酸ナトリウム	5.0	0.01% Tween80	72.3	無色澄明			適
比較例 7	2mM リン酸ナトリウム	7.3	0.01% Tween80	63.2	無色澄明			不適
実施例 18	2mM リン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	86.8	無色澄明			適
実施例 19	2mM リン酸ナトリウム	5.0	0.01% Tween80	70.3	無色澄明			適

即ち、リン酸ナトリウム緩衝液の濃度を 2 ~ 200 mM の広い濃度範囲で振ったところ、pH 7.3 では緩衝液濃度による影響があり、濃度が濃くなるほど力価の低下が見られて 66% を下回ったが（比較例 5 ~ 7）、pH を 5.0 ~ 6.0 の範囲にすれば、熱安定性における残存力価はすべて 66% 以上であった。また、0.01% Tween80 が併存した場合に、振盪安定性において白濁を生ずることがなく、総合評価が「適」である水溶液注射用製剤が調製された。

試験例 4

実施例 20 ~ 24 及び比較例 1、8 の水溶液注射用製剤について、前述の測定法 1 および測定法 2 の測定を行い、同様に総合評価を行った。その結果は、第 4 表に示した。

第 4 表

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 のpH	界面活性剤 濃度、種類	測定 法1	測定法2			総合 評価
				残存 力価 (%)	外観	濁度	残存 力価 (%)	
比較例 1	20mM リン酸ナトリウム	7.3	なし	55.4	白濁			不適
比較例 8	20mM リン酸ナトリウム 20mM 酢酸ナトリウム	7.3	0.01% Tween80	59.8	無色 澄明			不適
実施例 20	20mM リン酸ナトリウム 20mM 酢酸ナトリウム	7.0	0.01% Tween80	68.9	無色 澄明			適
実施例 21	20mM リン酸ナトリウム 20mM 酢酸ナトリウム	6.5	0.01% Tween80	74.2	無色 澄明			適
実施例 22	20mM リン酸ナトリウム 20mM 酢酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	81.3	無色 澄明			適
実施例 23	20mM リン酸ナトリウム 20mM 酢酸ナトリウム	5.5	0.01% Tween80	80.7	無色 澄明			適
実施例 24	20mM リン酸ナトリウム 20mM 酢酸ナトリウム	5.0	0.01% Tween80	71.3	無色 澄明			適

即ち、リン酸ナトリウム緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液の濃度を共に 20 mM に調整し、pH を 5.0 ~ 7.3 で振ったところ、pH が 5.0 ~ 7.0 の範囲では、熱安定性における残存力価はすべて 66 % 以上であった。pH を 5.5 ~ 6.5 の範囲にすれば、熱安定性における残存力価は 73 % 以上であり、これは 5 保存で 80 % 以上力価を保持している期間が 4 年と推定された。特に pH 5.5 及び 6.0 での残存力価は 80 % 以上と高かった。一方 pH 7.3 では 66 % を下回った（比較例 1、8）。また、0.01 % Tween 80 が併存した場合に、振盪安定性において白濁を生ずることがなく、総合評価が「適」である水溶液注射用製剤が調製された。

試験例 5

実施例 25 ~ 32 及び比較例 1、2 の水溶液注射用製剤について、前述の測定法 1 および測定法 2 の測定を行い、同様に総合評価を行った。その結果は、第 5 表に示した。

第5表

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 のpH	界面活性剤 濃度、種類	測定 法1	測定法2			総合 評価
				残存 力価 (%)	外観	濁度	残存 力価 (%)	
比較例 1	20mM リン酸ナトリウム	7.3	なし	55.4	白濁			不適
比較例 2	20mM リン酸ナトリウム	6.0	なし	79.1	白濁			不適
実施例 25	20mM マロン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	85.9	無色 澄明			適
実施例 26	20mM コハク酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	81.7	無色 澄明			適
実施例 27	20mM グルタル酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	82.4	無色 澄明			適
実施例 28	20mM 酒石酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	74.5	無色 澄明			適
実施例 29	20mM フマル酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	77.3	無色 澄明			適
実施例 30	20mM リンゴ酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	77.0	無色 澄明			適
実施例 31	20mM プロピオン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	79.2	無色 澄明			適
実施例 32	20mM クエン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	74.5	無色 澄明			適

即ち、緩衝液成分を20mMの各種カルボン酸塩に変えても、pHを6.0に調整すれば、熱安定性における残存力価はすべて66%以上であった。また、0.01% Tween 80が併存した場合に、振盪安定性において白濁を生ずることがなく、総合評価が「適」である水溶液注射用製剤が調製された。

試験例6

実施例33～38及び比較例1、2の水溶液注射用製剤について、前述の測定法1および測定法2の測定を行い、同様に総合評価を行った。その結果は、第6表に示した。

第6表

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 のpH	界面活性剤 濃度、種類	測定 法1	測定法2			総合 評価
				残存 力価 (%)	外観	濁度	残存 力価 (%)	
比較例 1	20mM リン酸ナトリウム	7.3	なし	55.4	白濁			不適
比較例 2	20mM リン酸ナトリウム	6.0	なし	79.1	白濁			不適
実施例 33	20mM リン酸ナトリウム 20mM プロピオン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	78.0	無色 澄明			適
実施例 34	20mM リン酸ナトリウム 20mM グルタル酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	76.1	無色 澄明			適
実施例 35	20mM リン酸ナトリウム 20mM コハク酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	82.1	無色 澄明			適
実施例 36	20mM リン酸ナトリウム 20mM 酒石酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	81.3	無色 澄明			適
実施例 37	20mM リン酸ナトリウム 20mM フマル酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	72.6	無色 澄明			適
実施例 38	20mM リン酸ナトリウム 20mM リンゴ酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	84.3	無色 澄明			適

即ち、リン酸ナトリウム緩衝液に、各種カルボン酸塩の緩衝液成分を加えても、pHを6.0に調整すれば、熱安定性における残存力価はすべて66%以上であった。また、0.01% Tween 80が併存した場合に、振盪安定性において白濁を生ずることがなく、総合評価が「適」である水溶液注射用製剤が調製された。

試験例 7

実施例 18、39～43、44及び比較例 9の水溶液注射用製剤について、前述の測定法 1 および測定法 2 の測定を行った。その結果は、第 7 表に示した。

第 7 表

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 のpH	界面活性剤 濃度、種類	測定 法1	測定法2			総合 評価
				残存 力価 (%)	外観	濁度	残存 力価 (%)	
比較例 9	2mM リン酸ナトリウム	7.3	なし	不適	白濁	1.299	90.8	不適
実施例 39	2mM リン酸ナトリウム	6.0	0.1% Tween80	適	無色 澄明	-0.008	97.6	適
実施例 18	2mM リン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	適	無色 澄明	-0.010	87.0	適
実施例 40	2mM リン酸ナトリウム	6.0	1% HCO-60	適	無色 澄明	0.017	87.8	適
実施例 41	2mM リン酸ナトリウム	6.0	0.1% HCO-60	適	無色 澄明	-0.003	93.8	適
実施例 42	2mM リン酸ナトリウム	6.0	1% フルロニックF68	適	無色 澄明	0.010	101.7	適
実施例 43	2mM リン酸ナトリウム	6.0	0.1% フルロニックF68	適	無色 澄明	-0.004	93.2	適
実施例 44	20mM リン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	適	無色 澄明			適

即ち、界面活性剤の種類と濃度を振って振盪安定性を測定したところ、界面活性剤なしでは外観が白濁した（比較例 9）のに対し、界面活性剤入りでは、白濁が防止された。界面活性剤濃度は、商品名：Tween 80は0.1%で、商品名：HCO-60及び商品名：フルロニックF68は0.1%で充分効果があった。また食塩の影響はなかった。

試験例 8

実施例 45～63及び比較例 10～12の水溶液注射用製剤について、前述の測定法 1 及び測定法 2 の測定を行い、同様に総合評価を行った。その結果は、第 8 表に示した。

第 8 表

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 のpH	空隙部 割合 (%)	測定 法1	測定法2			総合 評価
				残存 力価 (%)	外観	濁度	残存 力価 (%)	
比較例 10	2mM リン酸ナトリウム	7.3	10	不適	無色 澄明	0.012	92.9	不適
比較例 11	2mM リン酸ナトリウム	6.0	60	適	白濁	0.124		不適
比較例 12	2mM リン酸ナトリウム	6.0	70	適	白濁	0.182	95.3	不適
実施例 45	2mM リン酸ナトリウム	6.0	5	適	無色 澄明	0.004	97.8	適
実施例 46	2mM リン酸ナトリウム	6.0	10	86.5	無色 澄明	0.006	98.6	適
実施例 47	2mM リン酸ナトリウム	6.0	15	適	無色 澄明	0.019	96.8	適
実施例 48	2mM リン酸ナトリウム	6.0	25	適	無色 澄明	0.010	93.2	適
実施例 49	2mM リン酸ナトリウム	6.0	5	適	無色 澄明	0.005	93.2	適
実施例 50	2mM リン酸ナトリウム	6.0	10	適	無色 澄明	0.008	92.7	適
実施例 51	2mM リン酸ナトリウム	6.0	15	適	無色 澄明	0.010	90.7	適
実施例 52	2mM リン酸ナトリウム	6.0	25	93.2	無色 澄明	0.049	92.7	適
実施例 53	2mM リン酸ナトリウム	6.0	10	適	無色 澄明	0.005	96.5	適
実施例 54	2mM リン酸ナトリウム	6.0	15	適	無色 澄明	0.018	95.8	適
実施例 55	2mM リン酸ナトリウム	6.0	30	適	無色 澄明	0.013	96.8	適
実施例 56	2mM リン酸ナトリウム	6.0	40	80.9	無色 澄明	0.018	97.8	適
実施例 57	2mM リン酸ナトリウム	6.0	40	適	無色 澄明	0.016	97.2	適
実施例 58	2mM リン酸ナトリウム	6.0	50	適	無色 澄明	0.045	92.8	適
実施例 59	2mM リン酸ナトリウム	6.0	10	適	無色 澄明	0.020	92.8	適
実施例 60	2mM リン酸ナトリウム	6.0	15	適	無色 澄明	0.005		適
実施例 61	2mM リン酸ナトリウム	6.0	15	適	無色 澄明	0.022		適
実施例 62	2mM リン酸ナトリウム	6.0	35	適	無色 澄明	0.015		適
実施例 63	2mM リン酸ナトリウム	6.0	50	適	無色 澄明	0.014		適

即ち、振盪可能部位における空隙部割合を50%以下とした場合には、振盪安定性において白濁を生ずることがなかったが、60%の比較例11、70%の比較例12では振盪によって白濁が生じた。また、pHを6.0とした場合には、熱安定性における残存力価は66%以上となり、総合評価が「適」である水溶液注射用製剤が調整された。

試験例 9

実施例46、64～72及び比較例10の水溶液注射用製剤について、前述の測定法1及び測定法2の測定を行い、同様に総合評価を行った。その結果は、第9表に示した。

第 9 表

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 のpH	空隙部 割合 (%)	測定 法1	測定法2			総合 評価
				残存 力価 (%)	外観	濁度	残存 力価 (%)	
比較例 10	2mM リン酸ナトリウム	7.3	10	不適	無色 澄明	0.012		不適
実施例 46	2mM リン酸ナトリウム	6.0	10	86.5	無色 澄明	0.006	98.6	適
実施例 64	2mM リン酸ナトリウム	5.0	10	66.2	無色 澄明	0.020	87.9	適
実施例 65	2mM リン酸ナトリウム	5.5	10	75.9	無色 澄明	0.022	94.8	適
実施例 66	2mM リン酸ナトリウム	6.5	10	75.9	無色 澄明	0.013	90.9	適
実施例 67	2mM リン酸ナトリウム	7.0	10	67.2	無色 澄明	0.013	93.0	適
実施例 68	20mM リン酸ナトリウム	6.0	10	79.6	無色 澄明	0.007		適
実施例 69	200mM リン酸ナトリウム	6.0	10	74.6	無色 澄明	0.016		適
実施例 70	2mM 酢酸ナトリウム	6.0	10	92.4	無色 澄明	0.014		適
実施例 71	20mM 酢酸ナトリウム	6.0	10	88.4	無色 澄明	0.015		適
実施例 72	200mM 酢酸ナトリウム	6.0	10	91.8	無色 澄明	0.016		適

即ち、リン酸ナトリウム緩衝液あるいは酢酸ナトリウム緩衝液の濃度を2～200mMの広い濃度範囲で緩衝液濃度による影響はなく、pHが5.0～7.0の範囲にすれば、熱安定性における残存力価はすべて66%以上であった。また、空隙部割合を10%とした場合に、振盪安定性において白濁を生ずることがなく、総合評価が「適」である水溶液注射用製剤が調製された。

試験例 10

実施例46、73～82、90～92及び比較例13～15の水溶液注射用製剤について、前述の測定法1及び測定法2の測定を行い、同様に総合評価を行った。その結果は、第10表に示した。

第 10 表

	保存時の緩衝液濃度、組成	保存時のpH	界面活性剤濃度、種類	測定法1	測定法2			総合評価
				残存力価(%)	外観	濁度	残存力価(%)	
比較例13	20mMリン酸ナトリウム	7.3	なし	51.9	無色澄明	0.004	87.9	不適
実施例73	2mMリン酸ナトリウム	6.0	なし	89.1	無色澄明	0.009	94.5	適
実施例74	2mMリン酸ナトリウム	6.0	なし	84.4	無色澄明	0.014	97.8	適
実施例46	2mMリン酸ナトリウム	6.0	なし	86.5	無色澄明	0.006	98.6	適
実施例75	6mMリン酸ナトリウム	6.0	なし	適	無色澄明	0.015	89.8	適
実施例76	12mMリン酸ナトリウム	6.0	なし	適	無色澄明	0.019	95.2	適
実施例77	6mMリン酸ナトリウム	6.0	なし	69.9	無色澄明	0.042	99.4	適
実施例78	12mMリン酸ナトリウム	6.0	なし	82.2	無色澄明	0.028	101.9	適
実施例79	2mMリン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	適	無色澄明	0.004	95.6	適
実施例80	6mMリン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	適	無色澄明	0.002	96.7	適
実施例81	12mMリン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	適	無色澄明	0.002	96.9	適
実施例82	12mMリン酸ナトリウム	6.0	0.01% クレモフォールEL	適	無色澄明	0.000	94.8	適
実施例90	20mMリン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	適	無色澄明			適
実施例91	2mMリン酸ナトリウム	6.0	なし	適	無色澄明			適
実施例92	20mMリン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	適	無色澄明			適
比較例14	20mMリン酸ナトリウム	6.0	なし	適	白濁			不適

即ち、少なくとも0.1～6mg/mlの範囲で、トロンボモジュリン濃度による影響はなく、pHを6.0に調整すれば熱安定性における残存力価はすべて66%以上であった。また、空隙部割合を10～15%とした場合に、振盪安定性において白濁を生ずることがなく、総合評価が「適」である水溶液注射剤が調製された。

比較例14によれば、参考例9の可溶性トロンボモジュリンにおいても振盪安定性の問題が存在することが確認され、実施例90、91の結果によれば、参考例9の可溶性トロンボモジュリンにおいても、本発明の構成により、熱安定性および振盪安定性に優れた水溶液注射剤が調製されることが確認された。

参考例8の可溶性トロンボモジュリンを用いた実施例92において、熱安定性および振盪安定性に優れた水溶液注射剤が調製された。

試験例11

実施例1、3、79～82及び比較例6、13の水溶液注射用製剤について、下記測定法3により加速安定性(20℃保存)に関する残存力価を測定した。その結果は、第11表に示した。

10

20

30

40

第 1 1 表

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 のpH	界面活性剤 濃度、種類	測定法3 残存力価(%)		
				0カ月	3カ月	6カ月
比較例 6	20mM リン酸ナトリウム	7.3	0.01% Tween80	100	67.1	52.4
比較例 13	20mM リン酸ナトリウム	7.3	なし	100	81.8	63.2
実施例 1	0.2mM リン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	100	92.5	73.7
実施例 3	20mM 酢酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	100	97.5	80.1
実施例 79	2mM リン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	100	92.8	86.4
実施例 80	6mM リン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	100	94.4	85.6
実施例 81	12mM リン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	100	93.4	84.9
実施例 82	12mM リン酸ナトリウム	6.0	0.01% クレモフォールEL	100	94.0	82.5

即ち、20 6 ヶ月保存後、比較例 6 では 52.4 % まで、比較例 13 では 63.2 % まで力価が低下したが、実施例 1、3、79～82 は有意に安定であった。

<測定法 3> 加速安定性試験(20 で6 ヶ月間保存)

測定する水溶液注射用製剤を、20 で6 ヶ月間保存し、トロンボモジュリン力価の残存率を測定する。トロンボモジュリン力価は、測定法 1 と同様に測定する。

試験例 1 2

実施例 1、3 の水溶液注射用製剤について、下記測定法 4 により長期安定性(5 保存)に関する残存力価を測定する。トロンボモジュリン力価は測定法 1 と同様に測定する。その測定結果は、第 1 2 表に示した。

第 1 2 表

	保存時の緩衝液 濃度、組成	保存時 のpH	界面活性剤 濃度、種類	測定法3 残存力価(%)			
				0カ月	3カ月	6カ月	9カ月
実施例 1	0.2mM リン酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	100	97.3	93.1	97.9
実施例 3	20mM 酢酸ナトリウム	6.0	0.01% Tween80	100	105.3	101.5	107.6

実施例 1、3 は 5、9 ヶ月保存後も力価の低下見られなかった。

<測定法 4> 長期安定性試験(5 で9 ヶ月間保存)

測定する水溶液注射用製剤を、5 で9 ヶ月間保存し、トロンボモジュリン力価の残存率を測定する。トロンボモジュリン力価は試験例 1 と同様に測定する。

試験例 1 3

9～10 週齢のSD 系雄性ラット(日本チャールス・リバー社)の尾静脈あるいは背部皮下に、下記被験液または製剤を投与し、経時的に採血を行った。

1. 静脈内注射用被検液:

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各濃度に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 10 mM に調整し、さらに NaCl を 150 mM、ポリソルベート 80 (Tween 80) を 0.01 % となるように添加した後、pH を 7.4 に調整し、静脈内注射用被検液とした。投与量は第 1 3 表に示した通りである。

2. 皮下注射用被検液 A :

参考例 7 のトロンボモジュリンの濃度を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ の各濃度に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 10mM に調整し、さらに NaCl を 150mM 、ポリソルベート 80 (Tween 80) を 0.01% 、局方ベンジルアルコールを $40 \text{mg}/\text{ml}$ 、パラオキシ安息香酸メチルを 0.3% となるように添加した後、 pH を 7.4 に調整し、皮下注射用被検液 A とした。投与量は第 13 表に示した通りである。

3. 皮下注射用被検液 B :

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ の各濃度に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 10mM に調整し、更に NaCl を 150mM 、ポリソルベート 80 (Tween 80) を 0.01% 、局方塩酸プロカインを $40 \text{mg}/\text{ml}$ 、パラオキシ安息香酸メチルを 0.3% となるように添加した後、 pH を 7.4 に調整し、皮下注射用被検液 B とした。

4. 皮下注射用投与製剤 C :

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2mM に調整し、さらに NaCl を 150mM となるように添加した後、 pH を 6.0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ (ウエスト社製、基本組成: プロモブチルゴム) を装着した内径 6.3mm のガラス製シリンジ (ベクトン・ディッキンソン社製、 1ml ロングタイプシリンジ、針なし) に 1ml 分注し、空隙部割合が 10% となるように真空度を調整してストッパー (ウエスト社製、基本組成: プロモブチルゴム) を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。この製剤に、プランジャーロッド (ベクトン・ディッキンソン社製、 1ml ロングタイプシリンジ用、組成: ポリプロピレン) と注射針 (テルモ社製、 $26 \text{G} \times 1/2''$) を装着し、皮下注射用投与製剤 C とした。

5. 皮下注射用投与製剤 D :

参考例 7 のトロンボモジュリン濃度を $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ に、リン酸ナトリウム緩衝液濃度を 2mM に調整し、さらに NaCl を 150mM 、ポリソルベート 80 (Tween 80) を 0.01% となるように添加した後、 pH を 6.0 に調整した。この薬液を、先端部にキャップ (ウエスト社製、基本組成: プロモブチルゴム) を装着した内径 6.3mm のガラス製シリンジ (ベクトン・ディッキンソン社製、 1ml ロングタイプ、針なし) に 0.5ml 分注し、空隙部割合が 15% となるように真空度を調整してストッパー (ウエスト社製、基本組成: プロモブチルゴム) を真空打栓し、トロンボモジュリンを含有する水溶液注射用プレフィルドシリンジ製剤を調製した。この製剤に、プランジャーロッド (ベクトン・ディッキンソン社製、 1ml ロングタイプシリンジ用、組成: ポリプロピレン) と注射針 (テルモ社製、 $26 \text{G} \times 1/2''$) を装着し、皮下注射用投与製剤 D とした。

第 13 表

投与方法	被検液	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	投与液量 (ml/kg)	投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	n数
静脈内	静脈内注射用	10	1	10	3
"	"	50	"	50	"
"	"	250	"	250	"
皮下	皮下注射用被検液 A	10	1	10	3
"	"	50	"	50	"
"	"	250	"	250	"

各時点の血漿中の可溶性トロンボモジュリン濃度を酵素免疫測定法 (ELISA) にて測定し、その値を第 1 図に示した。本測定法としては、固相化抗体として R4B6 を、標識抗体として R4D1 を組み合わせた ELISA による公知の濃度測定法を実施して行なった (特開平 6 - 205692 号公報)。血漿中濃度推移より求めた薬物速度論的パラメータを第 14 表に示した。

第 1 4 表

投与方法	被検液	投与量 ($\mu\text{g/kg}$)	T _{max} (hr)	C _{max} (ng/ml)	T _{1/2} (hr)	AUC(0- ∞) ($\mu\text{g hr/ml}$)	MRT (hr)
静脈内	静脈内注射用	10	0	322.7	6.1	2.02	6.1
"	"	50	0	1346.2	7.8	10.75	7.9
"	"	250	0	6138.3	7.2	44.79	7.2
皮下	皮下注射用被検液A	10	32.2	21.4	17.4	1.06	38.4
"	"	50	23.4	140.3	19.9	7.01	38.8
"	"	250	8.3	661.5	16.7	42.67	36.6

10

第 1 4 表に示すように、皮下注射用被検液 A では、いずれの投与量においても M R T (平均滞留時間) は皮下投与の方が静脈内投与よりも大きく、加えて第 1 図から明らかなように、皮下投与が静脈内投与に比べて著しく血中濃度持続時間が長いことが判明した。また皮下投与により T 1 / 2 が 1 6 時間以上に持続され得ることが確認された。

皮下注射用被検液 B、および皮下注射用投与製剤 C、D の各投与群においても、皮下注射用被検液 A とほぼ同じ結果が得られた。これらのことより皮下投与経路は従来の静脈内投与経路に比べて有効な治療レベルを維持するための血中濃度の維持がなされることが確認された。また、皮下投与時の B A (生物学的利用率) 値はいずれの用量においても 5 0 % 以上であり、良好な吸収が認められた。

皮下投与する薬剤の p H を 3 . 0 ~ 7 . 4 としたが、特に血中濃度に変化は見られなかった。また、薬剤のイオン強度を変化させた (N a C l 濃度を 0 ~ 4 . 8 %) が、特に血中濃度に変化は見られなかった。

20

【配列表】

<110> 旭化成工業株式会社 ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA

<120> トロンボモジュリン水溶液注射剤の貯蔵・流通時の品質保持方法

<130> ASAHI-TM

<150> JP 9/281659

<151> 1997-10-15

<150> JP 9/308523

10

<151> 1997-11-11

<160> 5

<210> 1

<211> 516

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> ヒトトロンボモジュリンの部分的なアミノ酸配列

<400> 1

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

30

His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala

35 40 45

Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser

50 55 60

Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly

65 70 75 80

40

Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys

85 90 95

Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr
 100 105 110
 Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
 115 120 125
 Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu
 130 135 140
 Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val
 145 150 155 160
 Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg
 165 170 175
 Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr
 180 185 190
 Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro
 195 200 205
 Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys
 210 215 220
 Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro
 225 230 235 240
 Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys
 245 250 255
 Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala
 260 265 270
 Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
 275 280 285
 Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
 290 295 300
 Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln
 305 310 315 320

10

20

30

40

His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys	
325 330 335	
Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr	
340 345 350	
Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro	
355 360 365	10
Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr	
370 375 380	
Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu	
385 390 395 400	
Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp	
405 410 415	
Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile	20
420 425 430	
Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly	
435 440 445	
Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys	
450 455 460	
Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys	30
465 470 475 480	
Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro	
485 490 495	
Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu	
500 505 510	
Val His Ser Gly	40
515	

<211> 516

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトトロンボモジュリンの部分的なアミノ酸配列

<400> 2

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala

35 40 45

Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser

50 55 60

Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly

65 70 75 80

Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys

85 90 95

Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr

100 105 110

Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn

115 120 125

Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu

130 135 140

Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val

145 150 155 160

Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg

165 170 175

10

20

30

40

Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr
 180 185 190
 Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro
 195 200 205
 Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys
 210 215 220
 Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro
 225 230 235 240
 Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys
 245 250 255
 Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala
 260 265 270
 Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
 275 280 285
 Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
 290 295 300
 Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln
 305 310 315 320
 His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys
 325 330 335
 Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr
 340 345 350
 Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro
 355 360 365
 Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
 370 375 380
 Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu
 385 390 395 400

10

20

30

40

Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
 405 410 415
 Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
 420 425 430
 Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly
 435 440 445
 Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
 450 455 460
 Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Arg His Ile Gly Thr Asp Cys
 465 470 475 480
 Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro
 485 490 495
 Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu
 500 505 510
 Val His Ser Gly
 515

10

20

<210> 3

<211> 1548

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトトロポモジュリン遺伝子の部分的な塩基配列

<400> 3

atgcttgggg tcctggtcct tggcgcgctg gccctggccg gcctgggggt ccccgacccc 60
 gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcacg actgcttcgc gctctacccg 120
 ggccccgcga ccttcctcaa tgccagtcag atctgcgacg gactgcgggg ccacctaattg 180
 acagtgcgct cctcgggtggc tgccgatgtc atttccttgc tactgaacgg cgacggcggc 240

40

gttagccgcc ggccgctctg gatcgccctg cagctgccac ccggctgegg cgaccccaag 300
 cgccctcgggc ccctgcgcgg ctteccagtgg gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360
 aggtgggcac ggctcgacct caatggggct cccctctgcg gcccgttgtg cgtcgctgtc 420
 tccgctgctg aggccactgt gccagcgag ccgatctggg aggagcagca gtgcgaagtg 480
 aaggccgatg gcttccctctg cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540
 gagcccgggc ccgcggctgc cgccgtctcg atcacctaag gcaccccggt cgccggccgc 600
 ggagcggact tccaggcgct gccggtaggg agctccgcgg cggtaggtcc cctcggtta 660
 cagctaatgt gcaccgcgcc gcccgagcgg gtccaggggc actgggcccag ggaggcgccg 720
 ggcgcttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgcgtgcaa tgcgatccct 780
 ggggtccccc gctgccagtg ccagccggc gccgccctgc aggcagacgg gcgctcctgc 840
 accgcatccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc acttctgcgt tcccaacccc 900
 gaccagccgg gctcctactc gtgcatgtgc gagaccggct accggctggc ggccgaccaa 960
 caccggtgcg aggacgtgga tgactgcata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcgctgt 1020
 gtcaacacac agggtaggtt cgagtgccac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080
 gagtgtgtgg agcccgtagg cccgtgttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
 ctgaacaaa ctagctacct ctgcgtctgc gccgagggt tgcgcccac tccccacgag 1200
 ccgcacaggt gccagatgtt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260
 acccaggcta gctgtgagt cctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcacg 1320
 gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggcttc tgctccgggg tgtgccacaa cctccccggt 1380
 accttcgagt gcactgcgg gcccgactcg gcccttgtcc gccacattgg caccgactgt 1440
 gactccggca aggtggacgg tggcgacagc ggctctggcg agccccgcc cagcccgacg 1500
 cccggctcca ccttgactcc tccggccgtg gggctcgtgc attcgggc 1548

10

20

30

<210> 4

<211> 1548

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトトロポモジュリン遺伝子の部分的な塩基配列

<400> 4

```

atgcttgggg tcctggtcct tggcgcgctg gccctggccg gcctgggggt ccccgacccc 60
gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcacg actgcttcgc gctctaccgc 120
ggccccgcga ccttcctcaa tgccagtcag atctgcgacg gactgcgggg ccacctaatg 180
acagtgcgct cctcggtggc tgccgatgtc atttccttgc tactgaacgg cgacggcggc 240
gttggccgcc ggcgccctct gatcggccctg cagctgccac ccggctgcgg cgaccccaag 300
cgccctcgggc ccctgcgegg ctccagtggt gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360
aggtgggcac ggctegacct caatggggct cccctctgcg gcccgttgtg cgctcgctgtc 420
tccgctgtct aggccactgt gccagcgag ccgatctggg aggagcagca gtgcgaagtg 480
aaggccgatg gcttcctctg cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540
gagccccggc ccggcggtgc cgccgtctcg atcacctacg gcaccccggt cgcgccccgc 600
ggagcggact tccaggcgct gccgggtggg agctccggcg cgggtggctcc cctcggttta 660
cagctaatgt gcaccgcgcc gcccgagcg gtccaggggc actgggcccag ggaggcgccg 720
ggcgcttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgcgtgcaa tgcgatacct 780
ggggctcccc gctgccagtg cccagccggc gccgccctgc aggcagacgg gcgctcctgc 840
accgcatccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc acttctgcgt tcccaacccc 900
gaccagccgg gctcctactc gtgcatgtgc gagaccggt accggctggc ggccgaccaa 960
caccggtgcg aggacgtgga tgactgcata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcgctgt 1020
gtcaacacac aggggtggctt cgagtgccac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080
gagtgtgtgg agcccggtga cccgtgcttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
ctgaacaaaa ctgctacct ctgcgtctgc gccgagggt tcgcgcccat tccccacgag 1200
ccgcacaggt gccagatgtt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260
acccaggcta gctgtgagt ccctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcacg 1320
gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggttct tgcctcgggg tgtgccacaa cctccccggt 1380
accttcgagt gcatctgcgg gcccgactcg gcccttgccc gccacattgg caccgactgt 1440
gactccggca aggtggacgg tggcgacagc ggctctggcg agccccgcc cagcccgacg 1500
cccggtcca ccttgactcc tccggccgtg gggctcgtgc attcgggc 1548

```

10

20

30

40

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 変異用の合成DNA

<400> 5

aatgtggcgg gcaagggccg a

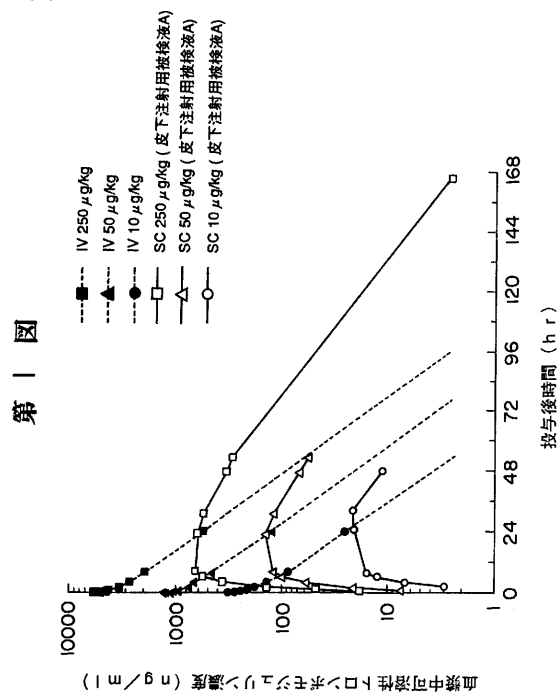
21

10

【図面の簡単な説明】

第1図はラットへ可溶性トロンボモジュリンを投与した場合の血漿中可溶性トロンボモジュリン濃度の経時変化を示すものである。なお、I Vは静脈注射を示し、S Cは皮下注射を示すものである。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 清水 啓友

静岡県富士市中丸 1 4 0 - 1 大志寮 2 0 9 号

審査官 天野 貴子

(56)参考文献 国際公開第 9 5 / 0 1 6 4 6 0 (W O , A 1)

病院薬学, 1 9 9 0 年 8 月, 第 1 6 巻 第 4 号, p . S 6 8 - S 7 2

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K38/00-58

A61K9/00-72

A61K47/00-48

JSTPlus/JMEDPlus(JDream2)

CiNii

医薬中央雑誌WEB