

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第4250771号
(P4250771)

(45) 発行日 平成21年4月8日 (2009.4.8)

(24) 登録日 平成21年1月30日 (2009.1.30)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/755 (2006.01)

C O 7 K 14/745 (2006.01)

C O 7 K 1/18 (2006.01)

A 6 1 P 7/04 (2006.01)

C O 7 K 14/755

C O 7 K 14/745

C O 7 K 1/18

A 6 1 P 7/04

請求項の数 6 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願平10-537060	(73) 特許権者	バクスター・イノベーションズ・ゲゼルシ ャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフ ツング
(86) (22) 出願日	平成10年2月27日 (1998.2.27)		オーストリア、アー—1 2 2 1 ヴィーン、 インダストリーシュトラセ 6 7 番
(65) 公表番号	特表2001-517212 (P2001-517212A)	(74) 代理人	弁理士 青山 篠
(43) 公表日	平成13年10月2日 (2001.10.2)		
(86) 国際出願番号	PCT/AT1998/000043	(74) 代理人	弁理士 田村 恭生
(87) 国際公開番号	W01998/038220		
(87) 国際公開日	平成10年9月3日 (1998.9.3)	(74) 代理人	弁理士 齋藤 みの里
審査請求日	平成17年2月24日 (2005.2.24)	(72) 発明者	ミッテラー, アルトゥール
(31) 優先権主張番号	A338/97		オーストリア、アー—2 3 0 4 マンスドル フ 1 1 6
(32) 優先日	平成9年2月27日 (1997.2.27)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	オーストリア (AT)		

(54) 【発明の名称】 カチオン交換クロマトグラフィーによる因子 V I I I / v W F 複合体の精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タンパク質溶液由来の因子 V I I I / v W F 複合体を塩濃度
 $\leq 250 \text{ mM}$

でカチオン交換体と結合させ、塩濃度
 $\geq 250 \text{ mM}$ から $\leq 300 \text{ mM}$

の範囲で、低分子 v W F 多量体を含有する因子 V I I I / v W F 複合体、血小板凝集 v W
F 活性のない因子 V I I I および因子 V I I I : C を溶出させ、特に高分子 v W F 多量体
を含む因子 V I I I / v W F 複合体を、塩濃度
 $\geq 300 \text{ mM}$

好ましくは
 $\geq 350 \text{ mM}$

での段階的フラクション化によって回収することを特徴とする因子 V I I I / v W F 複合
体の回収方法。

【請求項 2】

特に低分子 v W F 多量体および v W F 分解産物、複合体形成していない因子 V I I I また

は vWF と弱く結合している因子 $VIII$ 、および混入核酸を含まない、因子 $VIII/vWF$ 複合体を含有するフラクションを回収することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

pHが4.5から8.5、好ましくは

≥ 7.1 から ≤ 8.5

の範囲の緩衝液系で、カチオン交換体からポリペプチドを溶出させることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

カチオン交換体がスルホプロピル基を有する担体またはカルボキシメチル基を有する担体であることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載の方法。

10

【請求項5】

特に高分子 vWF 多量体を含む因子 $VIII/vWF$ 複合体を回収することを特徴とする請求項1から4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

血漿、血漿フラクション、クリオ沈降物、組換え細胞培養物の細胞を含まない上清または抽出物から、あるいは濃縮されたタンパク質溶液から因子 $VIII/vWF$ 複合体を回収することを特徴とする請求項1から5のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、カチオン交換クロマトグラフィーおよび段階的溶出によって、生物学的出発物質から因子 $VIII/vWF$ 複合体を精製する方法、ならびに特に高分子 vWF 多量体を含む精製された因子 $VIII/vWF$ 複合体に関する。

20

フォンビルブラント因子は、5から10mg/Lの濃度で、主に因子 $VIII$ との非共有結合複合体の形態で血漿中を循環している。クリオ沈降物（クリオプレシピテート）中では、因子 $VIII/vWF$ 複合体が非常に豊富であり、そこから、あるいは血漿から、あるいは血漿フラクションから既知のフラクション化法によって単離することができる。

血友病では、ある血漿の血液凝固因子の欠如によって血液凝固が損なわれている。血友病Aにおいて、出血しやすいのは因子 $VIII$ または vWF の欠如のせいである（表現型血友病）。血友病Aは主に、失われている凝固因子を因子の濃縮液で置換すること、例えば因子 $VIII$ または因子 $VIII/vWF$ 複合体を注入することによって処置される。

30

vWF と複合体形成した精製された因子 $VIII$ は、血友病Aの患者の処置に用いるのに望ましいばかりでなく、フォンビルブラント症候群の処置用にも望ましい（Berntorp, 1994, Haemostasis 24:289-297）。特に、 vWF を欠くか、あるいは低い含量しか有さない調製物では、出血時間の増加および因子 $VIII:C$ の半減期の減少がインビボで観察され得ることが繰り返し強調されてきた。因子 $VIII$ が排除される割合を減少させ、ならびに内因性の因子 $VIII$ の放出を助けることによって血漿中の因子 $VIII$ の濃度を維持するために、インビボの vWF を正常化することは重要である（Lethagen et al., 1992, Ann. Hematol. 65: 253-259）。

DE 3 504 385には、因子 $VIII$ 複合体を硫酸基を介して結合させ、クエン酸緩衝液、塩化カルシウムおよびNaCl濃度勾配で溶出させる因子 $VIII/vWF$ 複合体を精製するためのイオン交換クロマトグラフィーの実行方法が記載されている。ここでは、0.5M NaClの濃度で因子 $VIII/vWF$ 複合体を担体から溶出させている。

40

EP 0 416 983には、塩化バリウムまたは水酸化アルミニウム沈降およびDEAEフラクトゲルのアニオン交換クロマトグラフィーの組み合わせによって因子 $VIII/vWF$ 複合体をヒト血漿から回収する方法が記載されている。

Harrisonら（Thrombosis Res., 1988; 50, 295-304）は、デキストラン - 硫酸 - セファロスクロマトグラフィーによる因子 $VIII/vWF$ 複合体の精製方法について記載している。

EP 0 600 480には、アニオン交換/カチオン交換クロマトグラフィーの組み合わせによる全血漿からの因子 $VIII/vWF$ 複合体用の精製方法を記載している。ここで

50

は、pH 6.6 から 7.0 の 0.3 M NaCl を有する Ca を含む緩衝液を用いて、カチオン交換体に吸着した FVII/VWF 複合体の溶出を行っている。

WO 96/10584 には、アニオン交換/ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーの組み合わせによる高度に精製された組換え vWF の回収方法が記載され、EP 0705846 には、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーによる組換え vWF の高分子フラクションおよび低分子フラクションの分離方法が記載されている。

先行技術分野で大部分まで記載されている因子 VII 調製物は、完全な vWF 多量体パターンを含むが、高分子 vWF (HMW-vWF) および低分子 vWF (LMW-vWF) の割合 (比率) に関して変化し、また、いわゆるトリプレット構造を示し、特に HMW-vWF のタンパク質分解を示す。それによりこれらの調製物の安定性は制限されることが多い。

実質的に HMW-vWF を含む因子 VII/VWF 調製物は、vWF の主要な機能である血小板凝集を行い、血小板レセプター糖タンパク質 IB および IIb/IIIa に対して低分子 vWF 多量体より高いアフィニティを有するので、出血時間にポジティブな影響を与え得ることが繰り返し強調されてきた。

因子 VII : C 活性および vWF 活性の十分な比活性を有する因子 VII 複合体に対する要望が存在している。このような複合体の回収に関する問題は、特に低分子 vWF 多量体を含む分子を分離し、高い特異的 vWF 活性 (vWF 比活性) を有する複合体を豊富にすることである。

したがって、改良された比活性および安定性を有する因子 VII/VWF 複合体を提供することが本発明の目的である。

上記因子 VII/VWF 複合体の回収方法を提供することがさらなる目的である。この方法は組換えおよび血漿因子 VII/VWF 複合体いずれの精製にも用いることができる。

本発明にしたがい、タンパク質溶液由来の因子 VII/VWF 複合体をカチオン交換体と結合させ、改良された特異的 vWF 活性を有する因子 VII/VWF 複合体を段階的フラクション化溶出によって回収する因子 VII/VWF 複合体の回収方法を提供することでこの目的が達成される。特に、低塩濃度で因子 VII/VWF 複合体を結合させ、段階的に塩濃度を上げることによって、中塩濃度で、低分子 vWF 多量体、不活性な vWF 分解産物および非特異的な付随タンパク質を有する因子 VII/VWF 複合体を含むフラクションを分離し、より高い塩濃度で、特に高分子 vWF 多量体を含む因子 VII/VWF 複合体を含むフラクションを回収することで、改良された活性および安定性を有する因子 VII/VWF の回収および濃縮が行われる。

その酸性等電点 (IEP = 5.5 ~ 6) およびその結果としての正味の負電荷のため、通常、弱酸性から塩基性環境下、正に帯電しているアニオン交換体によって因子 VII/VWF 複合体を精製する。このように、従来、正に帯電しているアニオン交換体による因子 VII/VWF 複合体の精製方法が記載されているため、複合体の IEP より上の pH かつ低塩濃度で、因子 VII/VWF 複合体がカチオン交換体の負に帯電しているゲルマトリックスに結合し、塩濃度を上げることによってそれから選択的に溶出可能であることは予測できないことであった。塩濃度

>約 250 mM から <300 mM

の範囲で段階的に溶出させることによって、非特異的な付随タンパク質、不活性な vWF 分解産物、低い比活性を有する複合体成分、低分子 vWF 多量体を含む因子 VII/VWF 複合体、複合体形成していないか、あるいは弱く結合しているだけの因子 VII および遊離の因子 VII を溶出させ、塩濃度

>300 mM

で、特に高分子 vWF 多量体を有する因子 VII/VWF 複合体が得られることも予測できないことであった。

本発明の方法を用いて、不純な生物学的物質から出発し、核酸が実質的に混入していない精製されたフラクションを得ることも本発明の範囲内に認められた。それにより、本発明の方法によればタンパク質調製物から核酸をも除去される。アニオン交換体による慣用の

10

20

30

40

50

方法では、核酸がその負の電荷のためにアニオン交換体に結合し、塩濃度を上げるとアニオン交換体から再び脱着し、溶出液に入るため、この効果を示すことができない。

因子ⅤⅠⅠⅠ / ⅴⅡⅢ複合体を精製する場合、500000から数百万のⅴⅡⅢのサイズのせいで、用いる担体物質中での因子ⅤⅠⅠⅠ / ⅴⅡⅢ複合体の拡散および分配を妨げないような担体物質のみが良好な精製および良好な収率をもたらすことに特に注意を払わなければならない。カチオン交換体によって高い比活性の因子ⅤⅠⅠⅠ / ⅴⅡⅢ複合体の精製を行う本発明の方法を実行する場合、高いローディング容量を有し、扱うのに丈夫であり、はっきりした溶出プロファイルをもたらし、工業規模で経済的に用いることができるゲルマトリックスを用いる。したがって、本発明の方法は、精製された因子ⅤⅠⅠⅠ / ⅴⅡⅢ複合体を大量工業規模で回収するために特に興味深い。

10

本発明の実施には、すべての既知のカチオン交換体を用いることができ、このカチオン交換体はスルホプロピル基またはカルボキシメチル基を有する担体であるのが好ましい。例えば、SP - セファロース^R Fast FlowおよびCM - セファロース^R Fast Flow (Pharmacia)、フラクトゲル^R EMD - SO3およびフラクトゲル^R EMD COOH (Merck)、Poros^R 10 SPおよびPoros^R 10 S (Perseptive Biosystems) およびトヨパール (Toyoparl)TM SP 550 CおよびトヨパールTM CM - 650 (M) (TosoHass) は非常に適していることがわかっている。

フラクトゲル^R EMD - SO3およびフラクトゲル^R EMD COOH (Merck) のタイプのテントクル (tentacle) 構造を有する多孔性のゲルは精製されたⅴⅡⅢの回収に特に適当であることがわかっている。

20

緩衝液中の塩濃度

≤ 250 mM

で、因子ⅤⅠⅠⅠ / ⅴⅡⅢ複合体はカチオン交換体に好ましく吸着する。これゆえ、好ましい吸着緩衝液は50から250 mM、特に150 - 250 mMの範囲の塩濃度 (例えば150 mM) を有する。緩衝液の塩濃度を段階的に上げることによって、特に高分子ⅴⅡⅢ多量体を含む因子ⅤⅠⅠⅠ / ⅴⅡⅢ複合体を塩濃度

≥ 300 mM、

好ましくは

≥ 350 mM

で選択的に溶出させることができる。タンパク質溶液に含まれ、ⅴⅡⅢ活性、特にリストセチン補因子活性に関して、低い比活性を有し、コラーゲン結合活性を有し、ならびに特異的な血小板凝集活性を有する、低分子ⅴⅡⅢ多量体およびⅴⅡⅢタンパク質分解産物を含有する因子ⅤⅠⅠⅠ / ⅴⅡⅢ複合体および遊離の因子ⅤⅠⅠⅠ : Cを、塩濃度

30

≥ 250 mMから ≤ 300 mM、

好ましくは300 mMでカチオン交換体から溶出させ、所望により回収する。このフラクション、特に血小板凝集ⅴⅡⅢ活性を有さないものを、例えば因子ⅤⅠⅠⅠ : Cのさらなる精製用に用いることができる。

塩として一価または二価の金属イオンを含む緩衝液中で、因子ⅤⅠⅠⅠ / ⅴⅡⅢの吸着および脱着を行うことができ、塩としてはNaClを用いるのが好ましい。

本発明の方法では、カチオン交換体と結合したタンパク質を溶出させるための緩衝液系として、緩衝物質、特にグリシン、リン酸緩衝液またはクエン酸緩衝液、および塩からなる緩衝溶液を用いる。

40

溶出緩衝液はpH 4.5から8.5、好ましくはpH

≥ 7.0から ≤ 8.5

の範囲のpHを有し得る。

本発明の方法はバッチ法として、あるいはカラムクロマトグラフィーとして行うことができる。

しかし、本発明の方法を行うのに最適なパラメーター、例えば塩濃度、pHおよび温度はそれぞれ用いるカチオン交換体物質に依存する。しかし、個別に用いられるカチオン交換体タイプについて、本方法を実行するために本発明の範囲内で開示されている条件を最適

50

化することは、当業者の一般的知識の範囲内である。

特に、本発明の方法によって、特に高分子vWF多量体を含む因子V I I I / v W F 複合体を回収し、濃縮する。

回収された因子V I I I / v W F 複合体フラクションは、低分子vWF多量体、比活性が低いvWF断片および混入核酸を実質的に含まない。

本発明の方法によって精製された因子V I I I / v W F 複合体を回収するため、任意の因子V I I I 複合体含有溶液を出発物質として用いることができる。出発物質は、特に血漿、血漿フラクション、クリオ沈降物または組換え細胞培養物の上清または抽出物のような生物学的物質である。

しかし、因子V I I I / v W F 複合体を含有する溶液はまた、前精製工程、例えばゲルろ過、アニオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーまたはそれらの組み合わせによって前精製され、あるいは濃縮(enriched)されたタンパク質に富む溶液であり得る。

本発明の方法の特定態様では、アニオン交換体によって濃縮した因子V I I I / v W F 複合体を含有するフラクションを出発溶液として用いる。続くカチオン交換クロマトグラフィーでは、高分子または低分子vWF多量体を含む因子V I I I / v W F 複合体の精製および分離を行う。しかしまた、アフィニティー/カチオン交換クロマトグラフィー、アニオン交換/アフィニティー/カチオン交換クロマトグラフィーのような他の組み合わせでも、改良された比活性および安定性を有する因子V I I I / v W F の濃縮および選択的回収を達成することができる。

本発明の上記方法によって、改良された比活性を有する因子V I I I / v W F は、不純な因子V I I I / v W F 複合体含有物質から数倍濃縮される。

原則として、あらゆる生物学的物質に感染性の病原体が混入し得るので、得られた因子V I I I / v W F 複合体含有フラクションに対して、ウイルスを不活化または涸渇するための処理を行い、ウイルスに関して安全な調製物を生産する。この目的のために、先行技術分野に既知のすべての方法、例えば化学的/物理的方法、光活性化物質と光の組み合わせによる不活化、またはろ過による涸渇を用いることができる。特に、脂質包膜ウイルスおよび非脂質包膜ウイルスの両方を確実に不活化できる、溶液または固体状態での熱処理は、ウイルスの不活化に適當である。ウイルスの涸渇はナノフィルターでのろ過によって行うのが好ましい。

さらなる側面では、本発明は、カチオン交換クロマトグラフィーによって因子V I I I / v W F 含有溶液から得ることができる、特に高分子vWF多量体を含む精製された因子V I I I / v W F 複合体を提供する。低い純度および低い比活性の因子V I I I / v W F を含有する出発物質から出発して、好ましくは少なくとも66U/タンパク質mgの高い特異的vWF活性を有し、ならびに好ましくは少なくとも500U/タンパク質mgの高い因子V I I I 比活性を有する因子V I I I / v W F を濃縮し、付随タンパク質、特に結合していないか、あるいは弱く結合しているだけの、遊離の因子V I I I、または低vWF活性を有する因子V I I I 複合体を選択的に分離する。それにより、高分子vWF多量体を含み、低分子vWF多量体との因子V I I I 複合体、vWF分解産物、複合体形成していない因子V I I I ならびにおそらく因子V I I I aを実質的に含まない、因子V I I I / v W F 複合体を回収する。高分子vWF多量体を選択的に濃縮するおかげで、本発明の因子V I I I / v W F 複合体は改良された血小板凝集活性および高い安定性を有する。

さらなる側面では、カチオン交換クロマトグラフィーおよび塩濃度

$\geq 200\text{mM}$ から $\leq 300\text{mM}$

の範囲での段階的溶出によって、因子V I I I / v W F を含有する溶液から得ることができる、血小板凝集性vWF活性を実質的に有さない因子V I I I : Cを提供する。

さらなる側面では、特に高分子vWF多量体を含む因子V I I I / v W F 複合体、または血小板凝集vWF活性を実質的に含まない因子V I I I : Cを含有する精製された調製物を提供する。

血漿または組換え起源の出発物質を用いて本発明の調製物を回収および生産する場合、所

10

20

30

40

50

望により上記のウイルスの涸渇 / または不活化法を行って、感染性粒子を除去する。原理的には、出発物質から出発し、生産された医薬調製物までの各精製工程の前または後において、ウイルスの不活化および / またはウイルスの涸渇を行うことができる。それにより、いずれにしても、本発明の調製物はウイルスに関して安全であり、いかなる感染性物質をも含まないであろう。

また、生成物の純度および低い感染性についてのさらなる基準は、核酸が混入していないことである。したがって、本発明の調製物は実質的に核酸を含まない。ここで「実質的に」とは、 $260 / 280 \text{ nm}$ の比を基準にして、核酸含量が

≤ 0.7

であることを意味する。しかしまた、例えばEP 0 714 987およびEP 0 714 988に記載されている方法にしたがい、核酸を定量することもできる。

さらなる側面では、本発明の調製物は保存安定形態で存在する。改良された特異的vWF活性を有する精製された因子VIII / vWFを含む調製物を、溶液用調製物、凍結乾燥物、または急速冷凍状態で提供することができる。本調製物はその純度のために特に安定である。本発明の調製物は -20 で少なくとも6月、溶液中4 で少なくとも4週間および凍結乾燥物として少なくとも1年間安定であることが示されている。各期間内に因子VIII / vWF活性は最大10%減少するだけであり、vWF多量体の多量体パターンはいかなる実質的な変化をも示さない。

本発明の調製物の製剤化は既知の慣用方法により行うことができる。本発明の調製物中に含まれる精製された因子VIII / vWFを塩、例えばNaCl、クエン酸三ナトリウム二水和物および / またはCaCl₂、およびアミノ酸、例えばグリシンおよびリシンを含み、pH範囲が6から8の緩衝液と混合し、医薬調製物に製剤化する。

血友病、表現型（遺伝子発現型）血友病およびvWDの患者の処置用薬物を生産するために本調製物を用いることができる。

さらなる側面では、本発明は、血漿または血漿フラクションから因子VIII / vWF複合体調製物を調製する方法であって、血漿または血漿フラクションをカチオン交換体と接触させ、それにより因子VIII / vWF複合体を吸着させ、因子VIII / vWF複合体を載せたカチオン交換体を所望により洗浄し、次いで因子VIII / vWF複合体を溶出させ、血漿を基準にして、因子VIII / vWF複合体に関し、少なくとも300倍の純度および少なくとも50%の因子VIII / vWF複合体の収率を有する溶出液を得、次いで得られた溶出液を処理して因子VIII / vWF複合体調製物にすることを特徴とする方法に関する。

驚くべきことに、因子VIII / vWF複合体は、血漿または血漿フラクションから出発し、カチオンクロマトグラフィーによって高い純度と同時に高い収率で提供され得ることが本発明の過程で認められた。

血漿フラクションとして、例えばプロトロンビン複合体を除去する前吸着処理後のクリオ沈降物またはコーン（Cohn）フラクションを用いる。

本方法は、効率的な精製のおかげで、大部分のさらなる精製工程、例えばさらなるクロマトグラフィー精製工程を必要としないため、因子VIII複合体を血漿フラクションから工業規模で精製するのに非常に適している。驚くべきことに、単純なカチオン交換クロマトグラフィーによって、血漿と比べて少なくとも300倍の純度、好ましくは少なくとも400倍の純度、と同時に血漿を基準にして少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%の高い収率で因子VIII複合体を得ることができることが示されている。したがって、精製手順は、単一のクロマトグラフィー精製、すなわちカチオン交換体でのクロマトグラフィー精製のみを行うように設計されるのが好ましい。通常、最終精製工程としてこのクロマトグラフィー精製を行い、その後因子VIII複合体を医薬調製物に製剤化する。

通常、カルシウム含有緩衝液中、出発物質をカチオン交換体にアブライする。そのアブライ直前に、潜在的に存在するウイルス、例えば血液を介して感染可能なヒト病原性ウイルスの不活化について測定することも想定できる。このために、殺ウイルス性の界面活性剤

、または有機溶媒および/または界面活性剤で処理することが好ましい。例えばE P O 1 3 1 7 4 0 にしたがひ、T N B P (リン酸トリ(n - プチル))の存在下、トリトンまたはトゥーンで処理する。続くカチオン交換クロマトグラフィーによって、効果的に殺ウイルス剤を除去する。吸着させた複合体を洗浄する場合、該洗浄は、イオン強度が吸着緩衝液よりも、例えば10 - 30 % 高い洗浄緩衝液を用いて行うのが好ましい。因子V I I I / v W F 複合体を溶出するためには、イオン強度をさらに高くするのが好ましい。好ましくは、出発溶液のイオン強度と比べて少なくとも50 %、最も好ましくは少なくとも100 % イオン強度を高くすることによって、因子V I I I / v W F 複合体の溶出を行う。溶出緩衝液は塩化ナトリウムを含むのが好ましい。因子V I I I / v W F 複合体の医薬調製物を製剤化するため、通常、ダイアフィルトレーション(diafiltration)、滅菌

10

る過および所望により凍結乾燥を行う。カチオン交換クロマトグラフィーは因子V I I I またはv W F の活性にほとんど影響しない。因子V I I I 複合体の収率がクロマトグラフィー前の活性を基準にして確実に90 % 以上であることがわかっている。それゆえ、慣用の因子V I I I の安定化剤、例えば抗トロンピンI I I および/またはヘパリンを用いずに、クロマトグラフィー精製を行うことができる。

常に、あらかじめ精製された因子V I I I / v W F 複合体調製物に関してのみ、カチオン交換クロマトグラフィーを考慮している先行技術分野の既知の方法(E P O 6 0 0 4 8 0 A 2 参照)とは対照的に、本発明では、カチオン交換クロマトグラフィーが血漿または(粗製の)血漿フラクションから因子V I I I / v W F 複合体を直接精製するのに非常

20

に適することが示された。上記方法を用いた場合、血漿または血漿フラクションから出発し、カチオン交換クロマトグラフィーによって達成される純度はすでに市販の因子V I I I / v W F 複合体調製物に対するあらゆる要求を満たしているので、因子V I I I / v W F 複合体調製物を製造するためのさらなるクロマトグラフ法を提供する必要さえない。

以下の実施例および図面によって本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの例示的態様に限定されるべきではない。

図1は、カチオン交換体での精製前および後におけるクリオ沈降物からの因子V I I I / v W F 複合体のv W F 多量体分析を表し；
図2は、アニオン/カチオン交換クロマトグラフィーの組み合わせによる精製前および後におけるクリオ沈降物からの因子V I I I / v W F 複合体のv W F 多量体分析を表す。

30

実施例1：

カチオン交換クロマトグラフィーによる血漿F V I I I 複合体の精製

ヒト血漿由来のクリオ沈降物をp H 7 の酢酸ナトリウム緩衝液に溶解し、溶液1 m L 当たり20 ユニットのヘパリンを加えた。クリオ沈降物1 g 当たり2 % A 1 (O H)₃ 懸濁液0 . 25 m L を加え、30 分間インキュベートした。次いで、10 000 r p m で20 分間遠心し、濁りのないクリオ沈降物を得た。

40

クロマトグラフィーカラムにフラクトゲル^R E M D - S O 3 を充填し、これを緩衝液(30 m M グリシン - N a C l 緩衝液)ですすいだ。次いで、溶解したクリオ沈降物をカチオン交換カラムを通してろ過し、交換体に結合しないタンパク質を流出液中に得た(フラクション1)。緩衝液中の0 . 3 M N a C l でこのカラムをすすぎ、非特異的に結合したタンパク質を除去した(フラクション2)。次いで、それぞれ0 . 4 M および0 . 5 M N a C l で溶出を行い、交換体カラムからF V I I I / v W F 複合体を溶出させた(それぞれフラクション3 およびフラクション4)。

v W F およびF V I I I が両方ともカチオン交換体と結合することは表1 から明らかであ

50

る。カチオン交換体カラムを0.3 M NaClですすいだ（フラクション2）が、vWFを全く得ることができず、10%のFVIII活性しか得られなかった。この溶出工程では、機能的に活性なvWFとの複合体として存在しないFVIIIを分離した。次いで0.4 M NaClによって脱着させ（フラクション3）、機能的に活性なvWF約20%およびFVIII総量の約30%を含むFVIII/vWF複合体を得た。次いで、500 mM NaClによって、残留するFVIII複合体をカチオン交換体から溶出させた（フラクション4）。フラクション4は、クリオ沈降物から出発して、vWF活性の80%およびFVIII活性の50%を含む因子FVIII/vWF複合体を含んでいた。カチオン交換クロマトグラフィーによって、クリオ沈降物と比べてFVIIIの20倍精製（比活性：FVIII：C12IU/タンパク質mg）および血漿を基準にしてFVIIIの350倍精製が達成された（フラクション4）。フラクション3からFVIIIを回収することができる。

図1は、カチオン交換体での精製前および後の因子FVIII/vWF複合体のvWF多量体分析を示し、レーンAはクリオ沈降物の、レーンBは300 mM NaCl溶出液（フラクション2、表1）の、レーンCは400 mM NaCl溶出液（フラクション3、表1）の、レーンDは500 mM溶出液（フラクション4、表1）の、vWF多量体パターンを示す。図1から、カチオン交換クロマトグラフィーによって、高分子vWF多量体構造を有する因子FVIII/vWF複合体が得られることは明らかである。低分子vWF多量体を有する因子FVIII/vWF複合体はカチオン交換体に結合しない（フラクション1）か、あるいは0.3 M NaClでの溶出で分離する（フラクション2）。

表1：カチオン交換クロマトグラフィーによるクリオ沈降物からのFVIII

／vWF複合体の精製

サンプル	vWF:Risto-CoF 活性 (U/mL)	FVIII:C 活性 (U/mL)
クリオ沈降物	2.2	2.4
フラクション1 (結合せず)	0	0
フラクション2 (300mM NaCl 溶出液)	0	0.1
フラクション3 (400mM NaCl 溶出液)	1.8	3.6
フラクション4 (500mM NaCl 溶出液)	1.8	1.5

実施例2：

アニオン／カチオン交換クロマトグラフィーの組み合わせによる血漿FVIII/vWF複合体の精製

ヒト血漿のクリオ沈降物をpH6.7の7 mMトリス、100 mM酢酸ナトリウム、100 mMリシン、120 mM NaClの緩衝液に溶解させた。前処理としてAl(OH)₃を攪拌しながら加えた。次いでこの沈降物を遠心して分離した。

このように前処理したクリオ沈降物をフラクトゲル[®] EMD-TMAEのカラムにアプライした。このカラムを溶液緩衝液ですすぎ、非結合タンパク質を得た（フラクション1）。このフラクションはvWF活性の60%を含んでいたが、FVIII活性のほんの10%しか含んでいなかった。次いで400 mM NaClでこのカラムからの溶出を行い（フラクション2）、FVIII/vWF複合体を得た。フラクション2は、クリオ沈降物から出発して、残りのvWF活性およびFVIII活性の70%を含んでいた。

表2：アニオンおよびカチオン交換クロマトグラフィーの組み合わせによるF V

I I I / v W F 複合体の精製

サンプル	vWF:Risto-CoF活性 (U/mL)	FVIII:C活性 (U/mL)
クリオ沈降物	1 2. 5	1 2. 2
フラクション1 (結合せず)	3. 5	0. 7
フラクション2 (400mM NaCl 溶出液)	2. 5	1 4. 5

10

フラクション2のF V I I I / v W F 複合体を20mMグリシン / N a C l 緩衝液で4倍希釈し、次いでフラクトゲル[®] E M D - S O 3 のカチオン交換カラムにアプライした。非結合タンパク質をフラクション1中に得た。このカラムを200mM N a C l ですすぎ、弱く結合したタンパク質を除去した(フラクション2)。次いで400mM N a C l (フラクション3)および500mM N a C l (フラクション4)で段階的に溶出させた。フラクション3および4には、それぞれv W F 活性45%およびF V I I I 活性55%または40%が認められた。

表3：アニオンおよびカチオン交換クロマトグラフィーの組み合わせによるF V

I I I / v W F 複合体の精製

20

サンプル	vWF:Risto-CoF活性 (U/mL)	FVIII:C活性 (U/mL)
出発物質	0. 6 3	3. 6
フラクション1 (結合せず)	0	0
フラクション2 (200mM NaCl 溶出液)	0	0
フラクション3 (400mM NaCl 溶出液)	0. 3	2. 2 6
フラクション4 (500mM NaCl 溶出液)	0. 2 5	1. 4 3

30

表3から、v W F およびF V I I I の両者がカチオン交換体と結合することは明らかである。このカチオン交換体カラムを0.2M N a C l ですすいだ(フラクション2)がv W F およびF V I I I は全く認められなかった。次いでF V I I I / v W F 複合体をフラクション3および4中に溶出させた。

クリオ沈降物中のF V I I I : C の比活性は0.59U / タンパク質mgであったが、フラクション3およびフラクション4中のF V I I I : C の比活性はそれぞれ500U / タンパク質mgおよび477U / タンパク質mgであった。クリオ沈降物から出発してフラクション3および4中では、v W F の比活性は0.6U / タンパク質mgから66U / タンパク質mgおよび83U / タンパク質mgに上がった。

40

図2は、アニオン / カチオン交換クロマトグラフィーの組み合わせによる精製前および後の因子V I I I / v W F 複合体のv W F 多量体分析を示し、レーンaからcはアニオン交換体でのクロマトグラフィーを示し、レーンdからgはカチオン交換体でのクロマトグラフィーを示す。図2のレーンaはクリオ沈降物の、レーンbは流出液(フラクション1、表2)中の、レーンcは400mM N a C l 溶出液(フラクション2、表2)中の、レーンdはカチオン交換体前の400mM N a C l 溶出液(フラクション2、表2)中の、レーンeは200mM N a C l 溶出液(フラクション2、表3)中の、レーンfは4

50

0 0 m M N a C l 溶出液 (フラクション 3 、 表 3) 中の、ならびにレーン g は 5 0 0 m M N a C l 溶出液 (フラクション 4 、 表 3) 中の、v W F 多量体パターンを示す。

実施例 3 :

カチオン交換クロマトグラフィーによる r v W F / r F V I I I 複合体の精製 (現時点で発明者らが、本発明の最良の実行方法であると考えているもの)

組換え r F V I I I / r v W F 複合体を含む細胞培養上清 1 0 0 0 m L を、フラクトゲル^R T S K - S O 3 2 0 m L を充填したカラムにアプライした。2 5 0 m M N a C l を含む p H 7 . 4 の緩衝液でこのカラムを洗浄した後、6 0 0 m M N a C l を含む p H 7 . 4 の緩衝液によって結合した r F V I I I / r v W F 複合体を溶出させた。表 4 にこのカラムの溶出結果を示す。

表 4 : カチオン交換クロマトグラフィーによる組換え r F V I I I / r v W F

複合体の精製

サンプル	FVIII:C活性 (U/mL)	vWF:Risto-CoF活性 (U/mL)
出発物質	2 . 3	0 . 1
流出液	0 . 1	0
250mM NaCl 溶出液	0 . 2	0
600mM NaCl 溶出液	8 5	4 . 4

この実施例は、(通常、組換え F V I I I の発酵時に生じる) 組換え F V I I I および組換え v W F からなる複合体がカチオン交換体と結合し、塩濃度を上げることにより、付随タンパク質から分離して選択的に溶出し得ることを示す。

この実施例では、特異的 F V I I I 活性 1 3 0 U / タンパク質 m g を有する r F V I I I / r v W F 複合体を収率 7 5 % で得た。これはこの工程での 2 8 倍精製に相当する。r v W F の比活性は発現される r v W F の質に大きく依存している。この例では、溶出液中 7 U / m g であり、3 5 倍精製に相当した。

出発物質中の r F V I I I / r v W F の関係を変化させることによって、あるいはさらなるクロマトグラフィー工程にかけることによって F V I I I : C の比活性をさらに改良することができる。

実施例 4 :

カチオン交換による因子 V I I I / v W F 複合体の単離

実施例 4 A :

クリオ沈降物 2 1 0 g を C a C l ₂ - ヘパリン含有クエン酸緩衝液 9 5 0 m L に溶解させ、p H 6 . 0 に調節する。

不溶性物質、主にフィブリノーゲンを分離した。存在する可能性がある病原性ウイルスを不活化するため、透明な溶液を 1 % トリトン X 1 0 0 および 0 . 3 % T N B P (リン酸トリ (n - ブチル)) で処理した。

伝導度 1 0 m S / c m の酢酸緩衝化 N a C l 溶液 p H 6 . 0 中で前もって平衡化しておいた Merck Darmstadt (D E) のフラクトゲル E M D - S O ₃⁻ - 6 5 0 (M) 1 0 0 m L を用

い、ウイルスを不活化した F V I I I を吸着させた。
1 5 0 m M N a C l 溶液 5 0 0 m L で前もって洗浄し、イオン強度を 5 0 0 m M N a C l に増加させることによって、F V I I I をゲルから溶出させた。

実施例 4 B :

この実施例では、フラクトゲル E M D - S O ₃⁻ の代わりにトヨパール S P - 5 5 0 C を用いた。

結果

	収率／血漿		血漿と比べた純度
	F V I I I c	F v W F	
実施例 4 A	6 2 %	6 8 %	4 5 0 ×
実施例 4 B	5 6 %	6 2 %	3 7 0 ×

同じフラクションに F V I I I c および F v W F を回収した。

【図 1】

A B C D



FIG. 1

【図 2】

a b c d e f g

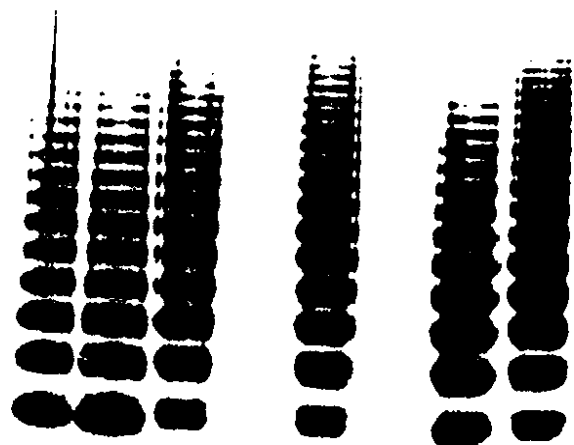


FIG. 2

フロントページの続き

- (72)発明者 フィッシャー, ベルンハルト
オーストリア、アー 1160 ヴィーン、ヴィルヘルミネンシュトラッセ95 / ツェー / 17番
- (72)発明者 シェーンベルガー, エーイヴィント・エル
オーストリア、アー 1180 ヴィーン、ショーペンハウアーシュトラッセ52 / 7番
- (72)発明者 トーマス - ウルバン, カトリン
ドイツ連邦共和国デー 79104 フライブルク、カルトイザーシュトラッセ149番
- (72)発明者 ドルナー, フリードリッヒ
オーストリア、アー 1230 ヴィーン、ペーターリニガッセ17番
- (72)発明者 アイブル, ヨハン
オーストリア、アー 1180 ヴィーン、グスタフ チェルマークガッセ2番

審査官 石丸 聡

- (56)参考文献 欧州特許出願公開第00600480 (EP, A1)
J. Biotech., vol. 11, pp. 223-234 (1989)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 14/755

C07K 1/18

C07K 14/745

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)