明　細　書

発明の名称 ： ＨＧＦ凍結乾燥製剤

技術分野

[0001] 本発明は、肝細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤に関する。

背景技術

[0002] 肝細胞増殖因子（Ｈｅｐａｔｉｃ　Ｇｒｏｗｔｈ　Ｆａｃｔｏｒ、ＨＧＦ）は、肝実質細胞の増殖活性を有する生理活性ペプチドとして多様な動物種においてその存在が確認されている。ヒトにおいては、ヒト肝細胞増殖因子（ｈＨＧＦ）が劇症肝炎患者血漿から見出されており（特許文献１）、近年では生物工学的手法により遺伝子組換えヒト肝細胞増殖因子（ｒｈＨＧＦ）の大量生産が可能となっている（非特許文献１）。これらの肝細胞増殖因子は、正常肝実質細胞を増やし肝炎や肝硬変に有効な治療、予防薬として期待されているほか、その多様な生物活性から抗癌剤の副作用で生じる腎不全や、胃や十二指腸、皮膚などの傷治癒剤としての適用も期待されている。

[0003] 肝細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤として、特許文献２には、肝細胞増殖因子にグリシン、アラニン、ソルビトール、マンニトール、またはデキストラン硫酸を安定化剤として含有する凍結乾燥製剤が開示されている。

特許文献３には、医薬として使用する際に好適である低濃度５ｍｇ／ｍＬ未満の肝細胞増殖因子製剤について、アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸などを安定化剤として含有する凍結乾燥製剤が開示されている。

特許文献４には、肝細胞増殖因子に精製白糖などを安定化剤として含有する凍結乾燥製剤が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開昭６３－２２５２６号公報

特許文献2：特開平９－２５２４１号公報

特許文献3：国際公開第２０００／０７２８７３号

特許文献4：国際公開第２００８／１０２８４９号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ｎａｔｕｒｅ，ｖｏｌ．３４２，ｐ．４４０－４４３，１９８９

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、肝細胞増殖因子の安定性を高める技術として特許文献２～４に開示される凍結乾燥製剤は、依然として、十分な保存安定性を有する肝細胞増殖因子の製剤といえるものではなかった。

また、肝細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤において、肝細胞増殖因子の不純物の生成抑制や保存前のアイソフォーム比率を維持することができる方法は知られていなかった。

[0007] 本発明が解決しようとする課題は、従来の凍結乾燥製剤に比して、肝細胞増殖因子の保存安定性が改善された凍結乾燥製剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らが、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、（１）肝細胞増殖因子、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を含有する凍結乾燥製剤とすることにより、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成した。

[0009] 本発明は以下のとおりである。

［１］

（１）肝細胞増殖因子、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロ

リン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を含有する凍結乾燥製剤。

［２］

（Ｉ）（１）肝細胞増殖因子を混合する前に、（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を少なくとも含有する水溶液をｐＨ４．５～６．５に調整して、（１）肝細胞増殖因子、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を含有する水溶液を調製する工程と、

（ＩＩ）前記（Ｉ）で得られた肝細胞増殖因子を含有する水溶液を凍結乾燥する工程と、を含む、凍結乾燥製剤の製造方法。

［３］

（１）肝細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤中、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を含有することによる、肝細胞増殖因子の安定化方法。

［４］

（１）肝細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤中、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群か

ら選ばれる１種以上の化合物を含有することにより、肝細胞増殖因子の凝集体もしくは不純物の生成を抑制、および／または保存前のアイソフォーム比率を維持する、肝細胞増殖因子の安定化方法。

［５］

（１）肝細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤中、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を含有することにより肝細胞増殖因子の凝集体生成を抑制する、肝細胞増殖因子の安定化方法。

［６］

（１）肝細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤中、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１以上の化合物を含有することにより肝細胞増殖因子の不純物生成を抑制する、肝細胞増殖因子の安定化方法。

［７］

（１）肝細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤中、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１以上の化合物を含有することにより保存前の肝細胞増殖因子のアイソフォーム比率を維持する、肝細胞増殖因子の安定化方法。

［８］

肝細胞増殖因子のアミノ酸配列が、配列番号１で示される前記［１］～［７］。

発明の効果

[0010] 本発明により、従来の凍結乾燥製剤に比して、肝細胞増殖因子の保存安定性が改善された凍結乾燥製剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]肝細胞増殖因子の不純物の代表的なクロマトグラムを示す。

[図2]肝細胞増殖因子のアイソフォームの代表的なクロマトグラムを示す。

[図3]試験例２における初期および６０℃で１か月保存した凍結乾燥製剤中の可溶性凝集体量を示す。

[図4]試験例３おける初期および６０℃で１か月保存した凍結乾燥製剤中の総不純物量を示す。

[図5]試験例４おける初期および６０℃で１か月保存した凍結乾燥製剤中のアイソフォーム中のピークＢの比率を示す。

[図6]試験例４における凍結乾燥製剤中のトレハロース含量とアイソフォーム中のピークＢの比率の関係を示す。

[図7]試験例４における凍結乾燥製剤中のアルギニン含量とアイソフォーム中のピークＢの比率の関係を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施形態に限定されるものではなく、その要旨の範囲内で種々変形して実施することができる。

[0013] 本発明の凍結乾燥製剤は、（１）肝細胞増殖因子、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物（以下、「（３）化合物」と記載する場合がある。）を含有する凍結乾燥製剤である。

[0014] 本発明に用いられる肝細胞増殖因子は、肝実質細胞を増殖させる活性を有するタンパク質であり、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば特に限定されない。例えば、特開平１１－５６３８２号公報を参照しても

よい。

肝細胞増殖因子は、哺乳類の肝臓、脾臓、および腎臓等の臓器組織や血漿および血清等の体液組織に存在する天然型のもの、あるいは天然型のアミノ酸配列および／または天然型の修飾糖鎖とは異なる改変型のものであってもよい。哺乳類は、例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ウシ、ウマ、およびヒツジ等が挙げられ、好ましくはヒトである。ヒトの肝細胞増殖因子のアミノ酸配列は、例えば、配列番号１が挙げられる。

肝細胞増殖因子は、肝臓、脾臓、および腎臓等の臓器組織ならびに血漿および血清等の体液組織から抽出し精製して得てもよく、肝細胞増殖因子を産生する細胞から単離して得てもよい。

遺伝子工学的手法により肝細胞増殖因子をコードするポリヌクレオチドを組み込んだ適当なベクターを適当な宿主細胞に導入して得てもよい。ベクターは、肝細胞増殖因子をコードするポリヌクレオチドを発現できるものであれば特に限定されない。例えば、選択マーカーとしてネオマイシン等の抗生物質に対する耐性遺伝子をもつベクターや、動物細胞において遺伝子増幅が可能なジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）やグルタミン合成酵素（ＧＳ）をコードする遺伝子を含むベクター等が挙げられるが、好ましくはｐＣＩベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ製）やｐｃＤＮＡベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製）である。宿主細胞は、当該ベクターにより形質転換され、組換え肝細胞増殖因子発現できるものであれば特に限定されない。例えば、大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞等が挙げられ、好ましくは動物細胞、特に好ましくはＣＨＯ（Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｈａｍｓｔｅｒ　Ｏｖａｒｙ）細胞である。

遺伝子工学的手法により得られる肝細胞増殖因子として、例えば、組換え肝細胞増殖因子を用いてもよいが特に限定されない。例えば、特開平３－２８５６９３号公報を参照してもよい。肝細胞増殖因子として、例えば、ＣＨＯ細胞を宿主細胞として得られる遺伝子組換えヒト肝細胞増殖因子（ｒｈＨＧＦ）を用いてもよい。

肝細胞増殖因子は、天然型のアミノ酸配列の１または複数個、好ましくは、１～１０個のアミノ酸残基が、肝細胞増殖因子としての活性を有する範囲内で、置換、欠失、付加または挿入あるいはそれらの組合せにより改良された改変型肝細胞増殖因子を用いてもよい。また、天然型のアミノ酸配列との相同性が、例えば、８０％、好ましくは８５％、より好ましくは９０％、さらに好ましくは９５％である改変型肝細胞増殖因子を用いてもよい。例えば、国際公開第９０／０１０６５１号、特開平４－０３００００号公報、特開平５－１１１３８３号公報を参照してもよい。

[0015] 凍結乾燥前における肝細胞増殖因子の濃度は、特に限定されるものではないが、例えば、５ｍｇ／ｍＬ以下、好ましくは３ｍｇ／ｍＬ以下、より好ましくは１ｍｇ／ｍＬ以下である。

[0016] 本発明の凍結乾燥製剤は、非経口投与にて患者に使用する。

経肺投与用の凍結乾燥製剤として使用する場合は、本発明の凍結乾燥製剤を用時溶解し、ネブライザーを用いて患者に投与する。

注射投与用の凍結乾燥製剤として使用する場合は、本発明の凍結乾燥製剤を用時溶解して、患者の静脈内、皮下または筋肉内等に投与する。

凍結乾燥製剤を溶解した水溶液中の肝細胞増殖因子の濃度は、特に限定されないが、例えば、５ｍｇ／ｍＬ以下で使用する。本発明の凍結乾燥製剤を溶解させる水としては、医療現場で用いられる水であれば特に限定されないが、例えば、注射用水、滅菌精製水、および生理食塩水等が挙げられる。

[0017] 本発明に用いられるトレハロースは、薬学的に許容される程度に精製されたものであれば特に限定されないが、例えば、トレハロース無水物およびトレハロース水和物等が挙げられる。トレハロース水和物としては、特に限定されないが、第十六改正日本薬局方に収載されているトレハロース水和物（トレハロース二水和物）等が挙げられる。

凍結乾燥製剤におけるトレハロースの配合量は、肝細胞増殖因子とトレハロース（以下、本段落において、トレハロース無水物の換算値で示す。）の質量比が、例えば、１：４～１：４６０、好ましくは１：４～１：３７０、

より好ましくは１：８～１：２８０である。あるいは、凍結乾燥製剤の固形分換算した全質量を１００．０質量部として、トレハロースが、例えば、２０．０～９５．０質量部、好ましくは３０．０～９４．０質量部である。また、凍結乾燥製剤を溶解して得られる１．０ｍｇ／ｍＬの肝細胞増殖因子を含有する水溶液において、例えば、トレハロースの濃度は、４．０ｍｇ／ｍＬ～４６０．０ｍｇ／ｍＬ、好ましくは８．０ｍｇ／ｍＬ～２８０．０ｍｇ／ｍＬである。

[0018] 本発明に用いられる（３）化合物は、アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる。

（３）化合物は、薬学的に許容される程度に精製されたものであれば特に限定されないが、１種を用いてもよく、２種以上を用いてもよい。

（３）化合物としては、凝集体または不純物の生成抑制の観点で、アルギニン、ヒスチジン、リジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上が好ましい。

また、（３）化合物は、塩基性物質として、アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミンが挙げられ、アルギニン、ヒスチジン、リジンから選ばれる１種以上が好ましい。 凍結乾燥製剤における（３）化合物の配合量は、凍結乾燥製剤を得る際の肝細胞増殖因子を含有する水溶液や、凍結乾燥製剤を溶解して得られる肝細胞増殖因子を含有する水溶液中において、肝細胞増殖因子が凝集することなく溶解する濃度範囲で設定することができる。

凍結乾燥製剤における（３）化合物の配合量は、肝細胞増殖因子と（３）化合物（以下、本段落において、フリー体換算値で示す。）の質量比として、例えば、１：１～１：５０、好ましくは１：１～１：４０、より好ましくは１：２～１：３５である。あるいは、凍結乾燥製剤の固形分換算した全質量を１００．０質量部として、（３）化合物の配合量は、例えば、１．５～６

０．０質量部、好ましくは３．０～５９．０質量部である。また、凍結乾燥製剤を溶解して得られる１．０ｍｇ／ｍＬの肝細胞増殖因子を含有する水溶液において、（３）化合物の配合量は、例えば、１．０ｍｇ／ｍＬ～５０．０ｍｇ／ｍＬ、好ましくは１．０ｍｇ／ｍＬ～４０．０ｍｇ／ｍＬ、より好ましくは２．０ｍｇ／ｍＬ～３５．０ｍｇ／ｍＬである。

[0019] 本発明の（３）化合物は、これらの薬学的に許容される塩でもよい。薬学的に許容される塩としては、例えば、塩酸塩、酢酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩およびマグネシウム塩などが挙げられる。

[0020] 本発明においては、（１）肝細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤において、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物をさらに含有することにより、従来の凍結乾燥製剤に比して、保存安定性を改善することができる。本発明における保存安定性とは、肝細胞増殖因子の凝集体もしくは不純物の生成抑制、および／または保存前のアイソフォーム比率の維持を意味する。

本発明は、（１）肝細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤中、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を含有することによる、肝細胞増殖因子の安定化方法である。

すなわち、本発明は、（１）肝細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤中、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を含有することにより肝

細胞増殖因子の凝集体生成を抑制する、肝細胞増殖因子の安定化方法である。

また、本発明は、（１）肝細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤中、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を含有することにより肝細胞増殖因子の不純物生成を抑制する、肝細胞増殖因子の安定化方法である。

さらに、本発明は、（１）肝細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤中、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を含有することにより保存前の肝細胞増殖因子のアイソフォーム比率を維持する、肝細胞増殖因子の安定化方法である。

[0021] 本発明における「凝集体」とは、肝細胞増殖因子の凝集物を意味し、例えば、二量体、三量体等の可溶性凝集体や相互作用により凝集した不溶性凝集体等が挙げられる。

本発明において、凝集体量の測定は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて可溶性凝集体量を測定して評価することができる。

本発明における可溶性凝集体は、例えば、凍結乾燥製剤を６０℃で１ヵ月間保存してサイズ除去クロマトグラフィーを用いて凝集体量を評価したときに、例えば、１．４％未満、好ましくは１．０％以下である。あるいは、例えば、凍結乾燥製剤を６０℃で１ヵ月間保存してサイズ除去クロマトグラフィーを用いて測定した凝集体量が、保存前の凝集体量に対して、例えば、４．６倍以下、好ましくは４倍以下、より好ましくは３．５倍以下、さらに好ましくは３倍以下である。

不溶性凝集体量の測定は、サイズが１μｍ以上の比較的大きい不溶性凝集

体については、第十六改正日本薬局方記載の不溶性微粒子試験における光遮蔽法、またはマイクロフローイメージング法等により、評価してもよく、サイズが１μｍ以下の不溶性凝集体については，光散乱法や超遠心法等により、評価してもよい。

[0022] 本発明における「不純物」とは、逆相クロマトグラフィーを用いた際に、肝細胞増殖因子以外に確認できる１以上のピークに属する１以上の物質を意味する。

不純物量は、逆相クロマトグラフィーを用いて評価する。例えば、本実施例で用いた凍結乾燥剤では、図１に示すように、保持時間１０分前後に二つのピーク（以下、それぞれ、「ＩｍｐＡ」及び「ＩｍｐＢ」という。）と、更に保持時間６～７分後付近にこれら以外の不純物（以下、「Ｏｔｈｅｒｓ ｉｍｐ」という。）を確認した。

本発明における不純物は、例えば、凍結乾燥製剤を６０℃で１ヵ月間保存して逆相クロマトグラフィーを用いて不純物量を評価したときに、例えば、１．７％以下、好ましくは１．５％以下、より好ましくは１．３％以下、さらに好ましくは１．０％以下である。あるいは、例えば、凍結乾燥製剤を６０℃で１ヵ月間保存して逆相クロマトグラフィーを用いて測定した不純物量が、保存前の不純物量に対して、例えば、９倍未満、好ましくは７倍以下、より好ましくは５倍以下、さらに好ましくは３倍以下である。

[0023] 本発明における「アイソフォーム」とは、肝細胞増殖因子の電荷変異体であり、荷電状態が異なる複数個のタンパク質を意味する。

アイソフォーム比率は、例えば、イオン交換クロマトグラフィーを用いて評価することができる。例えば、本実施例で用いた凍結乾燥製剤では、図２に示すように、保持時間３５分～４５分後に二つのピーク（以下、それぞれ、「ピークＡ」及び「ピークＢ」という。）の存在が確認された。本発明において、「アイソフォーム比率」とは、総アイソフォーム中の各アイソフォームの存在する割合のことを意味する。

[0024] 本発明における肝細胞増殖因子の生物活性は、トランスフォーミング増殖

因子β－１（ＴＧＦβ－１）存在下におけるミンク肺上皮細胞（Ｍｖ．１．Ｌｕ細胞）や４ＢＭｒ５細胞の細胞増殖をセルベースアッセイにより評価することができ（例えば、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｉｍｍｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ．　ｖｏｌ．２５８，ｐ．１－１１，２００１等を参照。）、５０％効果濃度（ＥＣ５０）で表すことができる。また、凍結乾燥製剤の保存期間中の生物活性変化は、保存前のＥＣ５０を保存後のＥＣ５０で除した相対力価（％）で表すことができる。

[0025] 凍結乾燥製剤を得る際の肝細胞増殖因子を含有する水溶液や、凍結乾燥製剤を溶解して得られる肝細胞増殖因子を含有する水溶液のｐＨを一定に保つために、凍結乾燥製剤には、緩衝剤を含有してもよい。

本発明で用いられる緩衝剤は、薬学的に許容されるものであれば特に限定されないが、例えば、リン酸、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム一水和物、クエン酸水和物、クエン酸ナトリウム水和物、クエン酸二ナトリウム、酢酸、氷酢酸、酢酸ナトリウム水和物、炭酸ナトリウム水和物、炭酸水素ナトリウム、グリシン、およびグリシルグリシン等が挙げられる。

緩衝剤は、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、および酢酸緩衝液等の一般的に用いられる緩衝液の形態で使用してもよい。

凍結乾燥製剤における緩衝剤の配合量は、凍結乾燥を実施する前の肝細胞増殖因子を含有する水溶液中の濃度として、例えば、１～１００ｍＭである。かかる濃度範囲とすることにより、凍結乾燥製剤を溶解して得られる肝細胞増殖因子を含有する水溶液とした際にも、水溶液中のｐＨを一定に保つことができる。

[0026] 肝細胞増殖因子は、ｐＨによって溶解度が変化し、等電点付近で溶解度が最小となる。そこで、等電点を考慮しつつ、凍結乾燥製剤を得る際の肝細胞増殖因子を含有する水溶液や、凍結乾燥製剤を溶解して得られる肝細胞増殖因子を含有する水溶液中において、肝細胞増殖因子が凝集することなく溶解する範囲で、ｐＨを設定してもよい。

本発明においては、例えば本実施例で使用した肝細胞増殖因子の場合、等電点である中性付近では溶解度が０．１～０．２ｍｇ／ｍＬと最小となるが、ｐＨ５付近では１．６ｍｇ／ｍＬ以上の溶解度を示すため、凍結乾燥前の水溶液および凍結乾燥製剤を溶解した水溶液のｐＨは、例えば、４．５～６．５、好ましくは５．０～６．０である。

また、本発明の肝細胞増殖因子凍結乾燥製剤の製造方法において、凍結乾燥前の水溶液のｐＨを調整するために、緩衝剤のほかにｐＨ調整剤を用いてもよい。

[0027] 本発明で用いられるｐＨ調整剤は、薬学的に許容されるものであれば特に限定されないが、例えば、塩酸、無水クエン酸、クエン酸水和物、クエン酸ナトリウム水和物、グリシン、コハク酸、酢酸、氷酢酸、酢酸ナトリウム水和物、酒石酸、水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム水和物、乾燥炭酸ナトリウム、モノエタノールアミン、トリエタノールアミン、乳酸、乳酸ナトリウム、リン酸、リン酸水素ナトリウム水和物、無水リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、無水リン酸二水素ナトリウム、結晶リン酸二水素ナトリウム、リン酸三ナトリウム、リン酸二カリウム、リン酸二水素カリウム等が挙げられる。

[0028] 凍結乾燥製剤の再溶解後に容器の材質であるガラスや樹脂への肝細胞増殖因子の吸着等による投与薬液中の肝細胞増殖因子含量の低下を防ぐために、凍結乾燥製剤には、界面活性剤を含有してもよい。

本発明で用いられる界面活性剤は、薬学的に許容されるものであれば特に限定されないが、例えば、非イオン性界面活性剤等が挙げられ、具体的には、ポリソルベート８０、ポリソルベート２０、ポロキサマー、ポリエチレングリコール、ＨＣＯ－４０、およびＨＣＯ－６０等が挙げられる。

凍結乾燥製剤における界面活性剤の配合量は、凍結乾燥製剤を溶解して得られる１．０ｍｇ／ｍＬの肝細胞増殖因子を含有する水溶液において、例えば、０．０２０～１．０ｍｇ／ｍＬ、好ましくは０．０５０～１．０ｍｇ／ｍＬ、より好ましくは０．０７５～０．５ｍｇ／ｍＬ、さらに好ましくは０

．０７５～０．２ｍｇ／ｍＬである。

[0029] 本発明における凍結乾燥製剤は、凍結乾燥製剤の固形分換算した全質量を１００．０質量部として、肝細胞増殖因子が０．１～４．５質量部、トレハロース（以下、本段落において、トレハロース無水物の換算値で示す。）が２０．０～９５．０質量部、（３）化合物（以下、本段落において、フリー体換算値で示す。）が１．５～６０．０質量部である。一実施形態としては、凍結乾燥製剤の固形分換算した全質量を１００．０質量部として、肝細胞増殖因子が０．３～４．４質量部、トレハロースが３０．０～９４．０質量部、（３）化合物が３．０～５９．０質量部である。別の一実施形態としては、肝細胞増殖因子が０．３～４．４質量部、トレハロースが３０．０～９４．０質量部、（３）化合物が３．０～５９．０質量部およびポリソルベート８０が０．０２６～０．７質量部である。

[0030] 本発明においては、凍結乾燥製剤に、必要に応じて、例えば、賦形剤、等張化剤、および酸化防止剤等の添加剤をさらに含有してもよい。

[0031] 本発明の凍結乾燥製剤の製造方法は、

（Ｉ）（１）肝細胞増殖因子を混合する前に、（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を少なくとも含有する水溶液をｐＨ４．５～６．５に調整して、（１）肝細胞増殖因子、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を含有する水溶液を調製する工程と、

（ＩＩ）前記（Ｉ）で得られた肝細胞増殖因子を含有する水溶液を凍結乾燥する工程と、を含む、凍結乾燥製剤の製造方法である。

本発明の凍結乾燥製剤は、かかる製造方法により製造することができる。

[0032] 工程（Ｉ）においては、（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を少なくとも含有する水溶液のｐＨを４．５～６．５、好ましくは５．０～６．０に調整する。

上記ｐＨ調整の前に、（２）トレハロースを含んでいてもよいが、（１）肝細胞増殖因子は含められない。すなわち、（３）化合物を少なくとも含有する水溶液をｐＨ４．５～６．５に調整した後に、（１）肝細胞増殖因子を混合するか、あるいは、（１）肝細胞増殖因子および（２）トレハロースを、同時または順番に混合する。

上記ｐＨ調整のために、緩衝剤および／またはｐＨ調整剤を利用可能である。ｐＨ調整における反応温度は特に限定されない。

上記（３）化合物を少なくとも含有する水溶液は、上記（３）化合物を溶媒に溶解することで調製される。

上記（３）化合物を少なくとも含有する水溶液を調製するための溶媒としては、例えば、薬学的に許容される水であれば特に限定されないが、注射用水および滅菌精製水等が挙げられる。

[0033] （１）肝細胞増殖因子および（２）トレハロースは、そのまま混合してもよく、水溶液形態で混合してもよい。水溶液を調製するための溶媒としては、（３）化合物を少なくとも含有する水溶液を調製するための溶媒と同一の溶媒を用いてもよく、異なる溶媒を用いてもよい。（１）肝細胞増殖因子および（２）トレハロースの混合における温度は特に限定されない。

[0034] 工程（１）においては、必要に応じて、界面活性剤、その他の添加剤（賦形剤、等張化剤、および酸化防止剤等）等を混合してもよい。

[0035] 工程（ＩＩ）は、前記（Ｉ）で得られた肝細胞増殖因子を含有する水溶液を凍結乾燥する工程である。

肝細胞増殖因子を含有する水溶液の凍結乾燥は、肝細胞増殖因子を含有する水溶液をバイアルまたはアンプルに注入して通常の方法で行うことができ

る。

肝細胞増殖因子を含有する水溶液を、フィルター等で濾過滅菌し凍結乾燥することが好ましい。

凍結乾燥する方法としては、例えば、常圧下で冷却凍結する凍結過程、溶質に拘束されない自由水を減圧下で昇華乾燥する１次乾燥過程、溶質固有の吸着水や結晶水を除去する２次乾燥過程の３つの単位操作による方法等が挙げられる（参照として、Ｐｈａｒｍ．　Ｔｅｃｈ．　Ｊａｐａｎ，ｖｏｌ．８，ｎｏ．１，ｐ．７５－８７，１９９２等が挙げられる）。

凍結過程における冷却温度は、例えば、－４０℃以下であり、一次乾燥過程における温度は、例えば、－２０℃～１０℃であり、二次乾燥過程における温度は、例えば、２０℃～３０℃である。減圧時の圧力は、例えば、１０Ｐａ以下である。

[0036] 本発明において「ケーキ」とは、凍結乾燥製剤中の多孔質の固形物を意味する。凍結乾燥製剤の性状は、ケーキの多孔質構造や色の目視観察、あるいは、凍結乾燥製剤の水への溶解性または溶解後の水溶液の目視観察により評価することができる。

本発明の凍結乾燥製剤は、通常、良好な白色のケーキであり、また、水への溶解が速やかであり、溶解後は無色澄明の水溶液となる。

一方、本発明を用いない凍結乾燥製剤の場合には、溶解後の水溶液で、肝細胞増殖因子等に由来する不溶性凝集物の生成によるものと考えられる白濁が観察されることがある。つまり、凍結乾燥製剤を溶解して得られる水溶液の状態は、不溶性凝集物の生成の一つの指標となり得る。凍結乾燥製剤の保存後の上記水溶液が澄明な状態は、不溶性凝集物の生成が抑制されたことを意味する。

実施例

[0037] 以下、本発明を実施例によって、さらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって何ら制限されるものではない。

[0038] 本実施例では肝細胞増殖因子として特開平１１－０５６３８２号公報に記

載のアミノ酸配列情報をもとに遺伝子を完全合成してベクターに組み込みＣＨＯ細胞で発現させて単離、精製したものを使用した。

[0039] （実施例１～２５および比較例１～７）

実施例および比較例の凍結乾燥製剤を以下に示す方法により調製した。表１～４は肝細胞増殖因子含有水溶液１ｍＬ中の成分の配合量（ｍｇ）を示す。なお、表中の数値は小数点第二位を四捨五入して小数点第一位まで表示したものである。肝細胞増殖因子含有水溶液は、容量１００ｍＬから２５０ｍＬスケールの範囲で調製した。

[0040]

[表1]

	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	比較例1	比較例2	比較例3	比較例4	比較例5	比較例6
肝細胞増殖因子	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1
トレハロース二水和物	100.0	100.0	100.0	100.0	—	—	—	—	—	—
キシリトール	—	—	—	—	100.0	—	—	—	—	—
スクロース	—	—	—	—	—	100.0	—	—	—	10.0
ソルビトール	—	—	—	—	—	—	100.0	—	—	—
マンニトール	—	—	—	—	—	—	—	100.0	—	—
L－アルギニン	17.4	—	—	—	17.4	17.4	17.4	17.4	17.4	—
L－ヒスチジン	—	15.5	—	—	—	—	—	—	—	—
L－リジン	—	—	14.6	—	—	—	—	—	—	—
メグルミン	—	—	—	19.5	—	—	—	—	—	—
L－アラニン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5.0
塩化ナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	9.0	18.0
クエン酸一水和物	2.1									
ポリソルベート８０	0.1									0.3

[0041] [表2]

	実施例5	実施例6	実施例7	実施例8	実施例9	実施例10	実施例11
肝細胞増殖因子	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
トレハロース二水和物	100.0						
Ｌ－アルギニン	4.2	－	－	－	－	－	－
Ｌ－アルギニン塩酸塩	16.0	－	－	－	－	－	－
グルタミン酸ナトリウム	－	18.7	－	－	－	－	－
アスパラギン酸ナトリウム	－	－	17.7	－	－	－	－
プロリン	－	－	－	11.5	－	－	－
クレアチン	－	－	－	－	14.9	－	－
クレアチニン	－	－	－	－	－	11.3	－
トリスヒドロキシメチルアミノメタン	－	－	－	－	－	－	12.1
クエン酸一水和物	2.1						
ポリソルベート８０	0.1						

[0042] [表3]

	実施例12	実施例13	実施例14	実施例15	実施例16	実施例17	実施例18
肝細胞増殖因子	0.5	1.0	3.1	5.1	1.1	1.0	1.0
トレハロース二水和物	100.0	100.0	100.0	100.0	10.0	25.0	50.0
Ｌ－アルギニン	5.5	6.8	12.1	17.4	4.2	4.2	4.2
Ｌ－アルギニン塩酸塩	14.4	12.8	6.4	－	16.0	16.0	16.0
クエン酸一水和物	2.1						
ポリソルベート８０	0.1						

[0043] [表4]

	実施例19	実施例20	実施例21	実施例22	実施例23	実施例24	実施例25	比較例7
肝細胞増殖因子	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
トレハロース二水和物	150.0	200.0	250.0	300.0	100.0	100.0	100.0	-
L－アルギニン	4.2	4.2	4.2	4.2	3.5	8.7	26.1	4.2
L－アルギニン塩酸塩	16.0	16.0	16.0	16.0	-	-	-	16.0
クエン酸一水和物	2.1							
ポリソルベート８０	0.1							

[0044] ＜混合用緩衝液の調製＞

肝細胞増殖因子含有水溶液の容量および表１～４に記載の濃度に従って、肝増殖因子およびポリソルベート８０以外の成分と、適量の注射用水（肝細

胞増殖因子含有水溶液の容量のおよそ８０％の容量）を混合し、攪拌した。目視にて溶解を確認後、塩酸および／または水酸化ナトリウムを用いてｐＨを５．５に調整し、注射用水で容量調整して混合用緩衝液を得た。

＜肝細胞増殖因子含有水溶液の調製＞

肝細胞増殖因子含有水溶液は、以下の手順で調製した。

（ａ）肝細胞増殖因子含有水溶液は、上記混合用緩衝液を用いて限外ろ過等を行い、表１に記載の肝細胞増殖因子の濃度に調製した。この際、肝細胞増殖因子の濃度は、紫外可視分光光度計で２８０ｎｍにおける吸光度（光路長１ｃｍセルを使用）を測定し、下記（Ａ）式により算出した。

タンパク質濃度（ｍｇ／ｍＬ）＝（Ａ２８０／１．７３）×Ｄ　　（Ａ）

Ａ２８０：２８０ｎｍにおける吸光度

１．７３：０．１％濃度試料溶液を光路長１ｃｍ、２８０ｎｍで測定した場合の吸光度の理論値

Ｄ：測定時の希釈倍率

（ｂ）その後、表１に記載の目的濃度となるようにポリソルベート８０を添加し、無菌ろ過フィルター（製品名：ＭＩＬＬＥＸ　ＧＶ　０．２２μｍフィルター、ミリポア社製）でろ過して、肝細胞増殖因子含有水溶液を得た。

＜凍結乾燥工程＞

肝細胞増殖因子含有水溶液を５ｍＬのガラスバイアルに１ｍＬずつ充填し、ゴム栓で半打栓した。表５に記載のプログラムにて凍結乾燥を実施し、凍結乾燥後にゴム栓を完全に打栓した。さらに、ガラスバイアルにアルミキャップを取り付け、凍結乾燥製剤を得た。

比較例５は、国際公開第２０００／０７２８７３号（特許文献４）に開示される製剤に準じて製造した凍結乾燥製剤である。また、比較例６は、国際公開第２００８／１０２８４９号（特許文献５）に開示される製剤に準じて製造した凍結乾燥製剤である。

[0045]

[表5]

	凍結	凍結保持	降圧	昇温	一次乾燥	昇温	二次乾燥
温度（℃）	室温→-40	-40	-40	-40→-20	-20	-20→20	20
圧力（Pa）	常圧	常圧	常圧→10	10	10	10	10
時間（h）	1.5	4	1	2	48	8	48

[0046]（試験例１）

得られた実施例１～１１および比較例１～６の凍結乾燥製剤について、凍結乾燥製剤の性状、凍結乾燥製剤の注射用水への溶解性と、溶解後の水溶液の性状について以下のとおり試験した。

＜方法＞

得られた凍結乾燥製剤は、１０００～３０００ｌｕｘ環境の白色及び黒色背景で、外観（ケーキの形成および色調）を目視で観察した。その後、各凍結乾燥製剤を１ｍＬの注射用水を添加して静置し、凍結乾燥製剤の溶解性および得られた溶液の色を目視で観察した。

表６中の「瞬時」とは、１分以内に完全に溶解したことを意味し、「溶けづらい」とは、１分を超えても、完全には溶解しなかったことを意味する。

[0047] ＜結果＞

実施例１～４および比較例１～６の各試料の結果を表６に示す。実施例１～４は、白色のケーキを形成し良好な溶解性を示した。キシリトールを含む比較例１およびソルビトールを含む比較例３では、ケーキは形成されておらず、白色または無色の溶融した固形物であった。また、糖類を含まない比較例５では、白色の固形物であったが、一般的な凍結乾燥製剤で認められるケーキが形成されていなかった。また、実施例５～１１については、実施例１～４と同様に、白色のケーキを形成し良好な溶解性を示した。

[0048] [表6]

	ケーキの形成	ケーキの色	溶解性	溶液の色
実施例1	良好	白	瞬時	澄明
実施例2	良好	白	瞬時	澄明
実施例3	良好	白	瞬時	澄明
実施例4	良好	白	瞬時	澄明
比較例1	未形成	無色	溶けづらい	澄明
比較例2	良好	白	瞬時	澄明
比較例3	未形成	白	溶けづらい	澄明
比較例4	良好	白	瞬時	澄明
比較例5	未形成	白	瞬時	澄明
比較例6	良好	白	瞬時	澄明

[0049] 得られた凍結乾燥製剤について、２５℃、４０℃、または６０℃の恒温槽で、２週間または１ヶ月間保存し、以下の試験を行った。

[0050] （試験例２）

実施例１～２５および比較例１～７の可溶性凝集体量を以下のとおり評価した。

＜方法＞

実施例および比較例の凍結乾燥製剤に１ｍＬの注射用水を加えて氷冷下で溶解後、緩やかに振とう均一化し、５分間放置した。得られた溶液を２５０μＬバイアルインサートに分注し、ＨＰＬＣバイアルに封入したものを試料とした。

各試料について、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて、保存前後での可溶性凝集体量を以下の分析条件で測定し、面積百分率法により可溶性凝集体量を算出した。

検出器：ＵＶ２８０ｎｍ

カラム：ガードカラム（商品名：ＴＳＫｇｅｌ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ、東ソー社製）

カラム温度：３０℃

移動相：リン酸二水素ナトリウム二水和物３９ｇ、塩化ナトリウム８７．５ｇ、ラウリル硫酸ナトリウム５．０ｇを水５０００ｍＬに溶解し、２ｍｏｌ／Ｌ水酸化ナトリウム溶液でｐＨ７．５に調整したもの

試料注入量：５０μＬ

流量：１ｍＬ／ｍｉｎ

[0051] ＜結果＞

保存条件として、初期（保存前）と２５℃、４０℃、または６０℃でそれぞれ２週間または１ヶ月間保存した各試料における可溶性凝集体量の測定結果を表７～９に示す。また、実施例１～４および比較例１～６の初期および６０℃で１ヶ月保存した各試料における可溶性凝集体量の測定結果を図３に示す。さらに、凍結乾燥製剤中のトレハロースの含量と可溶性凝集体量の関係を表１０に示す。

[0052] 表７より、比較例１～６では、保存期間及び保存温度の増大に伴って可溶性凝集体量は増加し、６０℃で１ヵ月保存すると顕著に可溶性凝集体量が増

加した。

一方、表７および表８より、実施例１～１１では、試験した保存条件下において比較例のような顕著な変化は認められなかった。つまり、実施例１～１１では、６０℃での保存条件下においても可溶性凝集体の生成が抑制された。

[0053] 表９および表１０より、トレハロースを含まない比較例７では、可溶性凝集体量が顕著に増加した。

一方、肝細胞増殖因子の含量を変化させた実施例１２～１５、および、アルギニン量の含有量を変化させた実施例２３～２５では、可溶性凝集体量に顕著な変化は認められなかった。

[0054] [表7]

	凝集体量（%）						
	初期	2週間保存			1ヵ月保存		
		25°C保存	40°C保存	60°C保存	25°C保存	40°C保存	60°C保存
実施例1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3
実施例2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
実施例3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.4
実施例4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.8
比較例1	0.3	0.6	1.1	26.4	0.8	1.6	44.1
比較例2	0.3	0.3	0.3	0.6	0.3	0.3	1.4
比較例3	0.3	0.3	0.7	11.5	0.4	0.9	21.5
比較例4	0.3	0.3	0.3	1.9	0.3	0.4	5.6
比較例5	0.3	0.3	0.4	1.9	0.4	0.4	3.1
比較例6	0.4	0.8	1.1	6.8	1.0	1.4	18.4

[0055]

[表8]

	凝集体量（%）	
	初期	60°C／2週間保存
実施例5	0.2	0.2
実施例6	0.2	0.3
実施例7	0.3	0.3
実施例8	0.2	0.2
実施例9	0.2	0.3
実施例10	0.2	0.2
実施例11	0.2	0.3

[0056] [表9]

	凝集体量（%）			
	初期	1ヵ月保存		
		25°C保存	40°C保存	60°C保存
実施例12	0.3	0.2	0.2	0.2
実施例13	0.2	0.2	0.2	0.2
実施例14	0.2	0.3	0.2	0.2
実施例15	0.2	0.2	0.3	0.3
実施例16	0.2	0.2	0.2	0.6
実施例17	0.2	0.2	0.2	0.4
実施例18	0.2	0.2	0.3	0.2
実施例19	0.2	0.3	0.2	0.3
実施例20	0.2	0.2	0.2	0.2
実施例21	0.2	0.2	0.2	0.2
実施例22	0.2	0.2	0.2	0.2
実施例23	0.2	0.2	0.3	0.3
実施例24	0.2	0.3	0.2	0.3
実施例25	0.3	0.2	0.2	0.2
比較例7	0.2	0.2	0.2	1.5

[0057]

[表10]

	トレハロース濃度 (mg/mL)	凝集体量（%）			
		初期	1ヵ月保存		
			25℃保存	40℃保存	60℃保存
比較例7	0	0.2	0.2	0.2	1.5
実施例16	10	0.2	0.2	0.2	0.6
実施例17	25	0.2	0.2	0.2	0.4
実施例18	50	0.2	0.2	0.3	0.2
実施例13	100	0.2	0.2	0.2	0.2
実施例19	150	0.2	0.3	0.2	0.3
実施例20	200	0.2	0.2	0.2	0.2
実施例21	250	0.2	0.2	0.2	0.2
実施例22	300	0.2	0.2	0.2	0.2

[0058]（試験例３）

実施例１～２５および比較例１～７の不純物量を以下のとおり評価した。

＜方法＞

可溶性凝集体量の評価において作成したＨＰＬＣバイアルに封入したものを試料とした。

各試料について、逆相クロマトグラフィーを用いて、保存前後での不純物量を以下の分析条件で測定し、面積百分率法により不純物量を算出した。

検出器：ＵＶ２１５ｎｍ

カラム：逆相カラム（商品名：Ｉｎｅｒｔｓｉｌ　ＷＰ３００－Ｃ８、ジーエルサイエンス社製）にＧＬカートガードカラムを付属したもの

カラム温度：４０℃

移動相Ａ：水／トリフルオロ酢酸（１０００：１）

移動相Ｂ：アセトニトリル／トリフルオロ酢酸（１０００：０．８５）

試料注入量：２５μＬ

流量：１ｍＬ／ｍｉｎ

グラジエント条件：移動相Ａと移動相Ｂのトータル量に対する移動相Ｂの体積比率として、１５％（Ｉｎｉｔｉａｌ）－７０％（２７．５ｍｉｎ）－７

０％（３０ｍｉｎ）－１５％（３０．０１ｍｉｎ）－１５％（３５ｍｉｎ）

[0059] ＜結果＞

保存条件として、初期（保存前）と２５℃、４０℃、または６０℃でそれぞれ２週間または１ヶ月間保存した実施例１～１１および比較例１～６の各試料の不純物量の測定結果を表１１および表１２に示す。また、初期および６０℃で１ヶ月保存した実施例１～４および比較例１～６の各試料における総不純物量の測定結果を図４に示す。

[0060] 表１１より、実施例１～４では、２５℃、または４０℃の保存条件下において総不純物量が実質的に変化しなかった。また、表１１および表１２より、実施例１～１１では、６０℃での保存条件下においても、総不純物量は、せいぜい、初期に対して２倍の増加であったのに対して、比較例の全ての処方においては、およそ１０倍近く、または、それ以上の増加を示した。なお、６０℃保存条件下では、比較例の全ての処方において、ＩｍｐＡ、ＩｍｐＢ、およびＯｔｈｅｒｓ　ｉｍｐのうちの何れかが増大することが確認された。つまり、実施例１～１１では、６０℃での保存条件下においても不純物の生成が抑制された。

なお、実施例１２～２５では、いずれの保存条件においても総不純物量の顕著な変化は認められなかった。

[0061]

[表11]

	総不純物量（%）						
	初期	2週間保存			1ヵ月保存		
		25°C保存	40°C保存	60°C保存	25°C保存	40°C保存	60°C保存
実施例1	0.18	0.19	0.19	0.36	0.20	0.20	0.32
実施例2	0.31	0.33	0.34	0.55	0.33	0.35	0.55
実施例3	0.20	0.28	0.21	0.41	0.61	0.23	0.32
実施例4	0.19	0.20	0.21	0.42	0.20	0.20	0.47
比較例1	0.23	0.51	0.74	2.34	0.38	0.50	4.31
比較例2	0.20	0.19	0.68	0.95	0.19	0.21	2.25
比較例3	0.19	0.21	0.31	1.42	0.28	0.48	2.40
比較例4	0.19	0.20	0.48	0.89	0.29	0.31	1.71
比較例5	0.22	0.35	0.43	1.02	0.23	0.49	2.69
比較例6	0.91	1.58	1.75	2.86	1.84	2.11	3.56

[0062] [表12]

	総不純物量（%）	
	初期	60°C／2週間保存
実施例5	0.21	0.38
実施例6	0.20	0.41
実施例7	0.21	0.34
実施例8	0.21	0.36
実施例9	0.20	0.38
実施例10	0.21	0.39
実施例11	0.20	0.39

[0063] （試験例４）

実施例１～２５および比較例１～７の各アイソフォーム比率を以下のとおり評価した。

＜方法＞

凝集体量の評価において作成したＨＰＬＣバイアルに封入したものを試料とした。

各試料について、イオン交換クロマトグラフィーを用いて、保存前後での

アイソフォーム量を以下の分析条件で測定し、面積百分率法により各アイソフォーム比率を算出した。

検出器：ＵＶ２１５ｎｍ

カラム：商品名：Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｂｉｏ　ＳＣＸ　ＮＰ５　ＰＫ、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製

カラム温度：３０℃

移動相Ａ：５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ９．０）

移動相Ｂ：５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ９．０）、１ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ

試料注入量：５０μＬ

流量：０．５ｍＬ／ｍｉｎ

グラジエント条件：移動相Ａと移動相Ｂのトータル量に対する移動相Ｂの体積比率として、２０％（Ｉｎｉｔｉａｌ）－６０％（５０ｍｉｎ）－８０％（５１ｍｉｎ）－８０％（６０ｍｉｎ）－２０％（６０．０１ｍｉｎ）－２０％（８０ｍｉｎ）

[0064] ＜結果＞

保存条件として、初期（保存前）と２５℃、４０℃、または６０℃下でそれぞれ２週間または１ヶ月間保存した各試料のアイソフォームの変化の測定結果をピークＡとピークＢ中のピークＢの比率として表１３～１５に示す。また、初期および６０℃で１ヶ月保存した実施例１～４および比較例１～６の各試料におけるアイソフォーム比率の変化の測定結果をピークＢの比率として図５に示す。さらに、凍結乾燥製剤中のトレハロース含量とピークＢの比率の関係を図６、アルギニン含量とピークＢの比率の関係を図７に示す。

[0065] 表１３および表１４より、実施例１～１１及び比較例５では、試験した保存条件下においてピークＢのアイソフォーム比率がほとんど変化しなかったのに対して、その他の比較例では６０℃保存条件下において顕著にピークＢのアイソフォーム比率が変化することが認められた。つまり、実施例１～１１では、６０℃での保存条件下においてもアイソフォーム比率の変化が抑制

された。なお、比較例１では、保存による変化が顕著であり、ピークＡのアイソフォームが消失し、ピークＢのみがアイソフォームとして検出されたほか、アイソフォームではないピークを確認した。

[0066] 図６より、製剤中のトレハロースの含量の増大に伴って、ピークＢのアイソフォーム比率は減少するのが認められた。同様に、製剤中のトレハロースを含まない比較例７においてもピークＢのアイソフォーム比率が減少するのが認められた。

また、図７より、６０℃、１ヵ月の保存条件下において、製剤中のアルギニン含量の減少に伴ってピークＢのアイソフォーム比率が低下するのが認められた。

一方、製剤中の肝細胞増殖因子の含量の変化によるアイソフォーム比率の変化は認められなかった。

[0067] [表13]

	ピークBの比率（%）						
	初期	2週間保存			1ヵ月保存		
		25℃保存	40℃保存	60℃保存	25℃保存	40℃保存	60℃保存
実施例1	90.59	90.10	90.89	89.81	90.87	90.87	90.68
実施例2	90.62	90.60	90.89	90.24	90.96	90.96	90.51
実施例3	91.51	90.22	90.79	91.09	91.04	91.21	90.70
実施例4	90.69	90.84	90.58	90.59	91.08	91.05	90.70
比較例1	90.28	90.74	89.79	85.37	89.94	90.06	100.00
比較例2	90.82	90.89	90.62	90.07	90.71	90.78	88.93
比較例3	90.53	90.99	90.84	88.44	90.75	90.52	84.56
比較例4	90.75	91.43	90.57	89.80	90.38	90.89	86.08
比較例5	91.22	90.72	90.40	90.37	90.27	90.86	90.35
比較例6	91.17	90.40	90.54	90.24	90.66	91.45	83.05

[0068]

[表14]

	ピークBの比率（%）	
	初期	60°C／2週間保存
実施例5	89.95	89.76
実施例6	89.89	89.89
実施例7	89.57	89.82
実施例8	90.00	89.35
実施例9	90.23	89.73
実施例10	89.70	89.96
実施例11	90.04	90.12

[0069] [表15]

	ピークBの比率（%）			
	初期	1ヵ月保存		
		25°C保存	40°C保存	60°C保存
実施例12	90.09	89.94	90.38	89.66
実施例13	90.18	89.97	90.35	89.88
実施例14	89.71	90.20	90.26	89.76
実施例15	89.71	90.00	90.20	89.86
実施例16	90.59	90.44	90.79	90.55
実施例17	90.28	90.38	90.54	90.45
実施例18	90.15	90.19	90.15	90.49
実施例19	89.87	89.97	90.09	90.07
実施例20	89.76	90.02	89.90	89.54
実施例21	89.68	89.63	89.76	89.83
実施例22	89.51	89.72	89.61	89.29
実施例23	90.02	90.26	89.98	88.68
実施例24	90.35	89.95	90.17	89.34
実施例25	90.12	90.30	90.34	89.93
比較例7	90.05	90.37	90.65	89.77

[0070] （試験例５）

実施例１～２５および比較例１～７の不溶性凝集体量を以下のとおり評価した。

＜方法＞

各凍結乾燥製剤を１ｍＬの注射用水を添加して静置し，注射用水または各プラセボ水溶液を用いて希釈したものを試料とした。各試料について、フロー式粒子像分析装置を用いて、保存前後での不溶性微粒子数を測定し、下記式により算出することで不溶性微粒子数を算出した。

微粒子数（個／バイアル）＝Ｐ×１０００×Ｖ／（ｎ×ｖ）

Ｐ：検出粒子数

Ｖ：試料溶液の容量（ｍＬ）

ｎ：測定回数

ｖ：１測定あたり試料容量

[0071] ＜結果＞

初期（保存前）と６０℃でそれぞれ２週間または１ヶ月間保存した実施例１～１１および比較例１～６の各試料の不溶性凝集体量の測定結果を表１６および表１７に示す。

[0072] 表１６より、比較例１～６は、６０℃で１ヵ月保存すると不溶性凝集体量が増加した。一方、表１６および表１７より、実施例１～１１では、比較例のような顕著な変化は認められなかった。つまり、実施例１～１１では、６０℃、１ヵ月の保存条件下においても不溶性凝集体の生成が抑制された。なお、実施例１２～２５においては不溶性凝集体量に顕著な変化は認められなかった。

[0073]

[表16]

	不溶性微粒子数（個/バイアル）					
	＜10μm		≧10μm		≧25μm	
	初期	60℃／1ヵ月保存	初期	60℃／1ヵ月保存	初期	60℃／1ヵ月保存
ネガティブコントロール	6786	-	143	-	0	-
実施例1	13929	9286	333	190	0	0
実施例2	7857	3929	143	95	0	48
実施例3	7143	12143	286	333	95	48
実施例4	19643	6429	381	0	95	0
比較例1	18571	390000	333	87524	190	49857
比較例2	15357	7857	286	1095	48	333
比較例3	30000	7392857	381	1476	0	48
比較例4	28929	334643	238	70286	0	24176
比較例5	11071	66786	143	143	48	0
比較例6	3214	5153214	238	197238	48	18524

[0074] [表17]

	不溶性微粒子数（個/バイアル）					
	＜10μm		≧10μm		≧25μm	
	初期	60℃／2週間保存	初期	60℃／2週間保存	初期	60℃／2週間保存
実施例5	714	357	0	0	0	0
実施例6	714	357	48	48	0	0
実施例7	2143	0	95	0	48	0
実施例8	1071	357	0	0	0	0
実施例9	714	1786	95	48	95	0
実施例10	1429	357	0	190	0	48
実施例11	357	357	48	0	0	0

[0075] （試験例６）

実施例１、比較例５および比較例６の生物活性を以下のとおり評価した。

＜方法＞

ミンク肺上皮細胞（Ｍｖ．１．Ｌｕ細胞）を培養し、細胞生存率を確認後、１×１０^{5}個／ｍＬとなるよう細胞溶液を調製した。トランスフォーミング増殖因子β－１（ＴＧＦβ－１）溶液を９６穴アッセイプレートの各ウェル

に添加し、肝細胞増殖因子濃度として０．１２５、０．２５、０．５、１、２、４、８、１６、３２、６４および１２８ｎｇ／ｍＬとなるよう試料溶液を添加する。その後、１×１０^{5}個／ｍＬの細胞溶液を添加し、５％炭酸ガスインキュベータにおいて、３７℃で６９時間インキュベーションした。さらに、Ｄｏｊｉｎｄｏ社製Ｃｅｌｌ ｃｏｕｎｔｉｎｇ ｋｉｔを１０μＬずつ添加して３時間インキュベートし、４５０ｎｍにおける吸光度を測定した。

解析は、試料中のＨＧＦ濃度（横軸）に対して得られた吸光度を縦軸にプロットし、解析ソフト（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｄｅｖｉｃｅ社製ＳｏｆｔＭａｘＰｒｏ）を用いて、Ｐａｒａｌｌｅｌ Ｌｉｎｅ Ａｎａｌｙｓｉｓおよび４ Ｐａｒａｍｅｔｅｒ ｌｏｇｉｓｔｉｃ ａｎａｌｙｓｉｓにより試料のＥＣ５０を算出した。各試料の保存前のＥＣ５０を保存後のＥＣ５０で除し、相対力価（％）を算出した。

[0076] ＜結果＞

６０℃で１ヶ月間保存した実施例１、比較例５および６の各試料のＥＣ５０の相対力価を表１８に示す。

[0077] 表１８より、比較例５および６は、６０℃で１ヵ月保存すると相対力価の低下が認められた。

一方、実施例１では、相対力価の低下は認められず、６０℃、１ヵ月の保存条件下においても生物活性を維持することが示された。

[0078] [表18]

	実施例1	比較例5	比較例6
相対力価（%）	101	80	45

産業上の利用可能性

[0079] 本発明の凍結乾燥製剤は、医療現場へ高品質な肝細胞増殖因子の製剤を供給することができる点で、産業上の利用可能性を有する。

配列表フリーテキスト

[0080] 配列番号１は、ヒトの肝細胞増殖因子のアミノ酸配列を示す。

請求の範囲

[請求項1] （１）肝細胞増殖因子、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を含有する凍結乾燥製剤。

[請求項2] （Ｉ）（１）肝細胞増殖因子を混合する前に、（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を少なくとも含有する水溶液をｐＨ４．５～６．５に調整して、（１）肝細胞増殖因子、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を含有する水溶液を調製する工程と、

（ＩＩ）前記（Ｉ）で得られた肝細胞増殖因子を含有する水溶液を凍結乾燥する工程と、を含む、凍結乾燥製剤の製造方法。

[請求項3] （１）肝細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤中、（２）トレハロース、ならびに（３）アルギニン、ヒスチジン、リジン、メグルミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、クレアチン、クレアチニン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよびこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる１種以上の化合物を含有することによる、肝細胞増殖因子の安定化方法。

[請求項4] 肝細胞増殖因子の凝集体生成を抑制する、請求項３に記載の肝細胞増殖因子の安定化方法。

[請求項5] 肝細胞増殖因子の不純物生成を抑制する、請求項３に記載の肝細胞

増殖因子の安定化方法。

[請求項6] 保存前の肝細胞増殖因子のアイソフォーム比率を維持する、請求項３に記載の肝細胞増殖因子の安定化方法。