

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5704918号
(P5704918)

(45) 発行日 平成27年4月22日(2015.4.22)

(24) 登録日 平成27年3月6日(2015.3.6)

(51) Int. Cl.		F I	
CO7K	1/18	(2006.01)	CO7K 1/18
CO7K	1/34	(2006.01)	CO7K 1/34
CO7K	14/745	(2006.01)	CO7K 14/745
CO7K	14/755	(2006.01)	CO7K 14/755

請求項の数 6 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2010-522422 (P2010-522422)	(73) 特許権者	511216008
(86) (22) 出願日	平成20年8月28日 (2008.8.28)		ラボラトワール フランセ デュ フラク
(65) 公表番号	特表2010-537960 (P2010-537960A)		ショヌマン エ デ ビオテクノロジー
(43) 公表日	平成22年12月9日 (2010.12.9)		フランス国 91940 レ ジュリス
(86) 国際出願番号	PCT/FR2008/051543		アヴニュ デ トロピク 3 ゼドアー
(87) 国際公開番号	W02009/030866		ドゥ クルタブフ
(87) 国際公開日	平成21年3月12日 (2009.3.12)	(74) 代理人	100092277
審査請求日	平成23年8月26日 (2011.8.26)		弁理士 越場 隆
(31) 優先権主張番号	0757266	(72) 発明者	ブル, ミシエル
(32) 優先日	平成19年8月30日 (2007.8.30)		フランス国 59136 ワヴラン リュ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(72) 発明者	ボンネル, パトリック
前置審査			フランス国 59000 リール リュ
			カン 25

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 第V I I I 因子およびフォンビルブランド因子の精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 第 V I I I 因子 (F V I I I) とフォンビルブランド因子 (F v W) との混合物を含む溶液および (i i) フォンビルブランド因子 (F v W) を含む溶液の中から選択される溶液からフォンビルブランド因子 (F v W) を精製する方法において、

下記 (a) と (b) の工程から成ることを特徴とする方法：

(a) イオン交換クロマトグラフィ濾過-タイプメンブレンで F v W を吸着する工程、この場合、上記濾過-タイプメンブレンはポリエーテルスルホン型強陰イオン交換体であり

、
(b) 上記イオン交換クロマトグラフィ濾過-タイプメンブレンの溶出緩衝剤のイオン強度値を増加させてフォンビルブランド因子 (F v W) を溶出させる工程。

【請求項 2】

上記イオン交換クロマトグラフィ濾過-タイプメンブレンが第四級アミン基を有する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

上記イオン交換クロマトグラフィ濾過-タイプメンブレンがマクロポラス-タイプのメンブレンである請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

上記溶液が血漿由来のものである請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

10

20

上記溶液が血漿からの冷凍沈殿物である請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法を実行することを特徴とする精製された F V W の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬品の活性薬剤として使用するために第 V I I I 因子およびフォンビルブランド (Von Willebrand) 因子を精製する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

第 V I I I 因子 (下記単に F V I I I) はヒトの血漿中に低濃度で存在する血漿タンパクで、これが凝固カスケードのキーポイントを成している。すなわち、このタンパクは第 X 因子 (または「F X」) を活性化するために第 I X 因子 (または「F I X」) の共因子として作用する。第 X 因子が活性化されるとプロトロンピンをトロンピンへ転換し、それがフィブリノーゲンをフィブリンに転換し、止血フィブリンクロットを形成する。

【0003】

血友病 A の患者は F V I I I が欠乏し、自然発生的または事故や外科手術による外傷に続いて厳しい出血を生じる。

【0004】

こうした血友病 A 患者に対する伝統的な治療方法は精製血漿から作った F V I I I を注射することである。この注射はたびたび行なう必要があり、繰り返す必要があるため、極めて純粋な F V I I I の濃縮物が利用できることが重要である。すなわち、F V I I I 濃縮物の精製が不十分であると、望ましくない免疫応答を誘発する危険のあるフィブリノーゲンと免疫グロブリンを高い比率で含むことになる。

【0005】

従って、治療用に使用する血漿由来タンパクを提供するためには、高純度製品を得ることのできる血漿由来 F V I I I の精製方法が必要になる。

【0006】

第 V I I I 因子濃縮物は、大抵の場合、低温沈殿させたヒトの血漿画分から製造される。一般に、ヒト血漿の工業的処理センターで得られる第 V I I I 因子濃縮物の純度は約 1 l U / m g で、一般に最大範囲は 10 ~ 20 l U / m g を越えることはない。最も一般的な製造方法ではタンパク由来の汚染物、例えばフィブリノーゲン、フィブロンectin および免疫グロブリンを除去するために沈殿ステップを使用するが、大抵の場合、不十分にしか除去できない。この方法は一般に低温沈降 (10) または P E G (非特許文献 1、2) 等の親水性ポリマーのようなタンパク沈殿剤を使用したり、組合せて用いられる。沈降剤としてはポリビニルピロリドン (非特許文献 3)、デキストラン、フィコール、パーコール、ヒドロキシエチル澱粉およびアルミナが提案されている。同じく、Thorell および Blo mback はグリシンと塩化ナトリウムの使用を推薦している (非特許文献 4)。別の著者は P E G と、グリシンと、塩化ナトリウムとの 3 つの沈降剤を使用して 10 ~ 16 l U / m g の比活性を有する第 V I I I 因子濃縮物を得ている (非特許文献 5)。

【0007】

また、多孔質シリカビーズと接触させて低分子量のタンパク由来汚染物をトラップする段階を含む生産方法で第 V I I I 因子濃縮物を得ることもできる (非特許文献 6)。しかし、この方法で得られた製品の比活性は低く、1 U I / m g 程度のみである。

【0008】

純度が極めて高い V I I I 因子濃縮物を製造できる方法すなわち免疫アフィニティークロマトグラフィ法によって濃縮物を得る方法も提案されている (非特許文献 7 ~ 9)。この方法の本質はクロマトグラフ基材に固定した抗第 V I I I 因子 : C 抗体または抗フォンビルブランド因子抗体によって第 V I I I 因子を精製することにある。この方法は効率的で

10

20

30

40

50

はあるが第V I I I因子をその抗体またはからフォンビルブラント因子から脱着させるのにドラチックな溶液を使用する必要がある。従って、望ましくない化学試薬を除去するために追加の限外濾過階段を必要とするが、これは第V I I I因子の生物学的活性に影響を与える。この方法では第V I I I因子の活性は4000~10000 I U / m gに達するが、不安定であるため凍結乾燥階段の前にアルブミンのような安定化剤を加える必要がある。この安定化剤は第V I I I因子の比活性を3~5 I U / m gに低下させる。しかし、この免疫アフィニティー精製法の主たる欠点は動物起源の残存抗体が存在し、従って、これら非ヒトタンパクに対する免疫反応が患者に誘導されることにある。

【0009】

以上の全ての方法は非ヒトタンパク類、例えば動物起源の抗体を完全に含まない、純度が極めて高い第V I I I因子濃縮物を大規模な工業的な環境に適用できる方法ではない。

【0010】

特許文献1にはウィルスの失活処理前に冷凍沈殿物をpH値が6.5~7.5で1~3 U / m lのヘパリンを含む水中に懸濁させ、水酸化アルミニウム懸濁液と反応させ、10~18の温度へ冷却し、pH値を6~7に調節し、遠心分離または濾過し、さらにフラクトゲル(Fractogel) - D E A Eのような親水性タイプのイオン交換樹脂(DEAE-TOYOPEARLRとよばれ、東ソーバイオサイエンス社から市販)を使用したクロマトグラフィによる後処理でさらに精製することを特徴とする冷凍沈殿物から第V I I I因子を製造する方法が記載されている。すなわち、この特許方法は極めて特殊な前階段、特にエタノール処理を完全に無くし、フラクトゲル(Fractogel) - D E A Eのような親水性タイプのイオン交換樹脂を用いた前階段を特徴とする第V I I I因子の精製法である。

【0011】

特許文献2にはアニオン交換クロマトグラフィを用いた精製法が記載されている。この精製法では後処理を不必要にすることができるような充分によく熟考された条件下で単一のクロマトカラムで予定タンパク類を分離する。この精製法を用いることで第V I I I因子、フィブリノーゲン、フィブロネクチンおよびフォンビルブラント因子タンパクをヒトの動物血漿から分離することができる。この方法は以下のように要約できる：水に可溶化された冷凍沈殿物画分を、架橋したマクロ-ビニルポリマーゲルのタイプのマトリックスを有する陰イオン交換樹脂を使用したクロマトグラフィによる1回の分離を行なって、気孔率の特性によって第V I I I因子-フォンビルブラント因子複合体を保持し、次に、溶出緩衝剤のイオン強度を順次増加させて各種タンパク類を選択的に回収する。この方法はフラクトゲル(Fractogel、登録商標) T S K - D E A E 6 5 0の樹脂(D E A E - T O Y O P E A R L Rとよばれ、東ソーバイオサイエンス社から市販)にグラフトしたD E A E単位を使用することによって良い結果が得られる。しかし、この方法では第V I I I因子は十分に精製されるが、フォンビルブラント因子の精製は十分に行なえないことが分かっている。

【0012】

フォンビルブラント因子(下記、「F v W」と記載)は2つの明確な機能によって止血(haemostasis)において重要な役割をする。すなわち、接着タンパクとして血小板を分散、付着させ、血管内皮下層上へ凝集させ、従って、傷付いた導管を迅速に癒痕形成させる機能と、非共有結合で循環血液中で第V I I I因子を安定化させ、確実に運送させる機能とを有する。

【0013】

F v Wの先天性の欠失またはこの因子の構造的欠陥がフォンウィルブラント病の原因であり、皮膚および粘膜からの出血となって現れる。この病気の臨床的発現は極めて異質で、特に外科手術時に問題になる。フォンウィルブラント病の治療では一次止血(haemostasis) (出血時間)と凝固不能とを正すことが必要である。

【0014】

従来この病気の治療法はF v W-リッチなヒト血漿誘導体(例えば血漿の低温沈殿画分またはF v Wを十分に含んだ第V I I I因子濃縮物)を用いて置換治療を行なうもので

10

20

30

40

50

ある。

【 0 0 1 5 】

しかし、F v Wは精製するのが難しいタンパクである。すなわち、フォンビルブランド因子は血漿中を循環する公知の最も大きなタンパクで一組のジスルフィド架橋リンクしたマルチマーから成り、そのベース要素は約260キロダルトン (kDa) の分子量を有する。血漿中での最も小さいF v Wは440~500kDaのダイマーで、最も大きい形は分子量が2000万ダルトンに達する上記ダイマーのマルチマーである。マルチマー中のサブユニットの配列はそれが形成された細胞に特有なものになり、F v Wは巨核球中および血管内皮細胞中で合成され、重合される。

【 0 0 1 6 】

フォンビルブランド因子の分子は複雑で、第F V I I I因子と結合しているため、その製造法は極めて複雑である。

【 0 0 1 7 】

F v W濃縮物を製造するための各種方法は一般に血漿画分を沈殿させて不必要なタンパク類 (フィブリノーゲン、フィブロンectin等) の主要部分を除去する段階および/またはクロマトグラフ段階 (イオン交換クロマトグラフィ、アフィニティークロマトグラフィ、免疫アフィニティークロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィ等) で極めて高い比活性を有する純粋な濃縮物にすると同時に、治療過程に決定的な生物活性を有するマルチマーの形、特に高分子量のものの一体性を維持する段階とを組合せたものである。

【 0 0 1 8 】

特許文献3には、血漿を低温沈殿画分の予備精製段階と、3回の連続したクロマトグラフィ段階とから成る工業的スケールでF v W濃縮物を製造する方法が記載されており、その第3回目のクロマトグラフィ段階はアガロース固定ゼラチンカラムでのアフィニティークロマトグラフィである。この方法で得られるF v W濃縮物の比活性は1mgのタンパク当りのリストセチン共因子の活性単位で表される単位で100 VWF : RC0/mg以上で、高分子量マルチマーのレベルは初期血漿中のそれと同じである。

【 0 0 1 9 】

特許文献4には、陰イオン交換クロマトグラフィと陽イオン交換クロマトグラフィとを組合せたF v W調剤の方法が記載されている。この方法で得られるF v W画分は1mgのタンパク当りのF v W抗体単位で表して100 IU F v W : Ag/mg以上の比活性を有するが、さらにある量の第V I I I因子を含んでいる。

【 0 0 2 0 】

特許文献15には、免疫吸着剤が抗F v W抗体である、免疫アフィニティークロマトグラフィによって極めて精製されたF v Wを製造する方法が記載されている。ヘパリン上でのアフィニティークロマトグラフィによる追加の精製段階も可能である。しかし、この種の免疫親和性精製法の欠点は免疫反応を誘発する可能性のある残余抗体が存在することにある。

【 0 0 2 1 】

特許文献6には陰イオン交換樹脂上に第V I I I因子を固定するための炭水化物を含む酸性液 (pH=5.5~6.5) を用いて行なうアニオン交換クロマトグラフィによるF v W濃縮物の調剤の製造方法が記載されている。しかし、保持されなかったフィブロンectinおよびフィブリノーゲンと一緒にF v Wを基質の洗浄によって回収するためには追加の沈降段階で精製されたF v W濃縮物を単離させる必要がある。

【 0 0 2 2 】

特許文献7にはフォンビルブランド因子を含む生物学的製剤画分からマイルドな塩基タイプのビニルポリマー気質を用いたアニオン交換クロマトグラフィによる分離工程を含む、非常に純粋なフォンビルブランド濃縮物の製造方法が記載されている。この方法は非常に簡単に実行でき、第V I I I因子をわずかしき含まない高度に特異的なフォンビルブランド因子を得ることができるという利点がある。

【 0 0 2 3 】

10

20

30

40

50

F V I I I と F v W は非常に有用な血漿誘導タンパク質で、その欠乏はある種のヒトに対して重大な止血疾患の原因となる。従って、患者へ繰り返し使用可能な高純度で製品を製造することができる、これらタンパク類の製造方法を開発することが重要である。

【 0 0 2 4 】

上記従来技術に記載の方法によってフォンビルブラント因子の純粋は悪いが純粋な第 V I I I 因子を得ることはできるか、F V I I I と F v W の両方が純粋なものを得ることができるが、その方法は複雑かつ厄介なものである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 2 5 】

【特許文献 1】欧州特許第 EP 0 343 275 号公報

【特許文献 2】欧州特許第 EP 0 359 593 号公報

【特許文献 3】欧州特許第 EP 0 503 991 号公報

【特許文献 4】欧州特許第 EP 0 934 748 号公報

【特許文献 5】米国特許第 US 6,579,723 号明細書

【特許文献 6】欧州特許第 EP 0 383 234 号公報

【特許文献 7】欧州特許第 EP 1 632 501 号公報

【非特許文献】

【 0 0 2 6 】

【非特許文献 1】Newman and al., Br. J. Haematol 21:1-20, 1971;

【非特許文献 2】Hao and al., in Methods of Plasma Protein Fractionation, Academic Press 1980, pp.57-74

【非特許文献 3】Casillas and Simonetti, Br. J. Haemato, 50:665-672, 1982

【非特許文献 4】Thorell and Blomback, Thromb Res. 1984 Aug 15;35(4):431-50)

【非特許文献 5】Ng and al, Thrombosis Res.,42:825-834, 1986)

【非特許文献 6】Margolis and at., Vox Sang. 46: 341-348,1984

【非特許文献 7】Zimmerman and Fulcher, Thrombosis Res., Suppl. VII, p. 58, 1987;

【非特許文献 8】Berntorp and Nilsson, Thrombosis Res., Suppl. VII, p.60, 1987;

【非特許文献 9】Levine and al., Thombosis Res, Suppl. VII, 1987

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 2 7 】

本発明は、F V I I I と F v W との混合物を含む溶液、または、F v W-含有溶液、または、動物、特にヒト以外の動物の分泌物に由来する溶液、または、F V I I I-含有の植物抽出物を精製する方法において、F V I I I および F v W の中から選択される少なくとも一つのタンパクを吸着できるイオン交換クロマトグラフ濾過-タイプのメンブレンでのクロマトグラフィ階段を含むことを特徴とする方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 2 8 】

本発明の対象は、下記：

(i) F V I I I と F v W の混合物を含む溶液、

(ii) F v W を含む溶液、

(iii) ヒト以外の動物の分泌物に由来する溶液

(iv) F V I I I-含有植物抽出物に由来する溶液

の中から選択される溶液から F V I I I または F v W を精製する方法において、

イオン交換クロマトグラフィ濾過-タイプのメンブレンで F V I I I または F v W を吸着する階段を含むことを特徴とする方法にある。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 9 】

【図 1】フォンビルブラント因子精製法のダイアグラム。

10

20

30

40

50

【図2】第V I I I因子精製法のダイアグラム。

【発明を実施するための形態】

【0030】

「精製(方)法」とは、媒体中に存在する他の分子からF V I I Iを分離する方法、または、媒体中に存在する他の分子からF v Wを分離する方法、または、F V I I IをF v Wから分離する方法、または、媒体中に存在する他の分子からF V I I I / F v W複合体を分離する方法を意味する。上記の分子はF V I I IおよびF v Wとは異なるタンパク類、ウイルス、バクテリア、芽胞、培地、ウシ胎仔血清等であり、これらに限定されるものではない。

【0031】

「F V I I I」とはF V I I Iの任意の形、特にF I X賦活の共因子(cofactor)として作用し、F v Wと錯体、特に成熟(mature)F V I I I、非成熟F v W、F V I I I先駆物質、(プレ・プロのF V I I I)、シグナルペプチドおよびプロ-ペプチドの開裂後に得られる成熟したF V I I Iから成るタンパク構造物を形成する例えばプロ-ペプチドを含むプロ-F V I I I (pro-F V I I I)のような成熟F V I I I生物活性誘導体を形成可能なF V I I Iの任意の形を意味する。本発明に含まれるその他のF V I I I生物活性誘導体には後翻訳修飾を受けるプロドラッグ、または、生物学的に活性な型、例えば先端を切った形、欠失した形、例えば特許文献8に記載のArg-759とSer-1709との間の領域に位置する一つ以上のアミノ酸を欠失したF V I I I、キメラな形、血漿で自然に成熟した形とは異なる後翻訳修飾された形等が含まれる。

【特許文献8】欧州特許第EP 218 712号公報

【0032】

これらの各種F V I I I形は成熟したF V I I Iの変形、または、血液中で自然に生じるその他の任意の形でよい。このF V I I Iをコードするヌクレオチド配列は種々の供与源、好ましくはヒト、ブタ、羊、ウシ、ウマおよびヤギ(Caprinae)供与源を含む哺乳類に由来するものにできるが、これらに限定されるものではない。

【0033】

「F v W」とはF v Wの任意の形を意味し、特に成熟したF v W、成熟したF v Wの生物活性誘導体、例えばプロペプチド、非成熟F v Wから成るタンパク構造物、F v W先駆物質(プレプロF v W)、F v Wプロペプチド(pro-F v W)、シグナルペプチドおよびプロペプチドの開裂後に得られる成熟F v Wを含む。本発明に含まれる他のF v Wの生物活性誘導体には、後翻訳修飾を受けるプロドラッグ、または、生物活性な形、例えば先端を切った形、欠失した形、例えばプロテオリシス抵抗性のあるA2領域を欠失したF v W(非特許文献10)、グリコプロテインIb-結合領域およびコラーゲンおよびヘパリンのための結合サイトを含むVal 449とAsn 730との間のF v W断片(非特許文献11)、キラルな形、血漿中で自然に成熟した形とは異なる後翻訳修飾した形等がある。

【非特許文献10】Lankhof and al., Thromb. Haemost. 77: 1008-1013, 1997

【非特許文献11】Pietu and al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 164: 1339-1347, 1989

【0034】

これらの各種のF v Wの形は例えば成熟F v Wまたは血液中で自然に生じたその他任意の形を修飾して製造することができる。この種のF v Wをコードするヌクレオチド配列は種々の供与源に由来でき、好ましくはヒト、ブタ、羊、ウシ、ウマおよびヤギを含む哺乳類の供与源にすることができるが、これらに限定されるものではない。

【0035】

「F V I I IとF v Wの混合物を含む溶液」とは複合した状態または個別の状態でF V I I IとF v Wとを含む任意の溶液を意味する。これらの溶液は血漿由来、組換え型由来またはトランスジェニック由来のものにすることができる。

【0036】

組換え型由来の溶液の場合、F V I I IおよびF v Wタンパクの発現が誘発されている

10

20

30

40

50

単細胞系に由来するものにすることができ、これらのタンパクの各々をコードする遺伝子を含むベクターが形質移入された動物またはヒトの細胞株を挙げることができる。この細胞株としては特にCI-1a-K, CHO-LeC10, CHO Lec-1, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, YB2/0 (ATCC CRL-1662), BHK, K61-16, NSO, SP2/0-Ag 14 and P3X63Ag8 653, SK-Hep, HepG2, PERC6 (CruceIl)株と、植物細胞、バクテリア系、例えばE. Coli、菌類、ウイルス、特にバクテリオウイルスを利用した系の中から選択できるが、これらに限定されるものではない。

【0037】

これらの細胞系は当業者に周知の方法でFvWおよびFVIIIのタンパクを発現する。下記特許文献9を参照できる。この特許の内容は本明細書の一部を成す。

10

【特許文献9】米国特許第US 5,198,349号明細書

【0038】

この特許文献にはFVIIIとFvWの共発現、特に、FVIIIの暗号配列が挿入されている発現ベクターと、FvW暗号配列が挿入された発現ベクターとが共形質転換されたCHO細胞が記載されている。

【0039】

トランスジェニック起源の溶液は特にトランスジェニシス(transgenesis)すなわち一つまたは複数の組換え型DNA分子を含む動物または植物由来の多数細胞(pluricellular)系から得られる。その適切な例にはイヌ、ネコ、ハツカネズミ、ラット、ハムスター、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、ブタ、ウマ、昆虫、草木、例えばタバコ、ダイズが含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

【0040】

動物からのFVIIIおよびFvWの場合には、動物の各種分泌物、例えば尿、血液、唾液または乳汁(これらに限定されるものではない)中で産生される。この産生方法は当業者に周知の方法で実行する、例としては特許文献10、特許文献11に記載のものが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【特許文献10】欧州特許第EP 741 515号公報

【特許文献11】欧州特許第EP 807 170号公報

【0041】

特許文献11にはFVIIIとFvWを発現し且つ乳汁中に分泌させるためにFVIIIとFvWをコードするDNA分子をゲノム中に安定な状態で一体化したトランスジェニック動物の生産方法が記載されている。

30

【0042】

FVIIIおよびFvWが植物から生産する場合もその生産を当業者に周知の方法で実行でき、例えば下記特許文献12、13が参照できる。

【特許文献12】米国特許第US 6,331,416号明細書

【特許文献13】米国特許第US 5,994,628号明細書

【0043】

血漿起源の溶液の場合には動物またはヒトからの血漿または冷凍沈殿物または標準的な分画方法を用いて得た画分にすることができる(非特許文献12)。

40

【非特許文献12】Cohn and al., J. Am. Chem. Soc., 68, 459, 1946 and Kistler and al., Vox Sang., 7, 1962, 414-424

【0044】

これらの画分には必要に応じて水酸化アルミニウム吸着のような予備精製処理をすることができる。

【0045】

FVIIIとFvWとの混合物とはこれらのタンパクがほぼ同じ量で存在するか、ひとつのタンパクが主に存在するか、他方に対して一方が相対的に多量に存在することを意味する。「FvWを含む溶液」とはFvWを含む任意の溶液を意味し、FVIIIは実質的に全く含まない、すなわち、ほとんどまたは極めて少量しか含まないということの意味す

50

る。この溶液は組換え型でも、トランスジェニックでも、血漿由来でもよい。

【0046】

組換え型起源の溶液はF v Wタンパクの発現が誘発された単細胞系に由来する。その適切な例にはこのタンパクをコードする遺伝子、好ましくはヒトのタンパクをコードする遺伝子を含むベクターで形質転換された全ての動物またはヒトの細胞系が含まれる。この細胞株は特にCHO-K、CHO-LeC10、CHO Lec-1、CHO Pro-5、CHO dhfr-、Wil-2、Jurkat、Vero、Molt-4、COS-7、293-HEK、YB2/0、BHK、K61-16、NS0、SP02/0-Ag14、P3X63Ag8. 653、SK-Hep、HepG2細胞系、植物細胞、バクテリア系、例えばE. Coli、菌類系、ウイルス使用系、特にバクテリオファグの中から選択できるが、これらに限定されるものではない。

【0047】

これらの細胞株はF v Wタンパクを発現し、当業者に周知の方法で得ることができる。その適切な例としては下記特許文献14、15が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【特許文献14】米国特許第US 5,198,349号明細書

【特許文献15】国際特許第WO 89/06096号公報

【0048】

特許文献14（米国特許第US 5,198,349号明細書）には発現ベクターにヒトのF v Wをコードする相補DNAを挿入したCOS細胞のヒトF v W発現が記載されている。

【0049】

トランスジェニック起源の溶液は複数細胞(pluricellular)系に由来する。特に、トランスジェニシスで得た動物または植物すなわちF v Wをコードする組換え型DNA分子を入れた一つまたは複数の細胞から得られる。その適切な例はイヌ、ネコ、ハツカネズミ、ラット、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、ブタ、昆虫、植物、例えばタバコ、大豆を含み、これらに限定されるものではない。

【0050】

F v Wをトランスジェニック(遺伝子導入実験)動物から生産する場合、動物の各種分泌物、例えば尿、血液、唾液または乳汁(これらに限定されない)から生産できる。この生産方法は当業者に周知の方法で実行できる。その適切な例としては下記特許文献16、17が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【特許文献16】国際特許第WO 2001/022810号公報

【特許文献17】国際特許第WO1999/058699号公報

【0051】

特許文献16(国際特許第WO 2001/022810号公報)には乳中にヒトのF v Wを生産するメスのトランスジェニックハツカネズミが記載されている。

【0052】

植物からF v Wを生産する方法も当業者に周知の方法で実行できる。その適切な例としては下記特許文献18、19が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【特許文献18】米国特許第US 6,331,416号明細書

【特許文献19】米国特許第US 5,994,628号明細書

【0053】

血漿由来の溶液は動物またはヒトの血漿画分または冷凍沈殿物または標準的分画方法で得られる画分にするすることができる(非特許文献13)。

【非特許文献13】Cohn and al., J. Am. Chem. Soc., 68, 459, 1946 and Kistler and al., Vox Sang., 7, 1962, 414-424

【0054】

これらの画分には必要に応じて水酸化アルミニウム吸着のような予備精製処理をすることができる。

【0055】

「ヒト以外の動物の分泌物から得たF V I I Iを含む溶液」とは任意の分泌物、例えばF V I I I分子を発現するように設計されたトランスジェニック動物が出す血漿、尿、唾

10

20

30

40

50

液または乳から誘導される任意の溶液も意味する。この場合、トランスジェニック動物はF v Wを発現しない。「F V I I I -含有血漿から得た溶液」とはヒトまたは動物のF V I I Iを自然に含む血漿すなわちF v Wを実質的に含まないものから誘導される任意の溶液を意味する。これは動物またはヒトの血漿画分、冷凍沈殿物または標準的分画方法で得られる画分から得られる（非特許文献13）。これらの画分には必要に応じて水酸化アルミニウム吸着のような予備精製処理をすることができる。

【0056】

トランスジェニック動物から分泌物を得る方法も当業者類に周知の手段で実行できる。その適切な例としては下記特許文献20、21が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【特許文献20】米国特許第US 5,880,327号明細書

【特許文献21】米国特許第US2007/0011752号明細書

【0057】

特許文献20（米国特許第US 5,880,327号明細書）にはハツカネズミの乳中にヒトのF V I I Iを生産させる方法が記載されている。特許文献21（米国特許第US2007/0011752号明細書）には各種動物の唾液からヒトのタンパク、例えばF V I I Iを生産する方法が記載されている。

【0058】

「F V I I I含有植物抽出物由来の溶液」とはF V I I I分子を発明、源するように設計されたトランスジェニック植物または植物細胞から得られるF V I I Iタンパク、特に、ヒト起源のタンパクを含む植物からの任意の画分を意味する。

【0059】

この抽出物は植物細胞にF V I I Iをコードする遺伝子を含むヌクレオチドベクターを導入して作ることができる。その方法は当業者類に周知で、多数の文献に記載されており、例えば下記文献に記載されている。

【特許文献22】米国特許第US 2005/0060775号明細書

【0060】

「イオン交換クロマトグラフィ濾過タイプのメンブレン」とはF V I I Iおよび/またはF v Wのタンパクをメンブレンを通したときにF V I I Iおよび/またはF v Wをイオン交換によって吸着する能力のある任意の物理的な半透過性のバリアを意味する。さらに、このメンブレンはさらに、メンブレンとF V I I Iおよび/またはF v Wとの間のイオン交換作用がそれらを保持するのに充分でなくなるときに、F V I I IおよびF v Wを流すことができるものである。

【0061】

すなわち、本発明ではF V I I IまたはF v Wを精製するためにイオン交換濾過タイプのメンブレンを使用する。このイオン交換濾過タイプのメンブレンはマクロポーラスな基から成り、この基材に正または負に帯電した被覆物が固定され、この被覆物が濾過タイプのメンブレンにイオン交換特性を与える。一般に正または負に帯電した被覆物は化学的グラフトによって上記マクロポーラス基材上に固定される。

【0062】

マクロポーラス基材の気孔率（すなわちその平均細孔径は濾過タイプのメンブレンがF V I I IおよびF v Wを完全に通過できるようなものである。このメンブレンを使用する第1の利点はプロセスの衛生上の安全レベルを改善することができる使い捨て型のイオン交換濾過タイプメンブレンを使用できる点にある。このメンブレンを使用する第2の利点は、本発明の精製（より正確にはイオン交換クロマトグラフィ階段）を被精製溶液を極めて大きな流速で実施できる点にある。

【0063】

本発明の濾過タイプのメンブレンは任意タイプの物理的バリア基材で実行できる。その例としてはポリマーフィルム、ウイック、中空ファイバー、安定化セルローズ、ポリエーテルスルホンまたはF V I I IおよびF v Wを流通させることができる任意の三次元構造

10

20

30

40

50

物が挙げられる。

【0064】

濾過タイプのメンブレンとF V I I IおよびF v Wタンパクとの間のイオン交換相互作用はマクロポーラスな基材上に固定した正または負に帯電した被覆物により行なわれる。この被覆物は交換可能な塩基性または酸性の官能基から成る。

【0065】

イオン交換性被覆物は一官能性タイプ、すなわち単一の官能性単位のみから成るタイプか、複数の官能性単位を有する多官能性タイプにすることができる。

【0066】

従って、上記濾過タイプのメンブレンはF V I I IおよびF v Wのタンパクをこのタンパクとメンブレンとの間の相互作用によって同時に捕捉または吸着できる。F V I I IおよびF v Wを含んだ溶液をメンブレン上に通すとイオン交換作用によってF v WおよびF V I I Iはメンブレンに保持される。

10

【0067】

被精製製品が冷凍沈殿物中に含まれる場合には、汚染菌が完全に無くなった溶液を得るために、本発明の精製法を実行する前に被精製溶液の予備精製段階を実行するのが好ましい。

【0068】

この予備精製段階は複雑な溶液、例えば多くのタンパクを含む媒体である乳または血漿から誘導される溶液の場合に特に有益である。この予備精製段階は特に特許文献23に記載の清浄段階または特許文献24または特許文献25に記載の抽出段階で行なうことができるが、これらに限定されるものではない。

20

【特許文献23】国際特許第WO 2004/076695号公報

【特許文献24】フランス特許第FR 06 04864号公報

【特許文献25】フランス特許第FR 06 11536号公報

【0069】

特許文献24（フランス特許第FR 06 04864号公報）に記載の乳中に存在するカルシウムイオンに対して親和性を有する少なくとも一つの錯体または非錯体のタンパクを抽出する方法は下記の工程から成る：

(i) 乳を可溶性塩、例えばリン酸ナトリウムと接触させ、得られるカルシウム化合物を沈澱させてタンパクを開放する。可溶性塩のアニオンは媒体中で上記不溶カルシウム化合物が形成でき、タンパクリッチな液相が得られるものを選択する。

30

(ii) タンパクリッチな液相をカルシウム化合物沈降物から分離する。液相をさらにリピド相とタンパクを含む非リピド水溶相とに分離し、

(iii) タンパクを含んだ非リピド水溶相を回収する。

【0070】

特許文献25（フランス特許第FR 06 11536号公報）に記載の、乳の自然なpHで少なくとも一種の疎水性ポケットと負電荷とを有する乳中に存在するタンパクを抽出する方法は下記の工程から成る：

a) 乳をスキミングして脱リピド化し、

40

b) タンパクを含むスキミングと脱リピド化した画分を疎水性とイオン性の両方の特性を有するリガンド、例えば、4-メルカプト-エチル-ピリジンがグラフトされたクロマトグラフ基材に上記タンパクを上記基材に保持できるpH条件下で通し、

c) タンパクを溶出し、

d) 溶出画分から乳タンパクを除去して溶出画分を精製し、

e) 前記タンパクを回収する。

【0071】

細胞系から得た溶液の場合、予備精製段階を細胞培養段階後に直ち実行することができる。細胞培養媒体の組成は細胞が作るタンパクを細胞外の媒体中に排出できるように制御する。さらに、得られたタンパクが媒体中に排出されるような細胞を選択する。

50

【 0 0 7 2 】

その後、本発明の精製階段を実行するのに適した予備精製物を得るためにデープ濾過階段またはタンジェトマイクロ濾過を実施する必要がある。

【 0 0 7 3 】

本発明の複数の実施例の濾過タイプのメンブレンはカチオン交換選択性メンブレンである。このメンブレンに付けた官能基の正の対イオンはF v WおよびF V I I I上の同じ電荷と交換される。

【 0 0 7 4 】

陽イオン交換被覆物として使用可能な官能基にはカルボキシメチル(CM)、ホスホリル、スルホプロピル(SP)、サルフェート(S)等があるが、これらに限定されるものではない。

10

【 0 0 7 5 】

陽イオン交換濾過タイプのメンブレンを使用する実施例で使用可能な緩衝剤にはトリス-ヒドロキシメチル-アミノメタン、炭酸エステル、エチレンジアミン、イミダゾールまたはトリエタノールアミンがあるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 7 6 】

これらの実施例での緩衝剤のpH値は当業者に周知のルーチン方法に従ってタンパクの等電点に応じて選択される。このpH値でのタンパクは正の全体荷電レベルを有する。

【 0 0 7 7 】

本発明の他の実施例では、濾過タイプのメンブレンがアニオン交換選択的なメンブレンである。このメンブレンが有する官能単位の負の対イオンがF v WおよびF V I I I上の同じ電荷と交換される。

20

【 0 0 7 8 】

この陰イオン交換被覆物として使用可能な官能単位にはジエチルアミノエチル(DEAE)、ジエチル(2-ヒドロキシプロピル)アミノエチル、四級アンモニウム基(QAE、Q)、ジメチルアミノエチル(DMAE)、トリメチルアミノエチル(TMAE)が含まれるが、これらに限定されるものではない。これらの実施例で使用可能な緩衝剤には酢酸塩、シトラート、リン酸塩、グリシン、パルピツレートが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 7 9 】

これらの実施例での緩衝剤のpH値は当業者に周知のルーチン方法によってタンパクの等電点に従って選択される。このpH値でタンパクは全体として負の帯電レベルを有する。濾過タイプ・メンブレンは強陰イオン交換樹脂から成るイオン交換正被覆物を有するのが好ましい。

30

【 0 0 8 0 】

「強陰イオン交換樹脂」とは、イオン化の弱いタンパクを吸着可能な任意の陰イオン交換膜を意味する。

【 0 0 8 1 】

この種の濾過タイプのメンブレンは市販されている。その適切な例はQAEまたはQ単位を有するメンブレン、特にムスタング(Mustang Q、登録商標)メンブレン(PaII)またはサルトビンド(Sartobind)Qメンブレン(Sartorius)であるが、これらに限定されるものではない。

40

【 0 0 8 2 】

ムスタング(Mustang Q、登録商標)メンブレン(PaII)は吸着能およびクロマトグラフ容積流が大きく、単一サイクル(使い捨て)でも複数サイクルでも使用できる点で特に重要である。さらに、このメンブレンは基質の洗浄、例えば再生や衛生化(ウィルス、プリオンセキュリティプロトコル等)の評価階段を実施する必要がないという利点がある。

【 0 0 8 3 】

これらの濾過タイプのメンブレンを使用することで標準的基質でこれまで必要であったエージングテストも不要になる。従って、これらのメンブレンを使用することで現在のものより生産時間を短くすることができる。

50

【 0 0 8 4 】

被精製溶液と接触する濾過タイプのメンブレンの表面はマクロポラス基材上に化学的にグラフトした第四アンモニウム基から成る陰イオン交換正の被覆を有するのが好ましい。

【 0 0 8 5 】

本発明のさらに別の実施例では、濾過タイプのメンブレンがマクロポラスメンブレンである。「マクロポラス」という用語は寸法が $0.3\mu\text{m}$ ~ $1.0\mu\text{m}$ の膜細孔を有する系を意味する。この細孔径は $0.5\mu\text{m}$ ~ $0.9\mu\text{m}$ であるのが好ましく、 $0.8\mu\text{m}$ であるのが最も好ましい。

【 0 0 8 6 】

本発明で特に好ましいメンブレンの基質の例はポリエーテルスルホン基質である。このポリエーテルスルホンメンブレンの例としてパル(Pall)社から市販のムスタング(Mustang)Qメンブレンである。このメンブレンは直径が $0.8\mu\text{m}$ の細孔を有し、四級アミン基がグラフトされている。

【 0 0 8 7 】

本発明の一つの実施例では、被精製溶液はFVIIIまたはFvWを含む血漿起源のものである。本発明の好ましい実施例では、被精製溶液はFV III I IおよびFvWの混合物を含む血漿由来のものである。

【 0 0 8 8 】

本発明のこの実施例では、溶液は天然のヒトまたは動物の血漿、すなわち、ヒトまたは動物のFV III I IおよびFvWを自然に含むヒトまたは動物の血漿に由来する。この場合の動物血漿はブタ、ウサギ、ヤギ等であるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 8 9 】

驚くことに、本発明者は濾過タイプのメンブレン、特にムスタング(Mustang)Qメンブレンは樹脂またはゲルのメンブレンよりFV III I Iおよび/またはFvWに対する吸着能が高いということを見出した。「吸着能」という用語はゲルに固定された標的タンパクの量を意味し、アニオン樹脂の場合、一般にゲルに固定されたBSA(ウシ血清アルブミン)の量をゲルまたは樹脂のメーカーが表している。例えば、FV III I Iおよび/またはFvWの精製にこれまで使用されてきたDEAE-TOYOPEARL(登録商標)ゲルの場合の吸着能は $25\sim 35\text{mg/ml}$ であるが、ムスタング(Mustang)Qメンブレンでは 30mg/ml 以上である。

【 0 0 9 0 】

吸着能が高い濾過タイプのメンブレンということは、ゲルまたは樹脂と比べて、同じ量のFV III I Iおよび/またはFvWを吸着するのに使用するゲルの量を少なくできるということの意味する。例えば、DEAEゲルの吸着量は $50\sim 80\text{IU FvW}$ とFVIII/mlであるが、ムスタング(Mustang)Qメンブレンでは $200\sim 250\text{IU FvW}$ とFVIII/mlである。

【 0 0 9 1 】

ゲルまたは樹脂と比較した時の濾過タイプのメンブレンの最高吸着能はイオン化サイトへのFV III I Iおよび/またはFvW、特にFV III I I/FvW複合体を形成した時のアクセス性を改良することに達成できる。すなわち、これらのタンパク、特にFV III I I/FvW複合体が形成されるときには、タンパクが大きな寸法を有するので、マクロポラス濾過タイプのメンブレン上にグラフトされたイオン化サイトにはより簡単にアクセスできると考えられる。これに対してゲルまたは樹脂では、イオン化サイトは細孔のチャンネルの中にあるため大きなタンパクはアクセスできない。

【 0 0 9 2 】

本発明の好ましい実施例では下記工程から成る方法を使用するのが好ましい：

(a)血漿から冷凍沈殿物を作り、

(b)イオン交換クロマトグラフィメンブレン、特にアニオン交換クロマトグラフィメンブレン上に第V III I I因子およびフォンビルブランド因子を捕捉、吸着し、(c)溶出緩衝剤のイオン強度値を順次増加させることによってフォンビルブランド因子および第V III I I

10

20

30

40

50

因子を選択的に回収する。

【0093】

血漿から冷凍沈殿物を作る段階の後にアルミナゲルでの第V I I I因子およびフォンビルプラント因子の吸着とコールド沈殿による予備精製段階を実行するのが好ましい。

【0094】

上記方法の段階(c)で使用する溶出緩衝剤のイオン強度値はF v WおよびF V I I Iタンパクの各生理化学的性質と濾過タイプメンブレンのイオン交換特性に関する一般的な知識に基づいて当業者が簡単に調節でき、一般には市販の濾過タイプメンブレンのメーカーが推薦する値を使用できる。特に、F V I I Iは同じ基質からF v Wを溶出するのに必要なイオン強度値より高いイオン強度値を有する緩衝剤でアニオン交換クロマトグラフィ基質から溶出するという一般的な知識を当業者は使用できる。

10

【0095】

従って、上記方法の段階(c)では、基質から(i)F v W、(ii)F v WとF V I I Iまたは(iii)最初にF v W、続いてF V I I Iを溶出(脱着)させるのに適したイオン強度値を有する緩衝剤を当業者は使用することができる。最初にF v W、続いてF V I I Iを溶出させる変形例(iii)では、当業者はF v WまたはF V I I Iをそれぞれに合ったイオン強度値を有する2つの溶出緩衝剤を順次使用することができる。この変形例(iii)の第2の変形例では、当業者はF v W、続いてF V I I Iが脱着されるような連続にイオン強度を増加させる勾配を有する緩衝剤を用いて溶出を実行することもできる。

【0096】

20

上記方法の段階(c)で行なう「溶出緩衝剤のイオン強度値を連続に増加」という操作には塩、例えば塩化ナトリウム、塩化カルシウム(これらに限定されるものではない)を加えて溶出緩衝剤のイオン強度値を線形に増加させることが含まれる。

【0097】

すなわち、緩衝剤のイオン強度値を増加させることによって最初にF v Wが溶出し、それからF V I I Iを溶出させることができる。従って、F v Wを回収し、F v Wを得た後に溶出を止めることができ、さらに溶出を続けてF V I I Iを得ることもできる。

【0098】

「冷凍沈殿物」とは、ヒトまたは動物の血漿から低温沈殿法によって得られる沈降物を意味する。この冷凍沈殿物は当業者に周知の方法で得ることができる。例えば、凍結血漿を約-5 ~ -15の温度にし、それから温度を1、必要な場合には4を上回まらない温度で攪拌下にゆっくり暖める。この条件で凍結血漿は溶融し液相と固相となる。遠心分離して固相すなわち冷凍沈殿物を回収する。冷凍沈殿物は実質的にフィブリノーゲン、フィブロネクチン、第V I I I因子およびフォンビルプラント因子(vWF)から成る。冷凍沈殿物では一般にF V I I IはF V I I Iを安定させるF v Wと組合されている。

30

【0099】

「選択的に回収」とはF V I I IまたはF v Wのいずれか、または、F V I I IおよびF v Wの混合物を回収する能力を意味する(溶出方法と予想されるタンパクと依存する)。

40

【0100】

当業者に周知の方法に従ってpH値を変えるか、溶出緩衝剤のイオン強度値を増加させることによって(実施例1を参照)、F v WまたはF V I I Iのいずれかか、F V I I IとF v Wとの混合物を得ることができる。

【0101】

本発明のさらに他の実施例では、被精製溶液が組換え型またはトランスジェニック由来のF V I I IとF v Wの混合物を含む。この実施例では下記の工程が使用される:

- (a) F V I I IおよびF v Wを含む細胞培養の上清または精製済み溶液を作り、
- (b) 上記のイオン交換クロマトグラフィ・メンブレン、特にアニオン交換クロマトグラフィメンブレンで第V I I I因子およびフォンビルプラント因子を捕捉し、

50

(c) 溶出緩衝剤のイオン強度値を順次増加させてフォンビルプラント因子および第V I I I因子を選択的に回収する。

【0102】

本発明のさらに他の実施例では、被精製溶液がF V I I IまたはF v Wのいずれかを含む。この実施例では下記の工程が使用される：

- (a) F V I I IまたはF v Wを含む細胞培養上清または精製済みの溶液を作り、
- (b) 上記イオン交換クロマトグラフィ・メンブレン、特にアニオン交換クロマトグラフィ・メンブレンで第V I I I因子またはフォンビルプラント因子を捕捉し、
- (c) フォンビルプラント因子または第V I I I因子を回収する。

【0103】

血漿画分を使用することで本発明方法によってフィブリノーゲン、フィブロネクチン、ビタミンK依存因子の量を減らすことができる。特に、被精製溶液がF V I I IとF v Wの混合物を含む場合、下記の工程を行うことでF v WおよびF V I I Iを選択的に回収することができる：

- (c1) 上記クロマトグラフィメンブレンの平衡緩衝剤のイオン強度値を増加させてF v Wを溶出させる。例えば、0.25M塩化ナトリウムを加えてイオン強度値を上げ、浸透圧重量モル濃度を600から約660mOsm/Kgへ増加させることができる。
- (c2) 上記クロマトグラフィメンブレンの平衡緩衝剤のイオン強度値をフォンビルプラント因子の回収値より増加させてF V I I Iを溶出させる。例えば、0.7Mまたは0.35Mの塩化ナトリウムまたは塩化カルシウムを加えることによってイオン強度値を増加させ、浸透圧重量モル濃度を1400から約1700mOsm/Kgまで上げることができる。

【0104】

階段(c1)はイオン交換濾過タイプメンブレンからF v Wを選択回収する段階で、この段階ではF v Wを脱着するのに適したイオン強度値の緩衝液を使用する。

【0105】

階段(c2)はイオン交換濾過タイプメンブレンからF V I I Iを選択回収する段階で、この段階ではF V I I Iを脱着するのに適したイオン強度値の緩衝液を使用する。階段(c2)で使用する緩衝液のイオン強度値は階段(c1)で使用する緩衝液のイオン強度値より高い。

【0106】

これらの階段はイオン交換クロマトグラフィ濾過タイプメンブレン上にF V I I IおよびF v Wが同時に捕捉された段階の後に実行される。階段(c1)で溶出したF v WはF V I I Iを極めてわずしか含まない。これを回収して、精製されたF v W溶液を得る。階段(c2)で得られるF V I I Iに含まれるF v Wは最初の溶液より少ない。これを回収して、精製されたF V I I I溶液を得る。

【0107】

必要な場合には、例えば下記特許文献26に記載のような、高分子量のF V I I I-F v W複合体を分離するための追加の段階を実行することができる。また、必要に応じて、例えば下記特許文献27に記載のような、気孔率が20nm以下、特に15nm以下の親水性フィルターでF V I I Iの精製溶液を得る追加の濾過段階を実行することもできる。

【特許文献26】欧州特許第EP1037923号公報

【特許文献27】国際特許第WO 2005/040214号公報

【0108】

本発明のさらに他の実施例では、必要に応じて、イオン交換クロマトグラフィ濾過タイプメンブレンでのF V I I IとF v Wの同時吸着段階の後に、精製されたF V I I I溶液を得るための下記の工程をさらに実行することができる：

- (d) 上記クロマトグラフィメンブレンの平衡緩衝剤のイオン強度値を増加させてF v Wを溶出させ、
- (e) イオン交換クロマトグラフィメンブレン、好ましくは最初のメンブレンと同じタイプのメンブレン上でフォンビルプラント因子を捕捉し、

(f)上記クロマトグラフィメンブレンの平衡緩衝剤のイオン強度値を増加させてフォンビルプラント因子を溶出させる。

【0109】

この実施例では、必要に応じて、上記のF v W溶出段階(d)の後に、上記クロマトグラフィメンブレンの平衡緩衝剤のイオン強度値をフォンビルプラント因子を回収する場合の値より増加させてF V I I Iを溶出させる。従って、簡単な方法で精製されたF v W含有溶液と精製されたF V I I I含有溶液とが得られる。

【0110】

本発明方法によってF V I I IとF v Wを含んだ溶液からF V I I IおよびF v Wを連続的または同時に精製することができる。血漿由来の溶液の場合、ヒトおよび動物の血漿を最大限利用できるので、本発明方法は特に有利である。

10

【0111】

この特定実施例では下記の工程がさらに加わる：

(g)階段(c)で溶出したフォンビルプラント因子リッチな画分をゼラチンリガンドを有する親和性ゲルカラムでクロマトグラフィを実行し、

(h)保持されない非フィブロネクチンあ全く含まないフォンビルプラント因子画分を回収する。

【0112】

フィブロネクチンアッセイは当業者に周知の方法に従って例えば免疫比濁法によって実行できる。従って、本発明方法の実施例では、イオン交換クロマトグラフィ濾過タイプ・メンブレンでF V I I IとF v Wとを同時に捕捉する上記段階の後に、下記の工程を実行することによって、精製されたF V I I I溶液と精製されたF v W溶液とを同時に得ることができ：

20

(a)上記クロマトグラフィ・メンブレンの平衡緩衝剤のイオン強度値を増加させてF v Wを溶出させ、

(b)上記クロマトグラフィ・メンブレンの平衡緩衝剤のイオン強度値をフォンビルプラント因子の回収用の値より増加させてF V I I Iを溶出させ、

(c)上記イオン交換クロマトグラフィ・メンブレン上にフォンビルプラント因子を捕捉し、

(d)上記クロマトグラフィ・メンブレンの平衡緩衝剤のイオン強度値を増加させてフォンビルプラント因子を溶出させ、

30

(e)階段(d)で溶出させたフォンビルプラント因子リッチな画分をゼラチン・リガンドを有する親和性ゲル・カラム上でクロマトグラフィを実行し、

(f)ゲルアフィニティーに保持されなかったフォンビルプラント因子リッチな画分を回収する。

【0113】

この実施例では、精製されたF V I I I溶液と精製されたF v W溶液とが続けて得られる。すなわち、本発明の多様な実施例によって本発明の簡単な方法でF V I I IとF v Wとを分離することができる。

【0114】

本発明の精製段階はアニオン交換クロマトグラフィ選択的メンブレン上に両方のタンパクを同時に捕捉することによって血漿から第V I I I因子とフォンビルプラント因子とを別々または同時に精製することができる唯一の方法である。

40

【0115】

本発明のさらに他の対象は、本発明の精製法を実行することから成る精製されたF V I I Iの製造方法にある。

本発明のさらに他の対象は、本発明の精製法を実行することから成る精製されたF v Wの製造方法にある。

本発明の上記以外の観点および利点は以下の基する本発明の実施例から理解できよう。

50

しかし、本発明が下記実施例に限定されるものではない。

以下、実施例を参照して本発明をさらに詳細に説明する。

【実施例】

【0116】

実施例 1

フォンビルプラント因子の精製法

新鮮な凍結血漿を 1 ~ 6 の間の温度で融解して冷凍沈殿物を製造した。遠心分離後、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、フォンビルプラント因子および第 V I I I 因子を含んだ冷凍沈殿物を回収し、ヘパリンナトリウム (3IU/mL) を含んだ水溶液中にスラリー化した。溶液の pH 値を 7.0 ± 0.1 に合わせた。スラリー化した冷凍沈殿物をビタミン K 依存因子を除去するためのアルミナゲルでの吸着と、フィブリノーゲンおよびフィブロネクチンコールド沈降によって予備精製した。すなわち、懸濁液に水酸化アルミニウムを加え、5 分間攪拌した。pH 値は 0.1 M の酢酸を用いて 6.5 ± 0.2 に合わせた。溶液を攪拌下に 14 ~ 18 の温度範囲に冷却した。それから溶液を 14 ~ 18 の温度で遠心分離した。上澄を回収し、0.22 μ m 濾紙で濾過して清透化した。

10

【0117】

この精製済みの溶液をウィルス失活階段に送って、外膜ウィルスに対して効果的な Poly sorbate 80 (1%, w/v) と Tn-nButyl Phosphate (0.3%, v/v) の存在下で溶剤 / 洗剤で処理した。溶剤 / 洗剤処理は少なくとも 6 時間、pH 値 = 7.1 で実行した。

20

【0118】

溶剤 / 洗剤処理済みのタンパク溶液を強アニオン交換器グラフトメンブレン、例えば塩基性緩衝液で浸透圧レベルが 370 ~ 390 mOsm/Kg に達するまで塩化ナトリウムの濃度を上げ、pH 6.9 ~ 7.1 に予め平衡させた Mustang (Mustang) Q カプセルに通した。

【0119】

タンパク溶液を通した後にカラム排出液の光学濃度がベースラインに戻るまでカプセルを同じ緩衝液 (浸透圧重量モル濃度 = 370 ~ 390 mOsm/Kg) でリンスした。メンブレンに吸着されなかったタンパク分画にはフィブリノーゲンと、溶剤 / 洗剤ベースのウィルス失活処理で加えた化学試薬とが含まれる。

【0120】

次に、浸透圧重量モル濃度が 600 ~ 660 mOsm/Kg に達するまで塩化ナトリウムを加えてイオン強度値を pH 6.9 ~ 7.1 に増加させ、塩基性緩衝液を用いてメンブレンに吸着されたフォンビルプラント因子を溶出させた。溶出画分は浸透圧重量モル濃度が 370 ~ 390 mOsm/Kg に達するまで塩化ナトリウムを除いた pH 6.9 ~ 7.1 の塩基性緩衝液で希釈した。

30

【0121】

次に、希釈された画分を、浸透圧重量モル濃度が 370 ~ 390 mOsm/Kg に達するまで塩化ナトリウムを加えて pH 6.9 ~ 7.1 の塩基性緩衝液で平衡させた Mustang Q カプセル・タイプのグラフトされた強陰イオン交換メンブレンに通した。タンパク溶液を通した後、カラム排出液の光学濃度がベースラインに戻るまで同じ緩衝液 (浸透圧重量モル濃度 = 370 ~ 390 mOsm/Kg) を使用してカプセルをリンスした。次に、メンブレンに吸着されたフォンビルプラント因子を、600 ~ 660 mOsm/Kg の浸透圧重量モル濃度に達するまで塩化ナトリウムを加えてイオン強度値を pH 6.9 ~ 7.1 に増加させた塩基性緩衝液を加えて溶出させた。次に、溶出画分を浸透圧重量モル濃度が 600 ~ 660 mOsm/Kg に達するまで塩化ナトリウムを加えてイオン強度値を増加させた塩基性緩衝液 (pH 6.9 ~ 7.1) で予め平衡させたゼラチンリガンドを用いたゲル上でのアフィニティークロマトグラフィに送った。タンパク溶液を通した後、カラム排出液の光学濃度がベースラインに戻るまで親和性ゲルを同じ緩衝液 (浸透圧重量モル濃度 = 600 ~ 660 mOsm/Kg) を使用してリンスした。ゲル洗浄物を含む非吸着画分は極めて純粋なフォンビルプラント因子の濃縮画分を表す。精製ダイアグラムは [図 1] に示してある。

40

【0122】

結果

50

【表 1】

フォンビルブラント因子の精製

段階	収率 (%)	比活性 (IU/mg)
初期 冷凍沈殿物	100	0.46
Mustang Q XT5 カプセル上での 第 1 回精製段階	≥30 (30~50)	20~30
Mustang Q XT5 カプセル上+ゼラチン- セファロース (Sephacrose) のクロマト グラフィでの第 2 回精製段階	≥70	>80

10

【 0 1 2 3 】

実施例 2

第 V I I I 因子の精製方法

新鮮凍結血漿を 1 ~ 6 の間の温度で融解して冷凍沈殿物を製造した。遠心分離後にフィブリノーゲン、フィブロネクチン、フォンビルブラント因子および第 V I I I 因子を含んだ冷凍沈殿物を回収し、ヘパリンナトリウム (3 IU/mL) を含む水溶液中にスラリー化した。溶液の pH 値は 7.0 ± 0.1 に合せた。

20

【 0 1 2 4 】

スラリー化した冷凍沈殿物をビタミン K 依存因子を除去するためのアルミナゲル吸着とフィブリノーゲンおよびフィブロネクチンのコールド沈降とによって予備精製した。すなわち、水酸化アルミニウムを攪拌下に懸濁液に 5 分間で加えた。0.1M 酢酸を用いて pH 値を 6.5 ± 0.2 に合わせ、溶液を攪拌下して 14 ~ 18 の温度に冷却した。その後、溶液を 14 ~ 18 の温度で遠心分離した。上澄を回収し、0.22 μ m 濾紙で濾過して清透化した。

【 0 1 2 5 】

精製済みの溶液をウイルス失活階段に送り、外膜ウイルスに対して効果的な Polysorbate 80 (1%, w/v) および Tn-nButyl Phosphate (0.3%, v/v) の存在下で溶剤 / 洗剤処理した。溶剤 / 洗剤処理は少なくとも 6 時間、pH 値 = 7.1 で実施した。

30

【 0 1 2 6 】

次に、溶剤 / 洗剤処理したタンパク溶液を、浸透圧重量モル濃度が 370 ~ 390 mOsm/Kg に達するまで塩化ナトリウムを加えた塩基性緩衝液 (pH 6.9 ~ 7.1) で予め平衡させた Mustang Q カプセルの強アニオン-交換器グラフトメンブレンに通した。

【 0 1 2 7 】

タンパク溶液を通した後、カラムの排出液の光学濃度がベースラインに戻るまで上記カプセルを同じ緩衝液 (浸透圧重量モル濃度 = 370 ~ 390 mOsm/Kg) を用いてリンスした。メンブレンに吸着されなかったタンパク分画は多くのフィブリノーゲンと、溶剤 / 洗剤処理ベースのウイルス失活処理のために加えた化学試薬とを含む。

【 0 1 2 8 】

メンブレンに吸着されたフォンビルブラント因子は、浸透圧重量モル濃度が 600 ~ 660 mOsm/Kg に達するまで塩化ナトリウムを加えてイオン強度値を増加させた pH = 6.9 ~ 7.1 の塩基性緩衝液を加えて溶出させた。フォンビルブラント因子の精製を実施例 1 に記載の方法で続けた。次に、メンブレンに吸着された第 V I I I 因子を、浸透圧重量モル濃度が 1400 ~ 1700 mOsm/Kg に達するまで塩化ナトリウムを加えてイオン強度値を増加させた pH = 6.9 ~ 7.1 の塩基性緩衝液を加えて溶出させた。第 V I I I 因子は塩化カルシウムを加えてイオン強度値を高くした pH = 6.0 の緩衝液で溶出するのが好ましい。

40

精製ダイアグラムは [図 2] に示してある。

【 0 1 2 9 】

結果

50

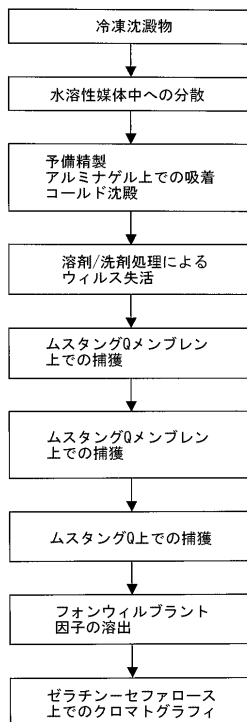
【表 2】

第 VIII 因子の精製

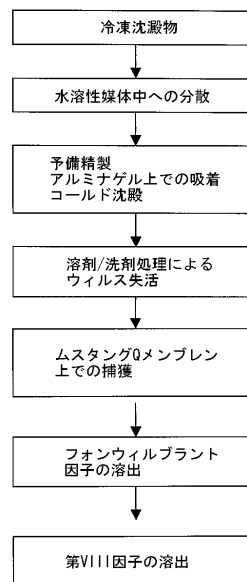
段階	収率 (%)	比活性 (IU/mg)
初期 冷凍沈殿物	100	0.38
ムスタング Q XT5 カプセル上での精製段階	≥45 (40~60)	≥110

10

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 特表2004-512539(JP,A)
国際公開第2006/039588(WO,A1)
特開2005-239719(JP,A)
特表2002-501084(JP,A)
特表2001-509170(JP,A)
特表平11-509721(JP,A)
特開平05-097696(JP,A)
特表2010-505874(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-1/36
C07K 14/00-14/825
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
WPIDS/WPIX(STN)