

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4574865号
(P4574865)

(45) 発行日 平成22年11月4日 (2010. 11. 4)

(24) 登録日 平成22年8月27日 (2010. 8. 27)

(51) Int. Cl.	F 1
C O 7 K 1/18 (2006. 01)	C O 7 K 1/18
C O 7 K 1/20 (2006. 01)	C O 7 K 1/20
C O 7 K 14/59 (2006. 01)	C O 7 K 14/59
A 6 1 K 38/24 (2006. 01)	A 6 1 K 37/38

請求項の数 9 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2000-612334 (P2000-612334)	(73) 特許権者	501403508
(86) (22) 出願日	平成12年4月14日 (2000. 4. 14)		インスチテュート マッソーネ エス. エ
(65) 公表番号	特表2002-542260 (P2002-542260A)		イ.
(43) 公表日	平成14年12月10日 (2002. 12. 10)		アルゼンチン国、ブエノスアイレス、アリ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/003357		アス 4 4 3 1
(87) 国際公開番号	W02000/063248	(74) 代理人	100066692
(87) 国際公開日	平成12年10月26日 (2000. 10. 26)		弁理士 浅村 皓
審査請求日	平成19年4月16日 (2007. 4. 16)	(74) 代理人	100072040
(31) 優先権主張番号	60/129, 540		弁理士 浅村 肇
(32) 優先日	平成11年4月16日 (1999. 4. 16)	(74) 代理人	100107504
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安藤 克則
		(74) 代理人	100110803
			弁理士 赤澤 太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高度に精製されたゴナドトロピン組成物およびそれらの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的試薬またはクロマトグラフィー染料の使用に由来する異種夾雑物質を全く含まない高い生物活性および化学的純度を有するヒト尿ゴナドトロピンを粗製ゴナドトロピンから精製する方法において、任意の順序における以下の工程：

1) 上記粗製ゴナドトロピンを0.05～0.15 Mの酢酸アンモニウム、pH 5.0～6.0中に希釈し、スルホプロピル型の強力な陽イオン樹脂のイオン交換カラムに負荷し、0.05～0.5 Mの酢酸アンモニウム、pH 5.0～7.0でFSHおよびLHの両者を溶出して精製する工程、

2) この分画を0.01～0.05 Mの酢酸アンモニウム、pH 5.0～7.0に希釈し、四級アンモニウム塩型の強力な陰イオン樹脂のイオン交換カラムに負荷し、0.05～0.2 Mの酢酸アンモニウム、pH 5.0～7.0でFSHおよびLHの両者を溶出して精製する工程、

3) ゴナドトロピンを、疎水性相互作用樹脂カラム中で以下の溶液の少なくとも2つ：

a) 50～200 mM リン酸ナトリウム、および0.8～1.2 M 硫酸アンモニウムの緩衝液、pH 5.0～6.0；

b) 50～200 mM リン酸ナトリウム、および0.4～0.6 M 硫酸アンモニウムの緩衝液、pH 5.0～7.0；

c) 50～200 mM リン酸ナトリウム (50～70%v/v)、およびエタノール96% (50～30%v/v) を順次添加して精製する工程、

を含む、上記方法。

【請求項 2】

10

20

工程1)における強力な陽イオン樹脂はSP-Sepharose 樹脂である、請求項1記載の精製方法。

【請求項3】

工程2)における強力な陰イオン樹脂はQ-Sepharose 樹脂である、請求項1記載の精製方法。

【請求項4】

工程3)における疎水性相互作用樹脂はフェニル-Sepharose 樹脂である、請求項1記載の精製方法。

【請求項5】

工程3)においてFSHゴナドトロピンは溶液bで溶出させ、LHゴナドトロピンは溶液cで溶出させ、添加順序はa, b, cである、請求項1記載の精製方法。 10

【請求項6】

FSH:LHのゴナドトロピンの比がほぼ1:1に等しい場合は、工程3)において添加順序a, cに従いゴナドトロピンは溶液cで溶出される、請求項1記載の精製方法。

【請求項7】

FSH:LHのゴナドトロピンの比が1:1ではない場合、工程3)において、さらに溶液bで溶出されるゴナドトロピンFSHの添加または溶液cによって溶出されるゴナドトロピンLHの添加を含み、添加順序はa, b, cに従う、請求項1記載の精製方法。

【請求項8】

上記粗製のゴナドトロピンは閉経期および／または閉経後の婦人の尿から得る、請求項1記載の精製方法。 20

【請求項9】

上記粗製のゴナドトロピンが40IU/mgを超えるFSH活性と、40IU/mgを超えるLH活性を有する、請求項1記載の精製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、ゴナドトロピン組成物、特に高い生物活性を有するFSH（卵胞刺激ホルモン、フォリトロピン）およびメノトロピン組成物、ならびに閉経期もしくは閉経後の婦人の粗製尿からこれらの組成物を製造する方法に関する。得られる化学的純度はHPLCで測定して 95%以上であり、一方、比生物活性はメノトロピン組成物（ヒト閉経期ゴナドトロピン；HMG）のFSHおよびLHホルモンの両者について2500 IU/mg タンパク質以上、FSHについて5000 IU/mg タンパク質以上である。 30

【0002】

(発明の背景)

「メノトロピン」の語は、2種の糖タンパク質ホルモン：卵胞刺激ホルモンおよび黄体形成ホルモンからなる閉経期および閉経後の婦人の尿から得られるホルモンに適用される。これらの2種のホルモンは下垂体から分泌され、ついで代謝を受けて、尿中に排泄される。

【0003】

メノトロピンおよびフォリトロピンは、ずっと以前から不妊性障害の処置に使用されてきた。 40

【0004】

FSHの役割は、卵胞に対する作用、それらの急速な成長および成熟それ続く排卵または萎縮消退の促進から構成される。FSHはまたLHとともに刺激された卵胞におけるエストラジオールの生合成にも関与する。内部の膜がLHのコントロール下にあるアンドロゲンの卵胞生合成の主要部位である。FSHに制御されて、このアンドロゲンはついで顆粒膜細胞において芳香化され、血流中に排泄される。したがって、LHは卵胞刺激にFSHとともに必須の構成成分である。

【0005】

下垂体ホルモンのFSHおよびLH、甲状腺刺激ホルモン（TSH）および胎盤ホルモン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（HCG）は、それらがすべてそれらの構造中に α および β と呼ばれる2つのサブユニットを有する糖タンパク質であることからきわめて類似している。両サブユニットとも非共有結合相互作用によって結合されている。これらのサブユニットは別個には生物活性をもたない。上記4つのホルモンの α 鎖は共通であるが、 β 鎖は異なり各ホルモンの特徴的な生物活性を提供する。しかしながら、 β 鎖の重要な部分はまた共通であり、これはとくにLHおよびHCGの β 鎖に観察することができる。

【0006】

ヒト尿から得られるゴナドトロピンは、注射可能な製品の要求に適合する生物安全性に到達するまで部分精製され、不妊の問題を解決するために30年以上前から市販されてきた。すなわち、注射用の医薬製剤の形態でそれらは世界の主要な局方の大部分に掲載され、実際に全世界のすべての国で医薬的使用が承認されている。

10

【0007】

フォリトロピン製剤の組成は次のように記載することができる：

－卵胞刺激ホルモン：FSH 75または150国際単位
－賦形剤（凍結乾燥過程に要求される、通常ラクトース5～20 mg）および他の不活性タンパク質。

【0008】

メノトロピン製剤の組成は次のように記載することができる：

－卵胞刺激ホルモン：FSH 75または150国際単位
－黄体形成ホルモン：LH 75または150国際単位
－賦形剤（凍結乾燥過程に要求される、通常ラクトース5～20 mg）および他の不活性タンパク質。

20

【0009】

FSHおよびLHの国際単位は世界保健機構（WHO）に属するNational Institute for Biological Standard and Control（NIBSC）によって作成された国際標準に比較して、ラットでの生物学的アッセイでの測定から計算される。

【0010】

米国局方（XXIII）または英国局方（BP）のような局方により注射用メノトロピンの製造に必要な出発原料の純度に関し賦せられた要求は、出発原料が40 IU/mg 以上のFSH活性および40 IU/mg 以上のLH活性から構成されることである。この点に鑑み、これまで使用されてきたそれらの出発原料は、生物安全性および有効性に関する限り保険機構によって賦せられた要求に合致するのに十分以上である70～150 IU FSH/LH/mgの範囲の活性が保証される製造方法によって得られている。

30

【0011】

しかしながら、精製技術の開発および組換え起源からのゴナドトロピンの開発がほとんどないことは、尿起源の高度に精製された、不純タンパク質を含まないネイティブなゴナドトロピン製剤の必要性に影響している。

【0012】

FSHおよびLHの精製方法がいくつかつい最近報告されている。

40

【0013】

EP 0 322 438 B1号および相当するUS特許5,128,453号；5,767,067号および5,840,857号は尿起源の高い比活性を有する卵胞刺激ホルモンの製造に言及している。しかしながら、これらの方法は特異的なモノクローナル抗体を用いる工程を包含する。安全性の見地から、この事実は宿主細胞およびウイルスからの異種タンパク質、DNA残留物を有する生成物の夾雑についてはある種の問題を提起する。方法の有効性および最終試験は夾雑の可能性を排除する助けになるものの、生物学的試薬の使用を回避するようにとくに設計された方法が、このタイプの精製工程を包含する方法よりも、高い安全性標準をもつと判断することは合理性がある。

【0014】

50

W098/20039号特許出願には、生物学的試薬の使用を回避するFSHおよびLHの分離および精製方法が記載されている。しかしながら、使用された原料物質および得られた生成物のきわめて高いFSH:LH比により、この方法はメノトロピン、約1:1のFSH:LH比を要求する製剤が得られる可能性は排除される。

【0015】

さらに、W098/20039号は、治療用製品に必須の問題である生物活性物質として得られるゴナドトロピンの特性を明らかにしていない。この特許出願では活性を試験するために放射免疫測定法を用いているが、この測定法は、その正確さに関して難しい問題を生じる。

【0016】

実際、FSHおよびLHアイソフォームの構造的異種性は両ホルモンの生物活性および免疫学的反応性にインパクトを有することはずっと以前から認識されていた (Costigliolaら, J. Endocrinol. Invest. 17: 291, 1994)。バイオ- およびイムノ- FSHおよびLHレベルにおいて観察される差異は別個の構造実体がバイオアッセイ対イムノアッセイによって認識されることを示唆する。イムノアッセイが一貫して生物活性のあるゴナドトロピンレベルの良好な評価を与えるわけではなく、必ずしもその生物活性を反映しないことは、これまで徹底して論じられている (Dahl & Stone, J. Andrology 13: 11, 1992; Roseら, Endocrine Reviews 21: 5, 2000)。

【0017】

他方、バイオアッセイは、他の方法にはない2つの重要な成分、すなわち標的組織における生物学的作用ならびに生物学的クリアランスを考慮しているため、このホルモンの活性を定義するために適当な試験であると考えられている (Roseら, Endocrine Reviews 21: 5, 2000)。この事実は、インビボでのバイオアッセイを治療用製剤の検量のために必須とするものである (Roseら, Clinica Chimica Acta 273: 103, 1998)。

【0018】

W098/20039はこの事実を支持する分析方法を示していないので、ゴナドトロピンを化学的に純粋な薬剤として特性づけることはできていない。

【0019】

本発明は、生物活性の範囲のみでなく純度を試験する高感度な分析方法の導入によって分析的な観点からもゴナドトロピンの完全な特性を提供する。本発明においてはFSHおよびLH活性を確立するために用いるアッセイがすべての場合、ずっと前から生物活性を保証するためには労力を要する特異的な試験であることが分かっていたインビボバイオアッセイであり、得られた各ゴナドトロピンについてFSHおよびLHの効力およびそれらの比率も保証できる。

【0020】

考慮すべき第二の問題は上述の特許 (W098/20039) がゴナドトロピンを精製するために親和性色素クロマトグラフィーの使用を記載していることである。この操作は色素の漏出により生成物の夾雑の可能性について懸念を生じることになる。これらの異種化合物はヒトに注射される生成物には望ましくない (Protein Purification, R. K. Scopes, Springle r-Verlag, New York Inc; 2版, 156頁, 1998)。本発明はこのタイプのクロマトグラフィーを排除するように設計されているので、色素の夾雑の問題は完全に回避される。

【0021】

現在のメノトロピン (市販の生成物を入手できる) は、それらを皮下注射した場合、タンパク質の夾雑により局所アレルギー反応を起こす可能性があるという欠点がある。

【0022】

本発明は、初めて市販される高純度のゴナドトロピンの精製および製造方法を提供する。この方法は、生物学的試薬たとえば抗体、受容体および他の異種物質ならびにクロマトグラフィー色素の使用を回避するように特別に設計されている。安全性の問題に加えて、単離時に非特異的な工程を使用することにより、出発原料中に存在するすべてのアイソフォームの取得が可能になる。

【0023】

これらの糖タンパク質には、広く記載して異種性がとくに重要である。FSH, LHおよびTSHには、少なくとも20~30の異なるアイソフォームが存在する (Wide, Acta Endocr. Copenh. 109: 181-189, 1985)。これらのアイソフォームはそれらの分子量および電荷で相違する。糖ホルモンのアイソフォームは主としてオリゴ糖構造で変動するが、微小な異種性はアミノ酸組成における差からも提供される (Costagliolaら, J. Endocrinol. Invest. 17: 291-299, 1994; Wilsonら, J. Endocrinol. 125: 3-14, 1990)。

【0024】

単離される異種アイソフォームのタイプは、単離技術における他の因子に依存することは一般的に受入られている (Cockburnら, Biologicals 19: 257-264, 1991)。高度に識別可能な単離技術、たとえばモノクローナル抗体はその物質のソース中に存在するアイソフォームの一部分のみを選択する。「特異的すぎる」と、一部の生物学的に活性なゴナドトロピン変異体は抗体によって認識されず、失われる可能性がある (Costagliolaら, J. Endocrinol. Invest. 17: 291-299, 1994)。他方、たとえば本特許に記載したような非特異的なアプローチは、尿中に存在するすべてのタイプのアイソフォームを精製するのに有用である。異なるアイソフォームは、細胞表面受容体との相互作用および代謝的クリアランスに関して変動を示している (Thotakuraら, Glycobiology 5: 3-10, 1995)。オリゴ糖構造は様々な生理学的因子の支配下にある。治療的観点から、尿中に存在するアイソフォームを利用できる生成物をもつことには興味がある。この方法では、本明細書に記載の高度に精製された生成物は、天然に存在するゴナドトロピンの生殖機能の維持における様々な役割を提供する。

【0025】

本出願は、高度に精製されたメノトロピンがその高い生物学的効力によるのみでなく、関係するスクリーニング方法 (PAGE電気泳動、HPLCおよびサイズ排除クロマトグラフィー) によっても最初に特徴づけられたものである。

【0026】

精製された等級で大規模に利用可能になったので、ついでこれらの天然に存在するFSHおよびLH分子の検討のたびに注意深い分析が可能である。ホルモンの三次元構造はこれらのオリゴ糖の役割についてのより良い理解に寄与することができる。

【0027】

現在製造されているメノトロピンを得る方法は周知である。BP 1980に指示されているように、メノトロピンは閉経後の婦人の尿からカオリン吸着、ついでアルカリ溶出および2容量のアセトンによる沈殿で製造することができる。必要な分画をこの沈殿から70%エタノール中酢酸アンモニウム溶液で抽出し、ついで90%エタノール中10%酢酸アンモニウムで沈殿させる。メノトロピン生成物はこの沈殿のイオン交換クロマトグラフィーによって得られる。

【0028】

高純度のメノトロピンを得るために本発明において使用できる「HMGソース物質」からの出発物質は、局方 (USP XXIII, BP 1993 付録1995; EP 1986) に特定されているようなメノトロピンのスペックもしくはこのスペックにきわめて類似する他の物質から構成される。したがって、この製造方法はメノトロピンに適用される要求に厳密に合致しない他の物質にも適用することができる。実際、満足できる結果はFSH:LH比のメノトロピンの要求 (FSH:LH, ほぼ1:1) に従わない物質である分画C (本発明の実施例1および実施例2の記載を参照) を用いて得られる。さらに、本発明は必要な場合にFSH:LH比を調整する操作を提供し、したがって正しいFSH:LHにない出発原料を用いる場合でも、高度に精製されたメノトロピンのスペックを提供することができる。このお蔭で、精製時に両活性主成分を予め分離することなく、医薬製剤を製造するのに必要なほぼ1:1の比でのFSHおよびLHからなる生成物を得ることができる。すなわち、純度約5%の出発物質から最終生成物の純度95%以上で、最終効力は初期効力の25~35倍大きい両ホルモンの共精製が達成される。得られる純度は慣用の医薬製品对本発明の適用から得られる新しく精製されたバージョンのポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す図1によって一目瞭然である。

【0029】

本発明に記載された工程は、本明細書に記載の順序とは異なる順序で使用することも可能であり、これは発明の哲学の変動を意味するものではない。同様に、たとえば以下に記載の2つのクロマトグラフィー工程間に疎水性相互作用樹脂を挿入しても満足できる結果が得られた。

【0030】

本発明はまた、尿中ゴナドトロピンの別々の、すなわちFSHおよびLHの別個のプレパレーションを提供する。

【0031】

治療目的でのメノトロピン組成物の投与は主に筋肉内に行われてきた。この投与形式は患者にかなりの不安を与え、しかも処置を受けるために時には毎週または毎月、定期的に臨床棟を受診しなければならない。

10

【0032】

皮下投与は自己投与が可能であり、したがって患者の協力およびコンプライアンスが改善される。

【0033】

尿ゴナドトロピンの皮下投与は既に報告されている (Nakamura Y. ら, Fertil Steril 51: 423-429, 1989; Engmann L. ら, Fertil Steril 69: 836-840, 1998)。不純なプレパレーションの皮下投与は使用する生成物中の不純物の存在および処置用の懸濁液による局所アレルギーを招く欠点がある。したがって、これらのアレルギー反応の可能性を減少できる高純度の生成物を産生することには価値がある。

20

【0034】

(発明の開示)

本発明は、高い生物活性および化学的純度を有するFSHおよび／またはLHおよび閉経時または閉経後の婦人のヒト粗製尿からこれらの組成物を製造する方法に関する。化学的純度はHPLCで測定して95%以上であり、一方、生物活性比はメノトロピンについてFSHおよびLH 2500 IU/mg タンパク質以上の、フォリトロピンについて5000 IU/mg タンパク質以上である。

【0035】

本発明は、任意の慣用の賦形剤たとえばヘキソース、マンニトールおよびそれらの混合物、アルブミン、界面活性剤およびそれらの混合物から選択される安定剤からなる。

30

【0036】

得られる注射可能な組成物は、実質的に夾雑物を含まず、皮下投与に適用することができる。

【0037】

本発明のフォリトロピンおよび／またはメノトロピン組成物は高い生物活性および化学純度の、医薬的に供される担体を含むまたは含まない医薬製剤の製造に使用することができる。

【0038】

HMGソース物質を含む粗製のゴナドトロピンから、生物学的試薬またはクロマトグラフィー色素の使用に由来する異種夾雑物質を全く含まない高い生物活性および化学純度のヒト尿ゴナドトロピンの分離および製造方法は、主として任意の順序からなる以下の工程：

40

1) 上記粗製ゴナドトロピンを0.05～0.15 Mの酢酸アンモニウム、pH 5.0～6.0中に希釈し、スルホプロピル型の強力な陽イオン樹脂のイオン交換カラムに負荷し、0.05～0.5 Mの酢酸アンモニウム溶液、pH 5.0～7.0でFSHおよびLHの両者を溶出して精製する工程、

2) この分画を0.01～0.05 Mの酢酸アンモニウム、pH 5.0～7.0に希釈し、四級アンモニウム型の強力な陰イオン交換樹脂のカラムに負荷し、0.05～0.2 Mの酢酸アンモニウム溶液、pH 5.0～7.0でFSHおよびLHの両者を溶出して精製する工程、

3) ゴナドトロピンを、疎水性相互作用カラム中以下の溶液の少なくとも2つ

a) 緩衝液50～200 mM リン酸ナトリウム、および0.8～1.2 M 硫酸アンモニウム、pH 5.0

50

～6.0;

b) 緩衝液50～200 mM リン酸ナトリウム、および0.4～0.6 M 硫酸アンモニウム、pH 5.0～7.0;

c) 緩衝液50～200 mM リン酸ナトリウム (50～70%v/v)、およびエタノール96% (50～30%v/v) を順次添加して精製する工程からなる。

【0039】

SP-Sepharose、Q-Sepharose および疎水性相互作用樹脂がこれらの工程には使用できる。好ましい疎水性相互作用樹脂はフェニル-Sepharose 樹脂である。

【0040】

本発明の方法はさらに、沈殿、遠心分離、限外ろ過、透析、洗浄、真空中搬送および冷却の二次工程からなる。この方法の最終工程はメノトロピン、FSHまたはLH活性のみを有する分画が得られるように選択的に実施される。

【0041】

本発明法の利点の一つは、この方法が生物学的試薬および基質を含まず、生成物は不純なバイオ物質を含まないことである。

【0042】

高度に精製されたメノトロピンおよび高度に精製されたFSHを製造するために本発明において用いられる出発原料は主として、閉経時または閉経後の尿からゴナドトロピンを吸着するためにカオリンを用いる周知の方法を使用して得られる (BP 1980)。略述すれば生物活性分画を酸性にした尿からカオリンで抽出し、アルカリで溶出させ、2容量のアセトンで沈殿させる。ついでこの沈殿から活性分画をエタノール (70%) 中10%w/vの酢酸アンモニウムで抽出し、エタノール (90%) 中10%酢酸アンモニウムで沈殿させる。更なる精製はイオン交換クロマトグラフィーによって行われる。この方法によって得られる精製物質はメノトロピン組成物または分画Cのような他の均等なプレパレーションから構成される。

【0043】

メノトロピンまたは均等物 (分画C) は、強力な陽イオン交換クロマトグラフィーに付し、0.2～0.5 Mの酢酸アンモニウム緩衝液、pH 5.0～7.0で溶出する。新たな沈殿が4容量のエタノールの添加によって得られる (分画F)。分画Fを強力な陰イオン交換樹脂上クロマトグラフィーに付し、活性な分画を0.05～0.2 Mの酢酸アンモニウム緩衝液、pH 5.0～7.0で溶出する。活性分画は－75℃で凍結する (分画G)。

【0044】

分画GはそのFSHおよびLH含量を正確に測定するために生物学的アッセイによって分析する。両ホルモンの間に見出される比に応じて、以下のクロマトグラフィー工程が採用される。2つの別の方法が可能である。

1) 両ホルモンの共精製。

2) 過剰のホルモン活性の分離により1:1のFSH:LHを有するメノトロピンを得るか、またはFSHおよびLHの両ホルモンの分離により治療用の目的で両活性を別個に得る (純粋なFSHおよび純粋なLH)。

【0045】

採用される工程が決まったならば、分画Gを以下のクロマトグラフィー工程の要求に適合するように、透析し濃縮する。得られた溶液を疎水性相互作用カラム上クロマトグラフィーに付し、上記1) および2) の選択を考慮して2つの別法に従い活性分画を溶出する。得られる液体分画 (分画J2, J3, J4) を－75℃で凍結する。ついで、これらの分画を解凍し、透析し、濃縮し、滅菌膜を通してろ過し、4容量のエタノールを加えて沈殿させ、得られた沈殿を真空中で乾燥させる (分画K)。

【0046】

(発明の詳細な説明)

a) フローチャート

高度に精製されたゴナドトロピンを得るためのフローチャートを図10に示す。

10

20

30

40

50

【0047】

精製されたメノトロピンを構成する分画 K_M の精巧な技術を以下に記述する。

b) 分画Fの製造

分画Cを、スルホプロピル型の強力な陽イオン交換樹脂10 L を含有するクロマトグラフィーカラム上クロマトグラフィーに付す。

分画C (110~140 g) を1600~1800 ml の0.05~0.15 Mの酢酸アンモニウム, pH 5.0~7.0 中に溶解する。カラムを流し、0.05~0.15 Mの酢酸アンモニウム溶液の必要量で容量を20 L にする。溶出を0.15~0.20 Mの酢酸アンモニウム pH 5.0~7.0 (20 L) および0.2~0.5 Mの酢酸アンモニウムpH 5.0~7.0 (20 L) の溶液で続ける。後者の溶液で溶出された活性分画に攪拌下、4容量の96%エタノールおよび混合物のpHを5.5~5.7にするのに十分な酢酸を加える。沈殿が形成されるので、これを遠心分離し、エタノールで洗浄し、エタノールが除去され、水分含量が5%以下になるまで真空中で乾燥する (分画F)。

10

【0048】

c) 分画Cの製造

分画Fを、四級アンモニウム型の強力な陰イオン交換樹脂4 L を含有するクロマトグラフィーカラム上クロマトグラフィーに付す。

分画F (650 ml 中40~60 g) を0.01~0.05 Mの酢酸アンモニウム溶液, pH 5.0~7.0に溶解し、カラムを流し、同じ溶液で溶出して容量を7 L にする。溶出を12 L の0.05~0.07 M酢酸アンモニウム, pH 5.0~7.0、ついで10 L の0.07~0.2 M酢酸アンモニウム, pH 5.0~7.0で続ける。後者の溶液で溶出された活性分画をPM 10 (10000 D) の限外ろ過膜 (Amicon-Millipore) を用いる限外ろ過法に付す。この溶液を濃縮し、50 mMリン酸ナトリウム緩衝液, pH 5.5~5.7に対して、緩衝液100~150 ml中タンパク質濃度が2~4 gの濃度に達するまで透析する。ついで-75°Cで凍結する (分画G)。

20

【0049】

d) 分画Jの製造

分画Gを疎水性相互作用樹脂 (フェニル-Sepharose HP, Amersham-Pharmacia, Biotech) 400 ml を含有するクロマトグラフィーカラム上クロマトグラフィーに付す。

分画Gの溶液に0.8~1.2 M濃度を得るために十分な量の硫酸アンモニウムを加える。

実施するクロマトグラフィー方法によりFSHおよびLHの共精製または両ホルモンの分離が可能になる。作用の経過は分画Fについて実施され、FSH:LH比が決定された前の分析 (生物学的アッセイ) に依存する。この比が既知であれば、1:1 FSH:LHの過剰なホルモンの過剰ストックは除去される。

30

【0050】

d-1) 生成物のバランスがとれている場合 (1:1 FSH:LH) は、濃縮し透析した分画Gのクロマトグラフィーは以下のように実施される。

一分画Gの溶液を0.8~1.2 M 硫酸アンモニウム中クロマトグラフィーカラムに流す。

ー2容量の50~200 mM リン酸ナトリウム緩衝液、0.8~1.2 M 硫酸アンモニウムで溶出する。

ー2容量の50~200 mM リン酸緩衝液 (50~70%v/v) および96%エタノール (50~30%v/v) で溶出を続ける。

40

後者の緩衝液で溶出された活性分画 (分画J4) を-75°Cで凍結する。この分画はFSHおよびLH活性を有する。

【0051】

d-2) 分画GのFSH:LH比が1:1と異なる場合は、過剰のホルモンの過剰ストックは以下のように除去される。

一分画Gの溶液のアリコート0.8~1.2 M 硫酸アンモニウム中、クロマトグラフィーカラムに流す。

ー2容量の緩衝液50~200 mM リン酸ナトリウム、0.8~1.2 M 硫酸アンモニウム, pH 5.0~7.0で溶出する。

ー2容量の緩衝液50~200 mM リン酸ナトリウム、0.4~0.6 M硫酸アンモニウム, pH 5.0~

50

7.0で溶出を続け、最後に2容量の50~200 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (50~70%v/v) および96%エタノール (50~30%v/v) で溶出する。

緩衝液50~200 mM リン酸ナトリウム、0.4~0.6 M硫酸アンモニウムで溶出された活性分画 (分画J2) を-75℃で凍結する。この分画は大部分FSH活性を有する。

50~200 mM リン酸緩衝液 (50~70%v/v) および96%エタノール (50~30%v/v) で溶出された活性分画 (分画J3) を-75℃で凍結する。この分画はLH活性のみを有する。

【0052】

分画Kの製造

分画J2, J3, J4を解凍し、PM 10 (Diaflo Ultrafilters, Amicon-Millipore) 膜を通す限外ろ過法を用いて、緩衝液50 mMリン酸ナトリウム, pH 5.7に対して透析および濃縮を行う。

10

【0053】

得られた溶液をそれぞれ、滅菌生成物を得るのに必要な条件下に0.45 μ の膜を用いてろ過し、ついで4容量の96%エタノールおよびpH 5.5~5.7の混合物を得るのに十分な酢酸を添加する。混合物を一夜放置する。沈殿を遠心分離によって分離し、エタノールが除去され、水分含量が5%以下になるまで真空中で乾燥する (分画K)。

【0054】

分画Kの性質は沈殿された分画がJ2, J3またはJ4のいずれであるかに依存して変動する。分画J4から得られる分画K_Mはほぼ均等な単位のFSHおよびLHを含有する。分画J2から得られる分画K_FはFSHとLHの痕跡からなる。分画J3から得られる分画K_LはLHFおよびSHの痕跡からなる。

20

【0055】

記載された技術によって製造されるバッチの例

実施例 1

1.1. 分画Fの製造

分画C 231.2 g を2部分に等分し、上述のようにクロマトグラフィーカラム上2つの均等方法でクロマトグラフィーに付した。

115.6 g の分画C (各方法における) を1700 ml の0.05 M の酢酸アンモニウム緩衝液、pH 5.0に溶解した。カラムを流し、さらに同じクロマトグラフィー緩衝液18.7 L で溶出した。溶出を20 L の0.15 M酢酸アンモニウム, pH 5.0で続け、最後に20 L の0.5 M酢酸アンモニウム, pH 5.0で溶出した。0.5 M 酢酸アンモニウム (22 L) の溶出で得られた活性分画を攪拌しながら、88 L の96%エタノールおよび2400 ml の酢酸の溶液に加えた。混合物のpHは5.7であった。得られた沈殿を冷蔵庫 (2~8℃) に一夜放置した。沈殿を遠心分離し、96%エタノールで洗浄し、真空中で17時間乾燥した。2つの均等方法のそれぞれで、2つの分画F 20.7 gおよび19.5 gがそれぞれ得られた。

30

【0056】

1.2. 分画Gの製造

上記工程で得られた2つの分画Fを合わせて記載の方法によりカラム上クロマトグラフィーに付した。

40.2 g の分画Fを650 ml の0.01 M の酢酸アンモニウム緩衝液、pH 5.0に溶解した。カラムをこの溶液で流し、同じ希釈緩衝液6350 ml で溶出した。ついで溶出を12 L の0.05 M 酢酸アンモニウム, pH 5.0で続け、次に10 L の0.2 M酢酸アンモニウム, pH 5.0で溶出した。後者の溶液で溶出した活性分画 (4500 ml) をPM 10 (10000 D) Diaflo Ultrafilters (Amicon-Millipore) 膜を用いて限外ろ過法に付した。溶液を濃縮し、50 mMリン酸ナトリウム緩衝液, pH 5.7に対して、緩衝液150 ml中タンパク質濃度が2~4 gに達するまで透析した。最終溶液 (400 ml) を-75℃で凍結した。

40

【0057】

分画Gを動物で生物学的に試験して、42,000 IU/ml のFSH効力および33,780 IU/ml のLH効力を検出した。この結果が、FSHおよびLH (それぞれ分画J2およびJ3) を分離する条件下で一部の分画G溶液 (80 ml) を処理するのに必要と考えられた。残部 (320 ml) は両ホル

50

モンを分離しない条件下にクロマトグラフィーに付した（分画J4）。ついで分画J3および分画J4を混合すると、最終のFSH：LH比ほぼ1:1が得られた（分画K_M）。

【0058】

1.3. 分画Jの製造

i) 分画J2（高度に精製されたFSH）およびJ3（高度に精製されたLH）の製造

分画Gのアリコート（80 ml）に硫酸アンモニウムを濃度1 M になるまで加える。この溶液をフェニル-Sepharose HP クロマトグラフィーカラムに通し、2容量の緩衝液、50 mMリン酸ナトリウム、1 Mの硫酸アンモニウム、pH 5.1で溶出した。溶出を2容量の緩衝液、50 mMリン酸ナトリウム、0.5 Mの硫酸アンモニウム、pH 5.1で続け、最後に2容量の50 mMリン酸ナトリウム緩衝液（60%v/v）および96%エタノール（40%v/v）で溶出した。

10

【0059】

緩衝液50 mM リン酸ナトリウム、0.5 M硫酸アンモニウム、pH 5.1で溶出したFSH活性分画（分画J2）を50 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 5.7に対して、PM 10（10000 D）膜限外ろ過（Diaflo Ultrafilters, Amicon-Millipore）を用いて透析し濃縮し、ついで-75℃で凍結した。

【0060】

50 mMリン酸ナトリウム緩衝液（60%v/v）および96%エタノール（40%v/v）で溶出したLH活性分画（分画J3）を50 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 5.7に対して、PM 10（10000 D）膜限外ろ過（Diaflo Ultrafilters, Amicon-Millipore）を用いて透析し濃縮し、ついで-75℃で凍結した。

20

【0061】

ii) 分画J4（高度に精製されたメノトロピン）の製造

分画Gの第二のアリコート（320 ml）を解凍し、硫酸アンモニウムを濃度1 M になるまで加えた。この溶液をフェニル-Sepharose HP クロマトグラフィーカラムに通し、2容量の緩衝液、50 mMリン酸ナトリウム、1 Mの硫酸アンモニウム、pH 5.1で溶出した。溶出を2容量の緩衝液、50 mM リン酸（60%v/v）および96%エタノール（40%v/v）で続けた。この緩衝液で溶出した分画（分画J4）を-75℃で凍結した。

【0062】

1.4. 分画Kの製造

分画J3（40 ml）および分画J4（25 ml）を解凍し、滅菌生成物を得るのに必要な条件下に0.45 μの膜を通してろ過し（最終容量100 ml）、ついで4容量の96%エタノール（400 ml）およびpH 5.5に達するのに必要な酢酸（1 ml）を加えて攪拌した。

30

【0063】

分画J2（40 ml）を解凍し、滅菌生成物を得るのに必要な条件下に0.45 μの膜を通してろ過し（最終容量60 ml）、ついで4容量の96%エタノール（400 ml）およびpH 5.5に達するのに必要な酢酸（0.5 ml）を加えて攪拌した。

【0064】

得られた沈殿を冷蔵庫中2~8℃に一夜放置した。翌朝、高度に精製されたメノトロピンの沈殿が分画J3およびJ4から得られ、これらを遠心分離して分離し、真空中でエタノールが除去され、含水量が5%以下になるまで真空中で乾燥した（分画K_M, 4.50 g）。

40

【0065】

J2分画から得られた高度に精製されたFSHの沈殿を遠心分離によって分離し、真空中でエタノールが除去され、含水量が5%以下になるまで真空中で乾燥した（分画K_F, 0.55 g）。

【0066】

1.5. 結果

分画K_M（高度に精製されたメノトロピン）およびK_F（高度に精製されたFSH）は以下の結果を示した。

分画	FSH 効力 (IU/mg)	比活性 (IU/タンパク質 mg)	LH 効力 (IU/mg)
K _M	2,870	3,700	2,635
K _F	6,895	8,900	<1 LH IU/75 FSH IU

収率表

分画	FSH IU	LH IU	前段階に対する収率		総収率	
			FSH%	LH%	FSH%	LH%
C	19,276,000	15,604,000	----	----	----	----
F	18,408,000	14,980,000	95.5	96.0	95.5	96.0
G	16,800,000	13,512,000	91.3	90.2	87.2	86.6
K _M	12,915,000	11,857,000	76.9	87.8	67.0	76.0
K _F	3,792,000	50,600	22.6	----	19.7	----

10

【0067】

実施例2：

2.1. 分画Fの製造

分画C 250.06 g を2部分に等分し、上述の1つのようにクロマトグラフィーカラム上2つの均等な方法でクロマトグラフィーに付した。

125.03 g の分画C（各方法における）を1700 ml の0.05 M の酢酸アンモニウム緩衝液、pH 5.1に溶解した。カラムをさらに同じクロマトグラフィー緩衝液18.7 L で流し、溶出した。溶出を20 L の0.15 M酢酸アンモニウム、pH 5.1で続け、最後に20 L の0.5 M酢酸アンモニウム、pH 5.1で溶出した。0.5 M 酢酸アンモニウム（22 L）での溶出により得られた活性分画を攪拌しながら、88 L の96%エタノールおよび2,200 ml の酢酸に加えた。混合物のpHは5.7であった。沈殿の出現が認められた。混合物を冷蔵庫に2〜8℃で一夜放置した。沈殿を遠心分離し、96%エタノールで洗浄し、真空中で22時間乾燥した。

20

均等な方法のそれぞれで、2つの分画F 21.57 gおよび21.15 gがそれぞれ得られた。

【0068】

2.2. 分画Gの製造

前段階で得られた2つの分画を合わせて、上記方法によりカラム上クロマトグラフィーに付した。

42.58 g の分画Fを650 ml の0.01 M の酢酸アンモニウム緩衝液、pH 5.1に溶解した。カラムにこの溶液を流し、同じ希釈緩衝液6,350 ml で溶出した。溶出を12 L の0.05 M酢酸アンモニウム、pH 5.0で続け、ついで10 L の0.2 M酢酸アンモニウム、pH 5.0で溶出した。後者の溶液で溶出した活性分画（4,500 ml）をPM 10膜（10,000 D）（Diaflo Ultrafilters, Amicon-Millipore）を用いて限外ろ過法に付した。溶液を濃縮し、50 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 5.7に対して、緩衝液150 ml中タンパク質が2〜4 gに達するまで透析した。500 ml の最終容量を−75℃で凍結した。

30

【0069】

分画Gを動物で生物学的に試験すると49,790 IU/ml のFSH効力および39,600 IU/ml のLH効力を示した。この分析により、それはFSHおよびLH（それぞれ分画J2およびJ3）を分離し、残部（400 ml）は両ホルモン（J4）を分離しない条件下、一部の分画Gの溶液（100 ml）を処理するのに必要と考えられた。

40

ついで分画J3および分画J4のアリコートを混合すると、最終のFSH：LH比ほぼ1:1が得られた（分画K_M）。

【0070】

2.3. 分画Jの製造

i) 分画J2（高度に精製されたFSH）およびJ3（高度に精製されたLH）の製造：

分画Gのアリコート（100 ml）に硫酸アンモニウムを濃度1 M になるまで加えた。この溶液をフェニル-Sepharose HP クロマトグラフィーカラムに通し、2容量の緩衝液50 mMリン酸ナトリウム、1 Mの硫酸アンモニウム、pH 5.1で溶出した。溶出を2容量の緩衝液、50 mM リン酸ナトリウム、0.5 Mの硫酸アンモニウム、pH 5.1で続け、最後に2容量の50 mMリ

50

ン酸ナトリウム緩衝液（60%v/v）および96%エタノール（40%v/v）で溶出した。

【0071】

緩衝液50 mM リン酸ナトリウム、0.5 M硫酸アンモニウム、pH 5.1で溶出したFSH活性分画（分画J2）を50 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 5.7に対し、PM 10膜（Diaflo Ultrafilters, Amicon-Millipore）による膜限外ろ過を用いて透析し濃縮し、ついで−75℃で凍結した。

【0072】

50 mMリン酸ナトリウム緩衝液（60%v/v）および96%エタノール（40%v/v）で溶出したLH活性分画（分画J3）を50 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 5.7に対して、PM 10膜（Diaflo Ultrafilters, Amicon-Millipore）による膜限外ろ過を用いて透析し濃縮し、ついで−75℃で凍結した。

10

【0073】

ii) 分画J4（高度に精製されたメノトロピン）の製造

分画Gの第二のアリコート（400 ml）を解凍し、硫酸アンモニウムを濃度1 M になるまで加えた。この溶液をフェニル-Sepharose HP クロマトグラフィーカラムに通し、2容量の緩衝液、50 mMリン酸ナトリウム、1 Mの硫酸アンモニウム、pH 5.1で溶出した。溶出をさらに2容量の50 mM リン酸ナトリウム（60%v/v）緩衝液および96%エタノール（40%v/v）で続けた。この緩衝液で溶出した活性な分画（分画J4）を−75℃で凍結した。

【0074】

2.4. 分画Kの製造

20

分画J3（50 ml）および分画J4（30 ml）を解凍し、滅菌生成物を得るのに必要な条件下に0.45 μの膜を通してろ過し（最終容量110 ml）、ついで4容量の96%エタノール（440 ml）およびpH 5.5に達するのに必要な酢酸（1 ml）を攪拌下に加えた。

【0075】

分画J2（50 ml）を解凍し、滅菌生成物を得るのに必要な条件下に0.45 μの膜を通してろ過し（最終容量70 ml）、ついで4容量の96%エタノール（280 ml）およびpH 5.5に達するのに必要な酢酸（0.5 ml）を攪拌下に加えた。

【0076】

分画を冷蔵庫中2〜8℃に一夜放置して沈殿を形成させた。翌朝、高度に精製されたメノトロピンの沈殿が分画J3およびJ4から得られ、これらを遠心分離して分離し、真空中でエタノールが除去され、含水量が5%以下になるまで真空中で乾燥した（分画K_M, 5.71 g）。

30

【0077】

J2分画から得られた高度に精製されたFSHの沈殿を遠心分離によって分離し、真空中でエタノールが除去され、含水量が5%以下になるまで真空中で乾燥した（分画K_F, 0.70 g）。

【0078】

2.5. 結果

分画K_M（高度に精製されたメノトロピン）およびK_F（高度に精製されたFSH）について実施した生物学的分析は以下の結果を示した。

40

分画	FSH 効力 (IU/mg)	比活性 (IU/タンパク質 mg)	LH 効力 (IU/mg)
K _M	3,344	4,300	3,022
K _F	6,500	8,400	<1 LH IU/75 FSH IU

【0079】

2.6. 収率表

分画	FSH IU	LH IU	前段階に対する収率		総収率	
			FSH%	LH%	FSH%	LH%
C	29,000,000	21,900,000	----	----	----	----
F	27,800,000	21,200,000	95.9	96.8	95.9	97.0
G	24,900,000	19,800,000	89.6	93.4	85.9	90.4
K _M	19,094,000	17,255,000	76.7	87.1	65.8	78.8
K _F	4,550,000	<60,600	18.3	----	15.7	----

10

【0080】

高度に精製された生成物はまた、より活性の低い原料に出発しても、本発明の方法を用いて得られた。この場合、FSHおよびLHの両者について、約5000 IU/mgタンパク質のFSHおよび約2500 IU/mg タンパク質の効力のメノトロピンが得られた。

【0081】

2.7. 得られた生成物の特性

分画K_MおよびK_Fは以下の方法によって特性を解析した。

2.7. a) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

2.7. b) ウェスタンブロットについてポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

2.7. c) 等電点電気泳動

20

2.7. d) HPLC中サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

2.7. e) タンパク質含量の測定

2.7. f) 動物における生物学的効力のある投与量 (以前の情報)

【0082】

2.7. a) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

分画K_MおよびK_Fは以下の操作に従い電気泳動によって分析した。

装置: Ultrathin ポリアクリルアミドゲル電気泳動システム、PhastSystem (Amersham Pharmacia Biotech)

ゲル: Phast ゲル勾配8-25 (Amersham Pharmacia Biotech)

緩衝液: 緩衝液ストリップ/SDS (Amersham Pharmacia Biotech)

30

分離技術: File 110, PhastSystem, SDS-Page

展開技術: File 200, クーマッシーブリリアントブルーのPhastSystem

低分子量プローブ: 6種類の精製タンパク質を含有する電気泳動検量キット (Amersham Pharmacia Biotech)

	分子量
ホスホリラーゼ b	94,000 D
アルブミン	67,000 D
オバルブミン	43,000 D
カルボニックアンヒドラーゼ	30,000 D
トリプシンインヒビター	20,100 D
α-ラクトアルブミン	14,400 D

40

各キットバイアルは、各タンパク質約100 μg の凍結乾燥ブレンドを含有する。各バイアルは100 μl のサンプル緩衝液で溶解する。

【0083】

サンプル緩衝液:

250 mg のSDSおよび0.5 ml のβ-メルカプトエタノールを10 ml の緩衝液Aに溶解した。

緩衝液A: EDTA 1 mM 372 mg

TRIS 10 mM 1.21 mg

50

H₂O q.s.t. 1,000 ml とする

pH 8.0

サンプルを、サンプル緩衝液中最終濃度が1,100～1,300 FSH IU/ml になるように溶解した。

【0084】

サンプル処理

サンプルは100℃に5分間加熱した。ブループロモフェノールを0.01%の濃度に達するまで加えた。

電気泳動試行および展開後、ゲルを加熱空気で乾燥させた。

【0085】

得られた結果

分画K_M (図2) およびK_F (図3) の電気泳動試行では、約25,000 Dの分子量を示す、分子量標準20,100 Dと30,000 Dの中間の移動距離でクーマッシーブルーとともに展開するほぼ排他的にユニークなバンドが観察されるというプロファイルの結果として与えた。

サンプル	Rf
標準 20,100 D	0.916
分画K _M —K _F	0.250
標準 30,000	0.300

【0086】

分画K_FおよびK_Mの電気泳動で観察されたバンドのアサインメントは、2つの方法で実施した。

a) FSHを唯一の活性成分として含有する2つの市販製品、組換え起源のFSHを含有するGonal-F (Serono)、尿起源のFSHを含有するメノトロピンHP (Serono) との比較 (図4参照) による

b) 2.7. b) に指示した電気泳動-ウエスタンブロットによる

【0087】

2.7. b) ポリアクリルアミドゲル電気泳動ついでウエスタンブロット分析

分画K_FおよびK_Mのサンプルをウエスタンブロットにより分析した。2.7.a) に記載したのと類似の勾配でポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施したのち、バンドをニトロセルロース支持体に移し、抗体の作用により展開した。β-FSH鎖、β-LH鎖および両ホルモンのα-鎖に特異的な抗体を用いた。

【0088】

一技術：トランスファー方法221を、以下のトランスファー緩衝液を用いてPhastSystem (Amersham Pharmacia Biotech) のために使用した。

トランスファー緩衝液：Tris 25 mM, グリシン192 mM, pH 8.3, 20%メタノール含有膜：Probind 45, 孔径0.45 μm

トランスファー条件：25 V, 25 mA, 1 W, 45分

クーマッシーブルー染色：

染色溶液：蒸留水中メタノール30%および酢酸10%に0.1%にPhast Gel

Blue R を溶解した液

最終溶液：1部の染色溶液を1部の蒸留水中20%酢酸と混合

操作：最終溶液中膜を30分間穏やかに攪拌して着色させる。膜をメタノール：水：酢酸 (30:60:10) で2回洗浄し、ついで20%酢酸で洗浄する。

【0089】

一検出操作：ストレプトアビジン-ビオチンによる検出方法を使用した。

使用する緩衝液：PBS (リン酸ナトリウム0.01 M, 食塩0.25 M, pH 7.6)

ブロック溶液：PBS中5%アルブミン

洗浄溶液：a) PBS中5%アルブミン、b) PBS

【0090】

一抗体溶液：以下の一次抗体を使用した。

- 1) 抗 β -LHモノクローナル抗体 (Immunotech)、(IgG1-マウス)、カタログ番号: 0374
- 2) 抗 β -FSHモノクローナル抗体 (Immunotech)、(IgG1-マウス)、カタログ番号: 0373
- 3) 下垂体ホルモンの α -サブユニットに対するモノクローナル抗体 (Immunotech)、(IgG1-マウス)、カタログ番号: 0375

【0091】

- ー希釈: 一次抗体を1:100に希釈する
- ー二次抗体溶液: 用いた二次抗体は、ビオチン-SP-接合AffiniPure F(ab')₂ フラグメントヤギ抗-マウスIgG (H+L) (重鎖および軽鎖) とした。(Immunotech カタログ番号: 0816) PBS中に1:500に希釈
- ーペルオキシダーゼ接合ストレプトアビジン溶液: ーPBS中で1:500に希釈したペルオキシダーゼ接合ストレプトアビジン (Immunotech カタログ番号: 0309) を使用した。
- ー展開溶液: 酸素化水、4-クロロ-1-ナフトールおよび色素展開用緩衝液を含有する西洋ワサビペルオキシダーゼ接合基質キット (Bio-Rad, カタログ番号: 170-6431) を溶液1 Lの調製に使用した。

10

【0092】

- ー操作の簡略な記述

- 1) 膜をブロック溶液と一夜インキュベートする
- 2) 洗浄溶液a) で2回、各回5分間洗浄する
- 3) 一次抗体溶液と一夜インキュベートする
- 4) 洗浄溶液a) で3回、各回5分間洗浄する
- 5) 二次抗体と1時間インキュベートする
- 6) 洗浄溶液a) で3回、各回5分間洗浄する
- 7) 接合ペルオキシダーゼと30分間インキュベートする
- 8) 洗浄溶液a) で3回、各回5分間洗浄する
- 9) 展開溶液と10分間インキュベートする
- 10) 反応を停止させる

20

【0093】

結果

分画K_MおよびK_Fのポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施したのち、上述の技術によってバンドをニトロセルロース膜に移し、展開した。以下の結果が得られた。

30

分画	抗- β FSH抗体	抗- β LH抗体	抗- α -LH抗体
K _M	陽性	陽性	陽性
K _F	陽性	陰性	陽性

【0094】

これらの結果から考慮して、分画K_Mの電気泳動においてクーマッシーブルーとともに展開されたバンドはFSHおよびLHの両活性を有すると結論された。一方、分画K_FはFSHの特異的抗体に対してのみ陽性に反応し、LHに対する抗体とは反応しなかった。FSHおよびLHの α -鎖は共通であることから、K_MおよびK_Fの両分画は α -鎖に対する抗体と陽性反応を示す筈である。

【0095】

40

2.7. c) 等電点電気泳動

分画K_M (高度に精製されたFSH) およびK_F (高度に精製されたFSH) を等電点電気泳動により以下の操作に従って分析した。

装置: Ultrathin ポリアクリルアミドゲル電気泳動システム、PhastSystem (Amersham Pharmacia Biotech)

ゲル: Phast ゲルIEF 3-9 (Amersham Pharmacia Biotech)

分離技術: File 110, PhastSystem

展開技術: Silver キット (Amersham Pharmacia Biotech)

PI標準: IEF検量キット; Broad pIキット3-10 (Amersham Pharmacia Biotech)。大豆トリプシンインヒビター、pI 5.85 (Sigma)、ウシカルボニックアンヒドラーゼ、pI 4.55

50

(Sigma)

【0096】

サンプル処理

サンプルは濃度2.5 mg/ml～1.25 mg/ml になるように溶解した。

電気泳動試行および展開後、ゲルを加熱空気で乾燥させた。

【0097】

得られた結果

分画 K_F （高度に精製されたFSH）および K_M （高度に精製されたメノトロピン）両者のpI分布を図5および図6に示す。ゴナドトロピンの酸性の性質がIEFパターンによって確認される。実際、文献に詳細に記載されているように、アイソフォームは酸性の範囲に限定される。

10

【0098】

2.7. d) HPLC中サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）

装置の説明：

－高速液体クロマトグラフShimadzu, LC-10AVP, マニュアルインジェクター7725i, 位置センサーおよび20, 50または200 μ lのループ, Rheodyne

－UV-可視スペクトロメーター検出装置、SPD-10AVP型、Shimadzu（190-600 nm）

－クロマトグラフィーデータ処理用作業ステーション、Shimadzu Class-CR-10, プログラムClass CR10およびCBM-101型

－クロマトグラフィーカラムBio-Rad, Bio-Sil（商標）SEC250（300×7.5 mm）

20

－移動相：酢酸ナトリウム0.1 M緩衝液, pH 7.0, 脱気およびろ過

－流速：1.0 ml/分

検出：UV 220 nm

カラム温度：室温

注入容量：50～200 μ l

サンプル調製：サンプルを含むバイアル中に移動相約1 ml を注入し、溶解するまで攪拌する。

【0099】

結果：

分画 K_M および K_F の以下のクロマトグラムは約8.1～8.2秒の保持時間に唯一のピークの存在を示した。保持時間は組換えFSHを含む市販製品、Gonal-F（Serono）のクロマトグラフィーによって得られた保持時間と一致した（図7, 8および9参照）。

30

【0100】

2.7.e) タンパク質投与量

方法：Folin-Ciocalteu反応性及びアルブミンの標準曲線を用いたLowry法 [Journal of Biological Chemistry 193,265(1951)]

結果：実施例における分画 K_M 及び K_F のタンパク質百分率は約77%であった。

【0101】

2.7. f) 動物における生物学的効力の投与量

セクション2.5.において前に記載したように、分画 K_M および K_F をラットで生物学的に分析した。

40

【0102】

2.7. f.1) FSH生物学的効力投与量

卵巣重量の増加についてのSteelman-Pohley法（Steelman, S.L. & Pohley, F. M. Endocrinology 53: 604, 1953）を未成熟の21～24日齢雌性ラットに用い、FSHを含む生成物の3つの容量を注射した。用量は、最大用量と中間用量の対数間の差が中間用量と最小用量の対数間の差が等しくなるような比率に保持する。動物は最も重い動物と最も軽い動物の体重差が10 g を越えないロットを使用した。動物には、リン酸塩／アルブミン緩衝液に溶解した3つの異なる用量または相当する用量の標準を3日間皮下注射した。5日目に動物を屠殺し、卵巣を取り出し秤量した。サンプルについて得られたデータを標準で得られた

50

データと比較し、異なるサンプルの効力を、3×3試験における標準に対するサンプルの分析について指示される統計スキームを用いて計算した（USP XXIIIの生物学的分析参照）。

【0103】

2.7. f.2) LH生物学的効力投与量

精巣小胞重量の増加についての方法を未成熟の21～24日齢雄性ラットに用い、LHを含む生成物の3つの用量を注射した。3つの用量は、最大用量と中間用量の対数間の差が中間用量と最小用量の対数間の差が等しくなるような比率に保持した。動物は最も重い動物と最も軽い動物の体重差が10 g を越えないロットを使用した。動物には、リン酸塩／アルブミン緩衝液に溶解した3つの異なる用量または相当する用量の標準を4日間皮下注射した。5日目に動物を屠殺し、精巣小胞を取り出し秤量した。サンプルについて得られたデータを標準について得られたデータと比較し、異なるサンプルの効力を、3×3試験における標準に対するサンプルの分析について指示される統計スキームを用いて計算した（USP XXII Iの生物学的分析参照）。

【0104】

使用した標準は、WHO（World Health Organization）に所属するNIBSC（National Institute of Biological Standard and Control –Great Britain）によって作成された尿FSHおよびLHの第3次国際標準に対して検量されたメノトロピンのサンプルを用いた。

【0105】

実施例3：医薬製剤

高度に精製された注射可能なメノトロピンのスペック：

組成物中に使用できる賦形剤はラクトース、マンニトールおよびそれらの混合物である。他の慣用の賦形剤も使用できる。

本発明ではラクトースを注射用製剤に賦形剤として用いた。

製剤のpHは酸または塩基（リン酸もしくは他の試薬および／またはリン酸ナトリウムもしくは他の試薬）を加えて、6.0～7.0の範囲の値に補正することができる。

容器としては、ブロムブチルの栓付き3 ml のボロシリケートガラスI型バイアルを使用する。

【0106】

5,000アンプルのバッチの製造

高純度のメノトロピンの計算量（10%過剰充填）を注射用の水500 ml に溶解する。他方、100 g のラクトースを4 L の注射用の水に溶解する。両溶液を混合し、必要ならば酸または塩基を加えてpHを調整し、得られた溶液を5,000 mlにして0.2μの膜を通してろ過する。バイアルに調製された溶液（1 ml）を充填し、-40℃の温度の滅菌凍結乾燥器に少なくとも8時間負荷する。凍結乾燥は、30℃の温度まで3℃／時間で加熱して開始し、これをサイクルの終わりまで維持する。

本実施例は高度に精製されたフォリトロピンの製造にも同様に適用される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 慣用の製品（HMG）および新たに高度に精製されたメノトロピン製品（分画K_M）の電気泳動試行を表す。

【図2】 様々な濃度の、高度に精製されたメノトロピン製品（分画K_M）を分子量標準とともにPAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）に付した試行を表す。

【図3】 様々な濃度の、高度に精製されたFSH（分画K_F）を分子量標準とともにPAGEに付した試行を表す。

【図4】 Gonol-F（Serono）1 FSH IU/μl, 2) Metrodine HP（Serono）3 FSH IU/μl, 3) 高度に精製されたメノトロピン（分画K_M）3.7 FSH IU/μl, および4) 分子量標準（一番上から）14,400 D, 20,100 D, 30,000 D, 43,000 D, 67,000 Dおよび94,000 DのPAGE試行を表す。

【図5】 レーン1はBroad 3-10 pIの検量キットに相当し、レーン2はpI 4.55標準（大豆トリプシンインヒビター）に相当し、レーン3はpI 5.85（ウシカルボニックアンヒドラー

10

20

30

40

50

ぜB)に相当し、レーン4, 5および6は高度に精製されたフォリトロピン (K_F) 生成物 (3つの異なるバッチ) に相当する3-10 PhastGels銀染色上等電点分画電気泳動を表す。

【図6】 レーン1はBroad 3-10 pIの検量キットに相当し、レーン2は高度に精製されたメノトロピン (K_M) 生成物に相当する3-10 PhastGels銀染色上等電点分画電気泳動を表す。

【図7】 高度に精製されたメノトロピン (K_M) サンプルについてHPLCによって得られた結果である。

【図8】 高度に精製されたFSH (分画 K_F) サンプルについてHPLCによって得られた結果である。

【図9】 Gonal-F (Serono) のサンプルについてHPLCで得られた結果である。(保持時間11.2におけるピークは、医薬製剤の賦形剤に相当する。)

10

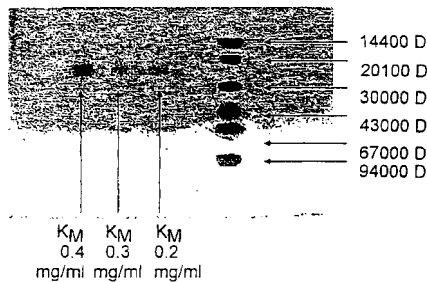
【図10】 本発明の高度に精製されたゴナドトロピンを得るための方法のフローチャートである。

【図1】



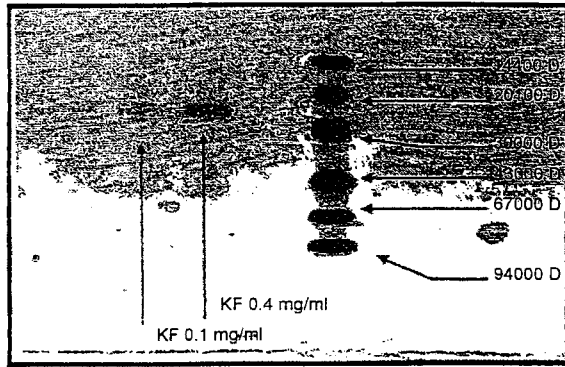
慣用の製品 (HMG) および新たに高度に精製されたメノトロピン生成物 (分画 K_M) の電気泳動

【図2】

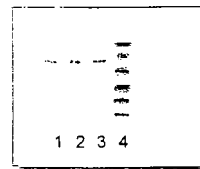


様々な濃度の高度に精製されたメノトロピン (分画 K_M) を分子量標準とともにポリアクリルアミドゲル電気泳動に付した試行

【図 3】



【図 4】



ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

1-Gonal-F (Serono) 1 FSH IU/ μ l

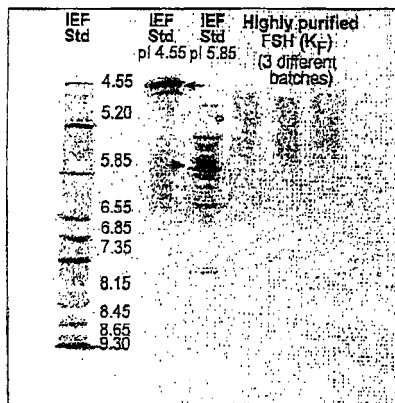
2-Metrodine HP (Serono) 3 FSH IU/ μ l

3- 高度に精製されたメノトロピン (分画 K_M) 3.7 FSH IU/ μ l

4- 分子量標準 (一番上から) : 14,400 D, 20,100 D, 30,000 D, 43,000 D, 67,000 D, および 94,000 D

様々な濃度の高度に精製された FSH (分画 K_F) を
分子量標準とともにポリアクリルアミドゲル
電気泳動に付した試行

【図 5】



3-10 PhastGels 銀染色上の等電点電気泳動

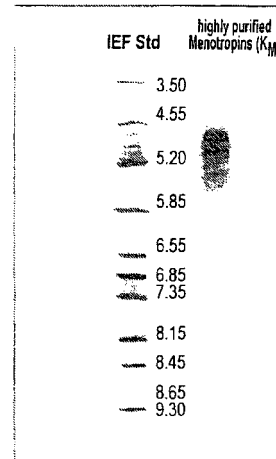
レーン 1 : Broad 3-10 pI の検量キット

レーン 2 : pI 4.55 標準 (大豆トリプシンインヒビター)

レーン 3 : pI 5.85 標準 (ウシカルボニックアンヒドラーゼ B)

レーン 4, 5 および 6 : 高度に精製されたフォイトロビン (K_F)
生成物 (3 つの異なる製造バッチ)

【図 6】

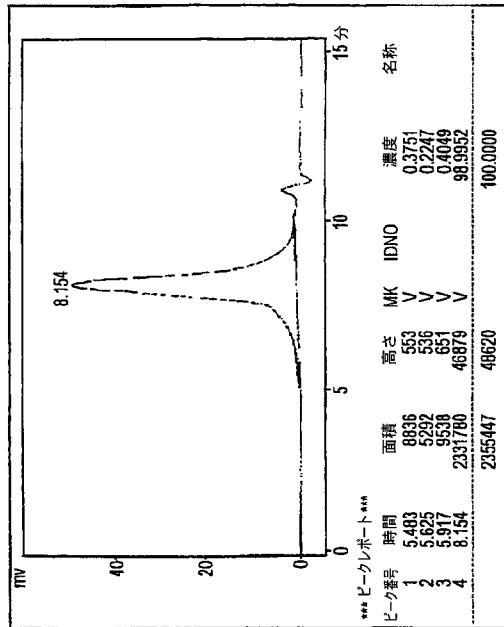


3-10 PhastGel 銀染色上等電点分画電気泳動

レーン 1 : Board 3-10 pI の検量キット

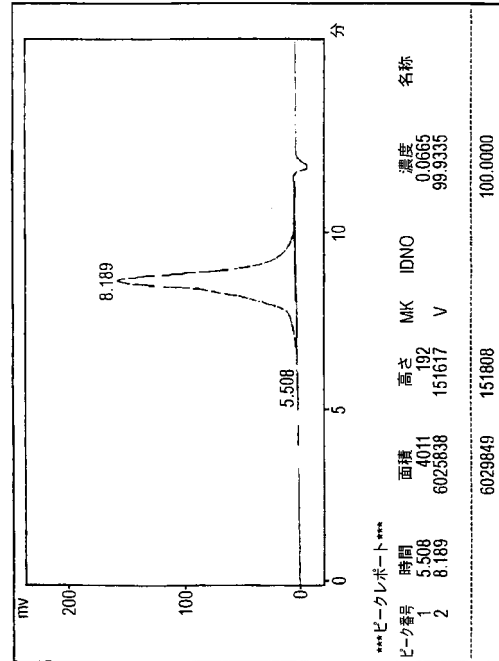
レーン 2 : 高度に精製されたメノトロピン (K_M) 生成物

【図 7】



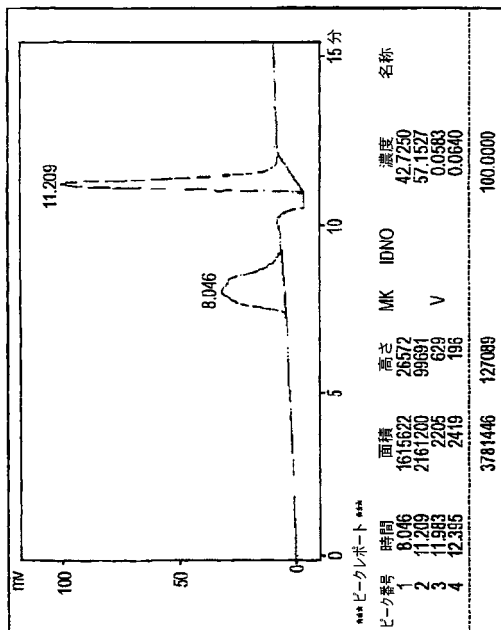
高度に精製されたメノトロピン (分画 K_M) サンプルの HPLC で得られた結果

【図 8】



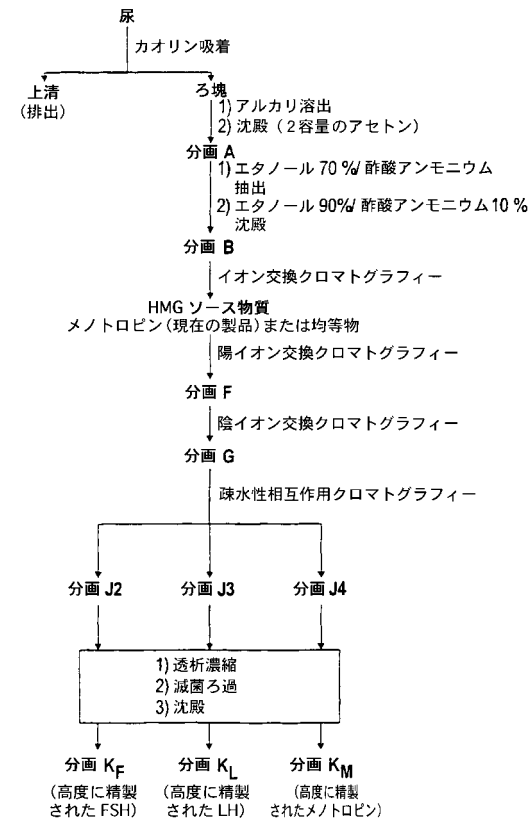
高度に精製された FSH (分画 K_F) サンプルの HPLC で得られた結果

【図 9】



Gonal (Serono) のサンプルの HPLC で得られた結果
保持時間 11.2 のピークは医薬製剤の賦形剤に相当する

【図 10】



高度に精製されたゴナドトロピンを得るためのフローチャート

フロントページの続き

- (72)発明者 ウォルフェンソン バンド、クラウディオ、フェルナンド
アルゼンチン国 ブエノス アイレス、ワシントン 3400
- (72)発明者 バラニアン、リリアナ、エスター
アルゼンチン国 ブエノス アイレス、ボウシェフ 451、シクシス フロア
- (72)発明者 グロイスマン、ホセ、フェリペ
アルゼンチン国 ブエノス アイレス、パロイシエン 2141
- (72)発明者 ファサネラ、エルンディナ、マルタ
アルゼンチン国 オリヴォス、マヌエル ベルツ 3697

審査官 小金井 悟

- (56)参考文献 国際公開第98/020039 (WO, A1)
英国特許出願公開第01065127 (GB, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- C07K 1/00-19/00
 - A61K 38/00-38/58
 - CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
 - JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 - PubMed