

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6411360号  
(P6411360)

(45) 発行日 平成30年10月24日 (2018.10.24)

(24) 登録日 平成30年10月5日 (2018.10.5)

(51) Int. Cl. F I  
**C O 7 K 1/16 (2006.01)** C O 7 K 1/16  
**C O 7 K 1/18 (2006.01)** C O 7 K 1/18  
**C O 7 K 14/75 (2006.01)** C O 7 K 14/75  
**C O 7 K 14/755 (2006.01)** C O 7 K 14/755  
**C O 7 K 14/745 (2006.01)** C O 7 K 14/745

請求項の数 10 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-545601 (P2015-545601)  
 (86) (22) 出願日 平成25年12月5日 (2013.12.5)  
 (65) 公表番号 特表2016-501878 (P2016-501878A)  
 (43) 公表日 平成28年1月21日 (2016.1.21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2013/001414  
 (87) 国際公開番号 W02014/085861  
 (87) 国際公開日 平成26年6月12日 (2014.6.12)  
 審査請求日 平成28年11月28日 (2016.11.28)  
 (31) 優先権主張番号 61/733,761  
 (32) 優先日 平成24年12月5日 (2012.12.5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 13153898.5  
 (32) 優先日 平成25年2月4日 (2013.2.4)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 597070264  
 ツェー・エス・エル・ベーリング・ゲー・  
 エム・ペー・ハー  
 ドイツ連邦共和国 D-35041 マルブ  
 ルク、エミル フォン ベーリング シュ  
 トラーセ 76  
 (74) 代理人 100127926  
 弁理士 結田 純次  
 (74) 代理人 100140132  
 弁理士 竹林 則幸  
 (72) 発明者 ハン・ファム  
 オーストラリア連邦ビクトリア州 3058  
 . コーバード、ベルグレーブストリート 4  
 O

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療タンパク質の精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フィブリノーゲン、第 V I I I 因子およびフォンビルブランド因子 (V W F) からなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質を含む溶液中におけるプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質のレベルを低下させる方法であって：

( i ) 原材料中に存在するプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質が疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂に結合するように選択された条件下で、フィブリノーゲン、第 V I I I 因子および V W F からなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質を含む原材料を該樹脂に通過させること；および

( i i ) 該樹脂を通過したフィブリノーゲン、第 V I I I 因子および V W F からなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質を含む溶液を回収すること  
 を含み、該溶液中におけるプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質の濃度が、原材料と比較して少なくとも 50 % 低下しており、

そして、フィブリノーゲン、第 V I I I 因子および V W F からなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質を含む原材料および / または溶液を疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂に通過させる前に、該疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂を 6 . 5 から 8 . 5 の pH で平衡化する、

10

20

前記方法。

【請求項 2】

工程 ( i i ) で回収したフィブリノーゲン、第 V I I I 因子および V W F からなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質を含む溶液を、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂に通過させることをさらに含む、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 3】

フィブリノーゲン、第 V I I I 因子および V W F からなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質を含む溶液を、150 mM から 270 mM の N a C l の存在下で陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂に通過させる、請求項 2 に記載の前記方法。

【請求項 4】

フィブリノーゲンを、150 mM から 300 mM の N a C l を含む溶出緩衝液で陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂から溶出させる、請求項 2 に記載の前記方法。

【請求項 5】

工程 ( i ) の前に、原材料にウイルス不活性化工程を行う、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 6】

疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂から回収したフィブリノーゲン、第 V I I I 因子および V W F からなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質を含む溶液に、ウイルス不活性化工程を行う、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 7】

原材料が可溶化した血漿寒冷沈降物である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 8】

工程 ( i ) の前に、原材料からビタミン K 依存性タンパク質を除去するか、または低減させる、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 9】

疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂を通過したフィブリノーゲン、第 V I I I 因子および V W F からなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質を含む原材料または溶液の p H が 6 . 5 から 8 . 5 である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 10】

疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂は、メルカプトエチルピリジン、n - ヘキシルアミンおよびフェニルプロピルアミンからなる群から選択されるリガンドを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は一般的に、少なくとも 1 種の治療タンパク質を含有する溶液中における不純物のレベルを低下させる方法および得られた治療タンパク質含有溶液に関する。より具体的には、フィブリノーゲンおよび / または第 V I I I 因子および / またはフォンビルブランド因子 ( V W F ) を含む原材料中におけるプラスミノゲンおよび / または組織プラスミノゲン活性化因子および / またはその他のプロテアーゼのレベルを低下させる方法に関する。本発明はまた、一般的に、このような方法によって回収されたフィブリノーゲンおよび / または第 V I I I 因子および / または V W F を含む溶液および医薬製剤ならびにそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

天然に生じるタンパク質、または組換え治療タンパク質を含む溶液から前記タンパク質を精製する現行法では通常、少なくとも数種の不純物が最終調製物に持ち越される。場合によっては、プロテアーゼなどの不純物が存在すると、特に貯蔵中に溶液中の治療タンパク質の安定性が損なわれる。このため、多くの治療タンパク質は、凍結乾燥調製物または

10

20

30

40

50

凍結調製物として貯蔵される。

【0003】

安定性を損なうレベルの不純物は、多くの様々な種類の治療タンパク質に影響を及ぼす可能性があり、このことは止血の維持に使用される治療タンパク質では特に問題である。止血は、血管への損傷（例えば、破裂）後の出血を防御する重要な生理学的プロセスである。止血を促進するには、3つの基本的な機構：(i) 血管収縮、(ii) 破裂部位の血小板凝集、および(iii) 血液凝固がある。血液凝固中、損傷を受けた内皮細胞は、組織因子（第III因子）を放出し、これは次に $Ca^{2+}$ の補助により第VII因子を活性化する。活性化した血小板によって放出された第XI因子は、第XI因子を活性化する。活性化した第VII因子および第XI因子は、第XI因子の活性化を導く酵素反応のカスケードを促進する。活性のある第XI因子（第XIa因子）は、第III因子、第V因子、 $Ca^{2+}$ および血小板トロンボプラスチン因子（ $PF_3$ ）と共に、プロトロンビン活性化因子を活性化する。プロトロンビン活性化因子は、プロトロンビンをトロンビンに変換し、トロンビンはフィブリノーゲン（第I因子）をフィブリンに変換し、フィブリンは損傷部位を覆う最初の網目を形成する。最初の網目は次に、第XIII因子によって密集したフィブリン血餅に変換され、部位が修復されるまで裂傷を封じる。血液凝固カスケードにおいて、トロンビンはまた、循環中に主にフォンビルブランド因子（VWF）と複合体を形成する糖タンパク質補因子前駆体である第XIII因子を活性化する。第XIII因子は第XIa因子と相互作用して、 $Ca^{2+}$ およびリン脂質の存在下で第XI因子を活性化する。

10

20

【0004】

フィブリノーゲン、第VII因子および/またはフォンビルブランド因子（VWF）を含む血液凝固に関連した1種または複数のタンパク質のいずれかのレベルの不足は、先天的であろうと、後天的であろうと、血液の凝固不十分および出血の危険性を導く恐れがある。現在の治療の選択肢は、1種または複数の治療タンパク質の内在的なレベルを回復させて止血を維持することを目的とした、前記治療タンパク質の医薬品調製物の投与に限定される。しかし、通常、献血された血漿または組織換え原料から得られる既存の医薬品調製物は、酵素前駆体およびプロテアーゼ（例えば、プロトロンビン、プラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子（tPA）および/またはその他のプロテアーゼ）を含み、貯蔵中にフィブリノーゲン、第VII因子またはVWFなどの治療タンパク質の安定性を損なう可能性がある。結果として、このような調製物は、水性溶液中において比較的不安定で、長期貯蔵には凍結乾燥または凍結した調製物に限定される。

30

【0005】

臨床に応用するために、フィブリノーゲンは通常ヒト血漿から精製するが、その場合、フィブリノーゲンは全血漿タンパク質の約2～5%（1.5～4.0 g/L）を占めるに過ぎない。従来、血漿からのフィブリノーゲンの精製は、フィブリノーゲンを血漿から寒冷沈降させ、その後、エタノール、硫酸アンモニウム、アラニン/グリシン、ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）または低イオン強度溶液のいずれかで沈殿させる古典的な血漿分画法によって実施されている。このような方法は、比較的高い収率および均一性を達成できる。より高い純度が必要な場合、クロマトグラフィー技術がしばしば使用される。しかし、商用規模の製造方法に適した既存の沈殿およびクロマトグラフィー技術では通常、溶液中におけるフィブリノーゲンの安定性を損なう可能性がある酵素前駆体またはプロテアーゼ（例えば、プロトロンビン、組織プラスミノーゲン活性化因子（tPA）およびプラスミノーゲン）などの汚染タンパク質を含むフィブリノーゲン調製物が生産される。例えば、プロトロンビンが存在する場合、プロトロンビンはセリンプロテアーゼトロンビンに活性化されて、次にこれはフィブリノーゲンをフィブリンに変換することが可能である。同様に、tPAおよびプラスミノーゲンの両方が存在する場合、tPAはプラスミノーゲンをその活性型であるプラスミンに活性化し、次にフィブリノーゲンをフィブリンに加水分解することが可能である。結果として、フィブリノーゲン調製物は、水性溶液中で比較的不安定であることから、長期貯蔵には凍結乾燥調製物または凍結調製物に

40

50

限定される。

【0006】

特定の汚染物質；例えば、フィブロンクチンは固定されたゼラチンに、プラスミノゲンは固定されたりシリンに吸収させることができる（非特許文献1）。しかし、特定の親和性樹脂の使用は、大規模の商業的方法には適さない。その理由としては、親和性樹脂自体が繰り返し使用するには丈夫さが不十分で、一般的に処理時間および経費の両方が著しく増大することが挙げられる。

【0007】

特許文献1は、イオン交換（IEX）クロマトグラフィーを使用して、フィブリノーゲン含有溶液からフィブリノーゲンを精製する方法を対象とする。特に、この方法は、フィブリノーゲンをマトリクスに結合させる条件下でフィブリノーゲン含有溶液をイオン交換マトリクスに添加し、その後、少なくとも1種のオメガアミノ酸を含む溶液でイオン交換マトリクスを洗浄することを含む。これは、樹脂からプラスミノゲンを区別して除去しやすくするために行われる。その後、マトリクスに結合したフィブリノーゲンをマトリクスから溶出させる。

【0008】

特許文献2は、フィブリノーゲンと結合する第三級または第四級アミンを接合したヒドロキシル化ポリマー支持体を含む陰イオン交換樹脂を使用してフィブリノーゲンを精製する方法を提供する。

【0009】

特許文献3は、主要なフィブリノーゲン画分がタンパク質1mg当たりプラスミノゲン約600ngを含有するように、フィブリノーゲンおよびプラスミノゲンがマトリクスに結合し、フィブリノーゲンとプラスミノゲンを別々に選択的に溶出させる条件下で、金属が固定されたイオンアフィニティークロマトグラフィーマトリクスを使用することを教示している。

【0010】

本発明は、フィブリノーゲンおよび/または第VII因子および/またはVWFを含む溶液中におけるプラスミノゲンおよび/または組織プラスミノゲン活性化因子および/またはその他のプロテアーゼのレベルを低下させる方法を提供する。精製したタンパク質は、液体調製物として貯蔵中安定であり、前記タンパク質のレベルの不足に関連した状態を治療または予防することを含む臨床適用または獣医学的適用に使用することができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】欧州特許第1240200号（米国特許第6960463号）

【特許文献2】国際公開第2012038410号

【特許文献3】欧州特許第1519944号

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】V u e n t o等、1979、B i o c h e m . J .、183（2）：331～337

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明の一態様では、フィブリノーゲン、第VII因子およびフォンビルブランド因子（VWF）からなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質を含む溶液中におけるプラスミノゲン、組織プラスミノゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質のレベルを低下させる方法であって：

（i）原材料中に存在するプラスミノゲン、組織プラスミノゲン活性化因子および

10

20

30

40

50

その他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質が疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂に結合するように選択された条件下で、フィブリノーゲン、第ⅤⅠⅠⅠ因子およびⅤⅤⅤⅤからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質を含む原材料を該樹脂に通過させること；および

( i i ) 該樹脂を通過したフィブリノーゲン、第ⅤⅠⅠⅠ因子およびⅤⅤⅤⅤからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質を含む溶液を回収すること  
を含み、該溶液中におけるプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質の濃度が、原材料と比較して少なくとも５０％低下している、前記方法を提供する。

【 ０ ０ １ ４ 】

10

本発明の別の態様では、フィブリノーゲン、第ⅤⅠⅠⅠ因子およびフォンビルブランド因子(ⅤⅤⅤⅤ)からなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質を含む溶液中におけるプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質のレベルを低下させる方法であって：

( i ) フィブリノーゲン、第ⅤⅠⅠⅠ因子およびⅤⅤⅤⅤからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質を含む原材料を第１の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂に通過させること；

( i i ) 第１の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂を通過したフィブリノーゲン、第ⅤⅠⅠⅠ因子およびⅤⅤⅤⅤからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質を含む溶液を回収すること；

20

( i i i ) 工程( i i )で回収した溶液を第２の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂に通過させること；および

( i v ) 第２の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂を通過したフィブリノーゲン、第ⅤⅠⅠⅠ因子およびⅤⅤⅤⅤからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質を含む溶液を回収すること；

を含み、ここでクロマトグラフィー工程の条件は、原材料中に存在するプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質が第１および／または第２の樹脂に結合するような条件であり、工程( i v )で回収した溶液中におけるプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質の濃度は、原材料と比較して少なくとも５０％低下している、前記方法を提供する。

30

【 ０ ０ １ ５ 】

別の態様では、本明細書で記載したような本発明の方法によって回収したフィブリノーゲン、第ⅤⅠⅠⅠ因子およびⅤⅤⅤⅤからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質を含む溶液を提供する。

【 ０ ０ １ ６ 】

別の態様では、少なくとも５ｍＬの安定した薬学的に許容されるフィブリノーゲン溶液を含有する容器であって、フィブリノーゲンの濃度は少なくとも２０ｍｇ／ｍＬである、前記容器を提供する。

40

【 ０ ０ １ ７ 】

別の態様では、本明細書で記載したような本発明の方法によって回収したフィブリノーゲン、第ⅤⅠⅠⅠ因子およびⅤⅤⅤⅤからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質を含む溶液ならびに薬学的に許容される担体を含む医薬製剤を提供する。

【 ０ ０ １ ８ 】

本発明の別の態様では：

( a ) 全タンパク質の少なくとも７５％のフィブリノーゲン；

( b ) 全タンパク質１ｍｇ当たり５０ｐｇ未満の組織プラスミノーゲン活性化因子；および／または

50

(c) 全タンパク質 1 mg 当たり 1  $\mu$ g 未満のプラスミノーゲンを含む溶液を提供する。

【0019】

本発明の別の態様では：

(a) 全タンパク質の少なくとも 90% のフィブリノーゲン；

(b) 全タンパク質 1 mg 当たり 50 pg 未満の組織プラスミノーゲン活性化因子；および/または

(c) 全タンパク質 1 mg 当たり 150 ng 未満のプラスミノーゲンを含む溶液を提供する。

【0020】

本発明の別の態様では：

(a) 全タンパク質の少なくとも 90% のフィブリノーゲン；

(b) 全タンパク質 1 mg 当たり 20 pg 未満の組織プラスミノーゲン活性化因子；および/または

(c) 全タンパク質 1 mg 当たり 10 ng 未満のプラスミノーゲンを含む溶液を提供する。

【0021】

別の態様では、フィブリノーゲン不足に関連した症状を治療または予防する方法であって、本明細書で開示したような本発明の溶液または医薬製剤を、それらを必要とする対象に投与することを含む、前記方法を提供する。

【0022】

別の態様では、フィブリノーゲン不足に関連した症状を治療または予防するための医薬品の製造における、本明細書で記載したような本発明の溶液の使用を提供する。

【0023】

別の態様では、本明細書で記載したような本発明の溶液を含むフィブリン糊を提供する。

【0024】

別の態様では、安定な液体フィブリノーゲン溶液を生産する方法であって：

(i) 原材料中に存在するプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質が疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂に結合するように選択された条件下で、フィブリノーゲンを含む原材料を該樹脂に通過させること；および

(ii) 該樹脂を通過したフィブリノーゲンを含む溶液を回収することを含み、該溶液中におけるプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質の濃度が、原材料と比較して少なくとも 50% 低下している、前記方法を提供する。

【0025】

別の態様では、安定な液体フィブリノーゲン溶液を生産する方法であって：

(i) フィブリノーゲンを含む原材料を第 1 の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂に通過させること；

(ii) 第 1 の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂を通過したフィブリノーゲンを含む溶液を回収すること；

(iii) 工程 (ii) で回収した溶液を第 2 の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂に通過させること；および

(iv) 第 2 の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂を通過したフィブリノーゲンを含む溶液を回収すること；

を含み、ここでクロマトグラフィー工程の条件は、原材料中に存在するプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質が第 1 および/または第 2 の樹脂に結合するような条件であり、工程 (iv) で回収した溶液中におけるプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン

10

20

30

40

50

活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質の濃度が、原材料と比較して少なくとも50%低下している、前記方法を提供する。

#### 【0026】

本発明の別の態様では、フィブリノーゲンを精製する方法であって：

(i) フィブリノーゲンモノマーがイオン交換クロマトグラフィー樹脂に結合するように選択された条件下で、フィブリノーゲンを含む溶液を該樹脂に通過させる工程；

(ii) 該樹脂からフィブリノーゲンモノマーを溶出緩衝液で溶出させる工程；および

(iii) 工程(ii)からの溶出したフィブリノーゲンモノマーを孔径が約15nmから約35nmの範囲のフィルターで濾過する工程

を含む、前記方法を提供する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0027】

【図1】溶液をフィブリノーゲンに対してネガティブモードでHEA Hypercel (商標)に通過させたときの、様々なpHレベルにおけるフィブリノーゲン溶液からのフィブリノーゲン、プラスミノゲンおよびt-PAの回収率を示す図である。各群の棒は(左から右に)：フィブリノーゲン回収率、プラスミノゲン回収率およびt-PA回収率を表す。

【図2】溶液をフィブリノーゲンに対してネガティブモードでPPA Hypercel (商標)に通過させたときの、様々なpHレベルにおけるフィブリノーゲン溶液からのフィブリノーゲン、プラスミノゲン、t-PAおよび第II因子の回収率を示す図である。各群の棒は(左から右に)：フィブリノーゲン回収率、プラスミノゲン回収率、t-PA回収率および第II因子を表す。

【図3】溶液をフィブリノーゲンに対してネガティブモードでMEP Hypercel (商標)に通過させたときの、様々なpHレベルにおけるフィブリノーゲン溶液からのフィブリノーゲン、プラスミノゲン、t-PAおよび第II因子の回収率を示す図である。各群の棒は(左から右に)：フィブリノーゲン回収率、プラスミノゲン回収率、t-PA回収率および第II因子を表す。

【図4a】溶液をフィブリノーゲンに対してネガティブモードでHEA Hypercel (商標)に通過させたときの、様々なpHレベルにおけるフィブリノーゲン含有溶液からのフィブリノーゲン、プラスミノゲン、t-PAおよび第II因子の回収率を示す図である。各群の棒は(左から右に)：フィブリノーゲン回収率、プラスミノゲン回収率、t-PA回収率および第II因子回収率を表す。

【図4b】HEA Hypercel (商標)カラム(図4a)の素通り画分から回収したフィブリノーゲン含有溶液の室温(約20℃)で6日間にわたる安定性を、初期凝固タンパク質(initial clottable protein)の%によって測定して示した図である。各群の棒は(左から右に)：T=1日目、T=3日目、T=6日目を表す。

【図4c】HEA Hypercel (商標)カラム(図4a)の素通り画分から回収したフィブリノーゲン含有溶液の室温(約20℃)で6日間にわたる安定性を、凝固タンパク質の%によって測定して示した図である。各群の棒は(左から右に)：T=1、T=3日目、T=6日目を表す。

【図5】本発明の一実施形態による方法から得られた画分中におけるフィブリノーゲン、t-PA、プラスミノゲンおよび第II因子の血漿寒冷沈降物からMacroPrep (商標)-HQ溶出物までの処理回収率(process recovery)を示した図である。各群の棒は(左から右に)：フィブリノーゲン、フィブロネクチン、プラスミノゲン、t-PAおよび第II因子を表す。

【図6】MacroPrep (商標)-HQクロマトグラフィー樹脂から回収したモノマーフィブリノーゲンの純度を、サイズ排除HPLCクロマトグラムの分析によって測定して示した図である。

10

20

30

40

50

【図7】Macro Prep (商標) - HQクロマトグラフィー樹脂から、様々な伝導率の溶出緩衝液 (190 mM NaCl、21.5 mS/cm (菱形); 200 mM NaCl、22.5 mS/cm (四角); 210 mM NaCl、23.5 mS/cm (三角); 1% (w/w) アルギニン / 200 mM NaCl、25 mS/cm (十字)) を使用して回収したフィブリノーゲンの濾過性を示した図である。

【図8】Macro Prep (商標) - HQクロマトグラフィー樹脂から回収した液体フィブリノーゲンを2~8 (菱形) で9週間または30 (四角) で7週間のいずれかで貯蔵し、そのフィブリノーゲン活性を  $t = 0$  での初期フィブリノーゲン活性のパーセントとして示した図である。

【発明を実施するための形態】

10

【0028】

本明細書を通じて、文脈で特に必要とされない限り、語句「含む (comprise)」または「含む (comprises)」および「含む (comprising)」などの変化形は、記述された要素もしくは整数または要素もしくは整数の群を含むが、いかなるその他の要素もしくは整数または要素もしくは整数の群も排除しないことを意味するものと理解されたい。

【0029】

本明細書における全ての先行刊行物 (もしくは先行刊行物から得られる情報) または公知の全ての事項への言及は、先行刊行物 (もしくは先行刊行物から得られる情報) または公知の事項が、本明細書が関与する開発分野において共通の一般的知識の一部を構成するという認識または承認または何らかの形態の示唆ではなく、かつそのように解釈されないものとする。

20

【0030】

本明細書で使用したように、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈で特に明確に記載していなければ、複数の態様を含むことに注意しなければならない。したがって、例えば、「製剤」参照する場合は、単一の製剤および2種類以上の製剤を含む。

【0031】

反論を示唆するものがない場合は、本明細書を通じて「%」含量という場合、% w/w (重量/重量) を意味するものと考えられる。例えば、全タンパク質の少なくとも80%のフィブリノーゲンを含む溶液とは、全タンパク質の少なくとも80% w/wの濃度でフィブリノーゲンを含む溶液を意味するものと考えられる。これは、例えば、凝固タンパク質アッセイから得られたフィブリノーゲンの量を標準的タンパク質アッセイ (例えば、ビウレット) から得られた全タンパク質量で割って、100を掛けることによって算出できる。凝固タンパク質アッセイでは、トロンビンを試料に添加すると血餅が形成されるが、この血餅はほとんど全てフィブリンである。血餅は、非凝固タンパク質を含有する上清から遠心分離できる。その後、血餅を洗浄し、アルカリ性尿素またはその他の物質によって溶解し、タンパク質濃度を分光光度法によって測定する。血餅の大部分がフィブリンなので、タンパク質濃度は、フィブリノーゲン濃度に相当する。したがって、試料中の凝固タンパク質の量は、試料の全タンパク質と非凝固タンパク質成分の間の差に相当する。

30

【0032】

40

原材料 (例えば、血漿または細胞培養上清) からのフィブリノーゲンおよび/または第VII因子および/またはVWFの精製は通常、従来の分画法によって実施され、フィブリノーゲンおよび/または第VII因子および/またはVWFは、例えば、エタノール、硫酸アンモニウム、アラニン/グリシン、ポリマー (例えば、ポリエチレングリコール) および/または低イオン強度溶液を使用して溶液から沈殿される。様々なクロマトグラフィー工程を使用する現在の血漿精製方法は、関心のあるタンパク質の比較的高い収率および均一性での調製を実現することができる。しかし、これらの方法では通常、臨床応用のための安定な液体調製物を製剤化するには適さない量の不純物が残存する調製物が生じる。プロトロンビン、組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA) およびプラスミノゲンなどの不純物は、不安定化レベルのこれらの不純物は水溶液中においてフィブリノ

50



ーゲンを加水分解することがあり、したがって、特に製造中および／または長期貯蔵中にフィブリノーゲンを不安定にするので、特に問題である。

【 0 0 3 3 】

本発明は、少なくとも一部には、フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤを含む原材料を疎水性電荷誘導クロマトグラフィー（ＨＣＩＣ）樹脂に通過させ、樹脂を通過したフィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤを含む溶液を回収することが、溶液中におけるプラスミノーゲンおよび／または組織プラスミノーゲン活性化因子および／またはその他のプロテアーゼの不安定化レベルを低下させるために既存の精製方法の効果的な代替法であるという発見に基づいている。

【 0 0 3 4 】

したがって、本発明の一態様では、フィブリノーゲン、第ⅤⅠⅠⅠ因子およびフォンビルブランド因子（ⅤⅤⅤ）からなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質を含む溶液中におけるプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質のレベルを低下させる方法であって、

（ｉ）原材料中に存在するプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質が疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂に結合するように選択された条件下で、フィブリノーゲン、第ⅤⅠⅠⅠ因子およびⅤⅤⅤからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質を含む原材料を該樹脂に通過させること；および

（ｉｉ）該樹脂を通過したフィブリノーゲン、第ⅤⅠⅠⅠ因子およびⅤⅤⅤからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質を含む溶液を回収することを含み、該溶液中におけるプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質の濃度が、原材料と比較して少なくとも５０％低下している、前記方法を提供する。

【 0 0 3 5 】

一実施形態では、フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤを含む回収溶液中におけるプラスミノーゲンおよび／または組織プラスミノーゲン活性化因子および／またはその他のプロテアーゼの濃度は、原材料と比較して少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または少なくとも９８％低下する。

【 0 0 3 6 】

別の態様では、安定な液体フィブリノーゲン溶液を生産する方法であって：

（ｉ）原材料中に存在するプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質が疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂に結合するように選択された条件下で、フィブリノーゲンを含む原材料を該樹脂に通過させること；および

（ｉｉ）該樹脂を通過したフィブリノーゲンを含む溶液を回収することを含み、該溶液中におけるプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも１種のタンパク質の濃度が、原材料と比較して少なくとも５０％低下している、前記方法を提供する。

【 0 0 3 7 】

一実施形態では、フィブリノーゲンを含む回収溶液中におけるプラスミノーゲンおよび／または組織プラスミノーゲン活性化因子および／またはその他のプロテアーゼの濃度は、原材料と比較して少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％または少なくとも９５％または少なくとも９８％低下する。

【 0 0 3 8 】

クロマトグラフィー法は通常、本明細書では樹脂またはマトリクスとも同義に称される固体支持体を使用する。適切な固体支持体は、当業者には周知である。例には、ガラスおよびシリカゲルなどの無機担体、アガロース、セルロース、デキストラン、ポリアミド、

10

20

30

40

50

ポリアクリルアミド、二機能性アクリル酸のビニルコポリマーおよび様々なヒドロキシル化モノマーなどの合成もしくは天然に生じる有機担体などが含まれる。市販の担体は、Sephadex (商標)、Sephacrose (商標)、Hypercel (商標)、Captop (商標)、Fractogel (商標)、MacroPrep (商標)、Unosphere (商標)、GigaCap (商標)、Trisacryl (商標)、Ultrogel (商標)、Dynospheres (商標)、Macrosorb (商標) および XAD (商標) 樹脂の名称で販売されている。

【0039】

クロマトグラフィー工程は一般的に、非変性条件下で、約 +10 から +30 の範囲の都合のよい温度で、より一般的には周囲温度で実施する。クロマトグラフィー工程は、適宜、バッチ式で、または連続的に実施してもよい。カラム、遠心、濾過、傾瀉などの都合のよいいかなる分離方法を使用してもよい。

10

【0040】

しばしばミックスモードまたはマルチモードクロマトグラフィーとも呼ばれる疎水性電荷誘導クロマトグラフィー (HCIC) は、当業者には周知である。HCIC は、固体支持体に連結した結合部分を使用しており、この結合部分は、本発明の方法に従って、原材料中の不純物 (例えば、プロトンピン、tPA およびプラスミノージェンなどの酵素前駆体およびプロテアーゼ) を代表とする 1 種または複数のタンパク質に対して特異的であってもよい。

【0041】

20

当業者公知の任意の適切な HCIC 樹脂を使用することができる。一実施形態では、HCIC 樹脂は、メルカプトエチルピリジン (4 -メルカプトエチルピリジン、例えば、MEP Hypercel (商標))、n -ヘキシルアミン (例えば、HEA Hypercel (商標)) およびフェニルプロピルアミン (例えば、PPA Hypercel (商標)) からなる群から選択されるリガンドを含む。一実施形態では、HCIC 樹脂は、n -ヘキシルアミンを含む。

【0042】

HEA、MEP および PPA などの HCIC リガンドは、タンパク質の表面疎水性に基づいて分離を可能にするが、疎水性クロマトグラフィー (例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィー; HIC) を使用したフィブリノーゲンを精製するためのその他の方法でしばしば見られるリオトロピック塩の添加を必要としないことが利点である。伝統的な疎水性相互作用クロマトグラフィーとは対照的に、HCIC は、塩濃度よりも pH に基づいて制御される。HCIC 樹脂はまた、高い結合能および速い流速を実現し、研究室および産業規模の精製に理想的である。

30

【0043】

HCIC 樹脂は、床高約 2 cm から約 40 cm のカラムに充填されることが多い。産業規模では、床高は通常少なくとも 10 cm で、典型的には約 15 cm から 25 cm の範囲である。産業用カラムのカラム径は、20 cm から約 1.5 m までの範囲であってもよい。このようなカラムは、HCIC 樹脂製造指示書による流速で操作され、典型的な流速は 50 ~ 100 cm/hr の範囲である。流速に上限があるのは、一部には HCIC 樹脂に圧力の制約があるためである。HEA 樹脂では、例えば、操作圧の上限は < 3 bar (< 300 kPa) である。HCIC 樹脂の典型的な動的結合容量 (結合タンパク質の 10 % が破過する) は、樹脂 1 mL 当たり結合タンパク質約 20 から 30 mg である。本発明では、フィブリノーゲンのような豊富なタンパク質はカラムを通過することができる一方、プラスミノージェンおよび / または組織プラスミノージェン活性化因子および / またはその他のプロテアーゼなどのあまり多くないタンパク質は HCIC 樹脂に結合するので、HCIC カラムに比較的大量のタンパク質を添加することが可能である。バッチの処理にはサイズのより小さいカラムおよび / またはより少ないカラム使用回数のいずれかが必要となるので、このことは産業規模の製造のために有利である。

40

【0044】

50

本発明者等はまた、本発明の方法によってH C I C樹脂を通過したフィブリノーゲンおよび/または第V I I I因子および/またはV W Fを含む溶液または原材料のp Hは、フィブリノーゲンおよび/または第V I I I因子および/またはV W Fの回収率および不純物の除去を制御するために調節できることを発見した。したがって、本明細書で開示した実施形態では、H C I C樹脂を通過したフィブリノーゲンおよび/または第V I I I因子および/またはV W Fを含む溶液または原材料のp Hは約6 . 0から約9 . 5である。特定の実施形態では、フィブリノーゲンおよび/または第V I I I因子および/またはV W Fを含む溶液または原材料は、好ましくは約4 . 0、5 . 0、5 . 2 5、5 . 5、5 . 7 5、6 . 0、6 . 2 5、6 . 5、6 . 7 5、7 . 0、7 . 2 5、7 . 5、7 . 7 5、8 . 0、8 . 2 5、8 . 5、8 . 7 5、9 . 0、9 . 2 5、9 . 5または1 0 . 0のp HでH C I C樹脂を通過する。特定の実施形態では、H C I C樹脂を通過したフィブリノーゲンおよび/または第V I I I因子および/またはV W Fを含む溶液または原材料のp Hは約7 . 0である。特定の実施形態では、溶液または原材料を添加する前に、H C I C樹脂を約4 . 0、5 . 0、5 . 2 5、5 . 5、5 . 7 5、6 . 0、6 . 2 5、6 . 5、6 . 7 5、7 . 0、7 . 2 5、7 . 5、7 . 7 5、8 . 0、8 . 2 5、8 . 5、8 . 7 5、9 . 0、9 . 2 5、9 . 5または1 0 . 0のp Hに平衡化する。

#### 【0045】

本発明の方法はまた、必要に応じて、他の不純物を除去するために複数のさらなるクロマトグラフィー工程を採用し、こうして最終調製物の純度を高めることができる。さらなるクロマトグラフィー精製工程は、本発明によるH C I C樹脂でのフィブリノーゲンおよび/または第V I I I因子および/またはV W Fの精製前後のいずれかに実行することができる。例えば、工程(i i)においてH C I C樹脂から回収したフィブリノーゲンおよび/または第V I I I因子および/またはV W Fを含む溶液を、別のクロマトグラフィー樹脂に通過させることができる。

#### 【0046】

さらなるクロマトグラフィー精製工程は、別のH C I C樹脂を使用してもよい。したがって、本発明の別の態様では、フィブリノーゲン、第V I I I因子およびフォンビルブランド因子(V W F)からなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質を含む溶液中におけるプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質のレベルを低下させる方法であって：

(i) フィブリノーゲン、第V I I I因子およびV W Fからなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質を含む原材料を第1の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂に通過させること；

(i i) 第1の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂を通過したフィブリノーゲン、第V I I I因子およびV W Fからなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質を含む溶液を回収すること；

(i i i) 工程(i i)で回収した溶液を第2の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂に通過させること；および

(i v) 第2の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂を通過したフィブリノーゲン、第V I I I因子およびV W Fからなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質を含む溶液を回収すること；

を含み、ここでクロマトグラフィー工程の条件は、原材料中に存在するプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質が第1および/または第2の樹脂に結合するような条件であり、工程(i v)で回収した溶液中におけるプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質の濃度が、原材料と比較して少なくとも50%低下している、前記方法を提供する。

#### 【0047】

一実施形態では、工程 ( i v ) で回収したフィブリノーゲンおよび/または第 V I I I 因子および/または V W F を含む溶液中におけるプラスミノーゲンおよび/または組織プラスミノーゲン活性化因子および/またはその他のプロテアーゼの濃度は、原材料と比較して少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、または少なくとも 9 0 % または少なくとも 9 5 % または少なくとも 9 8 % 低下している。

#### 【 0 0 4 8 】

別の態様では、安定した液体フィブリノーゲン溶液を製造する方法であって：

( i ) フィブリノーゲンを含む原材料を第 1 の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂に通過させること；

( i i ) 第 1 の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂を通過したフィブリノーゲンを含む溶液を回収すること；

( i i i ) 工程 ( i i ) で回収した溶液を第 2 の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂に通過させること；および

( i v ) 第 2 の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂を通過したフィブリノーゲンを含む溶液を回収すること；

を含み、ここでクロマトグラフィー工程の条件は、原材料中に存在するプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質が第 1 および/または第 2 の樹脂に結合するような条件であり、工程 ( i v ) で回収した溶液中におけるプラスミノーゲン、組織プラスミノーゲン活性化因子およびその他のプロテアーゼからなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質の濃度が、原材料と比較して少なくとも 5 0 % 低下している、前記方法を提供する。

#### 【 0 0 4 9 】

一実施形態では、工程 ( i v ) で回収したフィブリノーゲン含む溶液中におけるプラスミノーゲンおよび/または組織プラスミノーゲン活性化因子および/またはその他のプロテアーゼの濃度は、原材料と比較して少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、または少なくとも 9 0 % または少なくとも 9 5 % または少なくとも 9 8 % 低下している。

#### 【 0 0 5 0 】

本明細書で開示した実施形態では、第 2 の H C I C 樹脂は、第 1 の H C I C 樹脂とは異なる。本明細書で開示した別の実施形態では、第 1 および第 2 の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂は同じである。工程 ( i i ) で H C I C 樹脂から回収したフィブリノーゲンおよび/または第 V I I I 因子および/または V W F を含む溶液を同じ H C I C 樹脂を通過させる場合、樹脂に結合し得るいかなる不純物も除去するために、工程 ( i i ) の後および工程 ( i i i ) で回収した溶液を再度 H C I C 樹脂に通過させる前に、H C I C 樹脂を洗浄することが所望されることがある。

#### 【 0 0 5 1 】

さらなるクロマトグラフィー樹脂はまた、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂であってもよい。陰イオン交換クロマトグラフィーにおいて、負荷電を有する分子は、正荷電を有する固体支持体に引きつけられる。正荷電を有する固体支持体は、当業者公知の任意の手段によって調製することができ、固体支持体に負荷電を有する機能的リガンドを共有結合することが通常必要である。適切な負荷電を有する機能的リガンドは、溶液から分離しようとする分子によってほぼ決まる。適切な陰イオン交換樹脂の例は、機能的な第四級アミン基 ( Q ) および/または第三級アミン基 ( D E A E ) またはジエチルアミノプロピル基 ( A N X ) を含む樹脂である。市販の陰イオン交換クロマトグラフィーマトリクスには、限定はしないが、D E A E セルロース、Applied Biosystems 社製の Poros ( 商標 ) P I 2 0、P I 5 0、H Q 1 0、H Q 2 0、H Q 5 0、D 5 0、GE Healthcare 社製の Mono Q ( 商標 )、Mini Q ( 商標 )、Source ( 商標 ) 1 5 Q および 3 0 Q、Q、D E A E および A N X Sepharose Fast Flow ( 商標 )、Q Sepharose high Performance (

商標)、QAE SEPHADEX (商標) および FAST Q SEPHAROSE (商標)、J. T. Baker 社製の WP PEI (商標)、WP DEAM (商標)、WP QUAT (商標)、Biochrom Labs Inc. 社製の Hydrocell (商標) DEAE および Hydrocell (商標) QA、Biorad 社製の UNOSphere (商標) Q、Macro-Prep (商標) DEAE および Macro-Prep (商標) High Q、Pall Technologies 社製の Ceramic HyperD (商標) Q、ceramic HyperD (商標) DEAE、Q HyperZ (商標)、Trisacryl (商標) M および LS (商標) DEAE、Spherodex (商標) LS DEAE、QMA Spherosil (商標) LS、QMA Spherosil (商標) M、Dow Liquid Separations 社製の DOWEX (商標) Fine Mesh Strong Base Type I および Type II Anion Matrix および DOWEX (商標) MONOSPHERE E77、弱塩基性陰イオン、Millipore 社製の Matrex Cellulfine (商標) A200、A500、Q500 および Q800、EMD 社製の Fractogel (商標) EMD TMAE<sub>3</sub> Fractogel (商標) EMD DEAE および Fractogel (商標) EMD DMAE、Sigma-Aldrich 社製の Amberlite (商標) 弱および強陰イオン交換体 type I および II、DOWEX (商標) 弱および強陰イオン交換体 type I および II、Diaion (商標) 弱および強陰イオン交換体 type I および II、Duolite (商標)、Tosoh 社製の TSK (商標) ゲル Q および DEAE 5PW および 5PW-HR、Toyopearl (商標) Super Q-650S、650M および 650C<sub>3</sub> QAE-26-550C および 650S、DEAE-650M および 650C、ならびに Whatman 社製の QA52 (商標)、DE23 (商標)、DE32 (商標)、DE51 (商標)、DE52 (商標)、DE53 (商標)、Express-Ion (商標) D および Express-Ion (商標) Q が含まれる。

#### 【0052】

所望に応じて、陰イオン交換クロマトグラフィーマトリクス代わりに、陰イオン交換クロマトグラフィー膜を使用してもよい。市販の陰イオン交換膜には、限定はしないが、Sartorius 社製の Sartobind (商標) Q、Pall Technologies 社製の Mustang (商標) Q および Millipore 社製の Interccept (商標) Q 膜が含まれる。

#### 【0053】

本明細書で開示した一実施形態では、陰イオン交換樹脂は強陰イオン交換樹脂である。本明細書で開示した別の実施形態では、強陰イオン交換樹脂には、第四級アミン機能性リガンド (例えば、MacroPrep (商標) - HQ; Bio-Rad Laboratories に見られるような  $-N^+(CH_3)_3$ ) が含まれる。さらに別の実施形態では、陰イオン交換樹脂は、GigaCap Q-650M (登録商標) などの架橋基を介してヒドロキシル化メタクリル酸ポリマーに接合したトリメチルアミン基である。

#### 【0054】

一実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィーは、フィブリノーゲンおよび/または第VII因子および/またはVWFに関してポジティブモードで実施される。すなわち、使用した条件は、フィブリノーゲンおよび/または第VII因子および/またはVWFを含む溶液または原材料が陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂を通過するとき、フィブリノーゲンおよび/または第VII因子および/またはVWFは樹脂に連結した正荷電を有する官能基に結合し、溶液中の不純物は樹脂からフロースルー(素通り)画分に通過させ、廃棄またはその他の目的のために回収することができるような条件である。フロースルー画分が一旦樹脂を通過したら、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂を当業者公知の適切な洗浄緩衝液で洗浄することができる。洗浄緩衝液の構成物および洗浄工程の条件は通常、樹脂に結合したフィブリノーゲンおよび/または第VII因子および/またはVWFが洗浄工程中保持されるように選択する。当業者はまた、洗浄緩衝液を参照す

10

20

30

40

50

る場合は、溶出緩衝液またはクロマトグラフィーに関して類似の緩衝液は、緩衝能が限定された、または緩衝能のない溶液を含むことができることを認識するだろう。

【0055】

本明細書で開示した一実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂からフィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅢⅢ因子および/またはⅤⅤⅤを溶出する前に、イブシロン-アミノカプロン酸(-ACA)を含む洗浄液で樹脂を洗浄する。洗浄緩衝液にACAを添加することによって、最初の通過中に陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂に結合する可能性があるプロテアーゼ(プラスミノーゲンなど)の溶出を促進することができる。適切な洗浄工程の一例は、米国特許第6,960,463号に記載されている。

【0056】

陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂に結合したままのフィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅢⅢ因子および/またはⅤⅤⅤを溶出させるために、当業者公知の任意の適切な溶出緩衝液を使用することができる。フィブリノーゲンを含む溶液からプラスミノーゲンおよび/またはt-PAおよび/またはその他のプロテアーゼを除去するために、本発明者等は、約150mMから約300mMのNaClを含む溶出緩衝液が、同様に樹脂に結合することがあるフィブリノーゲン凝集物および/またはその他のタンパク質(例えば、第ⅤⅢⅢ因子、ⅤⅤⅤ、フィブロンネクチンまたはプロテアーゼ)の溶出を最小限に抑え、陰イオン交換樹脂からフィブリノーゲンモノマーを溶出させることを発見した。したがって、本明細書で開示した一実施形態では、フィブリノーゲンを、約150mMから約300mMのNaClを含む溶出緩衝液で陰イオン交換樹脂から溶出させる。これは、伝導率の範囲が約18mS/cm(150mM NaCl)から約32mS/cm(300mM NaCl)の溶出緩衝液と同等である。

【0057】

別の実施形態では、フィブリノーゲンを、NaCl約150mMから約270mMを含む溶出緩衝液で陰イオン交換樹脂から溶出させる。これは、伝導率の範囲が約18mS/cm(150mM NaCl)から約29mS/cm(270mM NaCl)の溶出緩衝液と同等である。

【0058】

別の実施形態では、フィブリノーゲンを、約170mMから約230mMのNaClを含む溶出緩衝液で陰イオン交換樹脂から溶出させる。これは、伝導率の範囲が約19mS/cm(170mM NaCl)から約25mS/cm(230mM NaCl)の溶出緩衝液と同等である。

【0059】

別の実施形態では、フィブリノーゲンを、約200mMから約220mMのNaClを含む溶出緩衝液で陰イオン交換樹脂から溶出させる。これは、伝導率の範囲が約22mS/cm(200mM NaCl)から約24mS/cm(220mM NaCl)の溶出緩衝液と同等である。

【0060】

別の実施形態では、フィブリノーゲンを、約190mMから約210mMのNaClを含む溶出緩衝液で陰イオン交換樹脂から溶出させる。

【0061】

別の実施形態では、フィブリノーゲンを、約150mMから約190mMのNaClを含む溶出緩衝液で陰イオン交換樹脂から溶出させる。

【0062】

別の実施形態では、溶出緩衝液の伝導率は、18から32mS/cm;または20から25mS/cm;または21から23.5mS/cm;または22から23mS/cmの範囲である。好ましい実施形態では、溶出緩衝液の伝導率は約22.5mS/cmである。

【0063】

本明細書で開示した実施形態では、溶出緩衝液は、フィブリノーゲンの凝集物よりもフ

10

20

30

40

50

フィブリノーゲンモノマーの溶出を促進する濃度の遊離アミノ酸を含む。別の実施形態では、溶出緩衝液は、約 0.5 から 10 % (w/w) の濃度の遊離アミノ酸を含む。任意の適切な遊離アミノ酸をこの濃度範囲で 사용할 ことができる。一実施形態では、遊離アミノ酸はアルギニンである。別の実施形態では、溶出緩衝液は、約 4 から約 10 % (w/w) の範囲のアルギニンを含む。

【0064】

その他の実施形態では、溶出緩衝液は、200 mM NaCl、0.5 % (w/w) アルギニン；または 160 mM NaCl、1 % (w/w) アルギニンを含む。

【0065】

一実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィーは、フィブリノーゲンに関してはネガティブモードで、第 V I I I 因子および / または V W F に関してはポジティブモードで実施される。すなわち、使用した条件は、フィブリノーゲンおよび第 V I I I 因子および / または V W F を含む溶液または原材料が陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂を通過するとき、第 V I I I 因子および / または V W F は樹脂に連結した正荷電を有する官能基に結合し、溶液中のフィブリノーゲンは樹脂からフロースルー（素通り）画分に通過させるような条件である。フィブリノーゲンを含有するフロースルー画分が一旦樹脂を通過したら、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂を当業者公知の適切な洗浄緩衝液で洗浄することができる。洗浄緩衝液の構成物および洗浄工程の条件は通常、樹脂に結合した第 V I I I 因子および / または V W F が洗浄工程中保持されるように選択する。

【0066】

一実施形態では、フィブリノーゲンおよび / または第 V I I I 因子および / または V W F を含む溶液または原材料を、約 150 mM から約 270 mM の NaCl の存在下で陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂に通過させる。これは、伝導率の範囲が約 18 mS / cm (150 mM NaCl) から約 29 mS / cm (270 mM NaCl) と同等である。これらの条件下で、特にモノマー型のフィブリノーゲンは陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂を通過し、凝集物ならびに IgG およびフィブロネクチンなどのその他の不純物を含有するフィブリノーゲンは樹脂に結合する。他の実施形態では、フィブリノーゲンおよび / または第 V I I I 因子および / または V W F を含む溶液または原材料は、約 170 mM から約 230 mM (約 19 mS / cm から約 25 mS / cm) の NaCl または約 200 mM から約 220 mM (約 22 mS / cm から約 24 mS / cm) の NaCl の存在下で陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂を通過する。この種の条件下では、第 V I I I 因子および / または V W F は陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂に結合することが予測される。

【0067】

第 V I I I 因子および / または V W F を、NaCl などの塩を少なくとも 300 mM 含む溶出緩衝液で陰イオン交換樹脂から溶出させることができる。特定の実施形態では、第 V I I I 因子および / または V W F を、約 500 mM の NaCl でイオン交換樹脂から溶出させる。フィブリノーゲンおよび第 V I I I 因子および / または V W F が陰イオン交換樹脂に結合する場合、溶出工程は、フィブリノーゲンが最初に溶出し（例えば、前記の実施形態で設定した条件を使用して）、次いで 500 mM NaCl などのより高濃度の塩を使用して第 V I I I 因子および / または V W F が溶出できるように実施することができる。

【0068】

陰イオン交換クロマトグラフィー工程を使用する場合、フィブリノーゲンおよび / または第 V I I I 因子および / または V W F を含む原材料を H C I C 樹脂に通過させる前および / または後のいずれかで実施することができる。本明細書で開示した一実施形態では、方法はさらに、工程 (i i) で回収したフィブリノーゲンおよび / または第 V I I I 因子および / または V W F を含む溶液を、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂に通過させることを含む。別の実施形態では、本明細書に記載したように、第 1 および第 2 の H C I C クロマトグラフィー工程を使用する場合、方法はさらに、工程 (i i) および / または工

程 ( i v ) で回収したフィブリノーゲンおよび / または第 V I I I 因子および / または V W F を含む溶液を、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂に通過させることを含む。

【 0 0 6 9 】

本明細書で開示した一実施形態では、方法はさらに、工程 ( i ) の前に、フィブリノーゲンおよび / または第 V I I I 因子および / または V W F を含む原材料を陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂に通過させることを含む。

【 0 0 7 0 】

当業者であれば、本発明によって使用した追加のクロマトグラフィー工程の数は、最終調製物に必要な純度のレベルに左右されることを理解しているものと予想される。例えば、本発明の方法は、本明細書で開示したように、2、3、4または5回のクロマトグラフィー工程を含んでいてもよい。例えば、方法に2回のクロマトグラフィーが含まれる場合、工程の順番は、H C I C / I E X または H C I C / H C I C または I E X / H C I C であり ; 方法に3回のクロマトグラフィー工程が含まれる場合、工程の順番は H C I C / I E X / H C I C または H C I C / H C I C / I E X または H C I C / H C I C / H C I C または H C I C / I E X / I E X または I E X / H C I C / H C I C または I E X / H C I C / I E X または I E X / I E X / H C I C であり ; 方法に4回のクロマトグラフィー工程が含まれる場合、工程の順番は H C I C / I E X / H C I C / H C I C または H C I C / H C I C / I E X / H C I C または H C I C / H C I C / H C I C / I E X または H C I C / H C I C / H C I C / H C I C または H C I C / I E X / I E X / H C I C または H C I C / I E X / I E X / I E X または H C I C / H C I C / I E X / I E X または H C I C / I E X / H C I C / I E X または I E X / H C I C / I E X / H C I C または I E X / H C I C / H C I C / H C I C または I E X / H C I C / I E X / I E X または I E X / I E X / H C I C / H C I C または I E X / I E X / H C I C / I E X または I E X / I E X / I E X / H C I C である ; などである ( 「 I E X 」 は陰イオン交換クロマトグラフィーを示す ) 。必要な純度レベルは、溶液の企図する使用 ( 例えば、フィブリノーゲンおよび / または第 V I I I 因子および / または V W F 不足の患者の治療のため ) および / または水性調製物としてより長期の貯蔵期間が必要である場合によって決定される。

【 0 0 7 1 】

クロマトグラフィーは、当業者公知の任意の手段を使用して実施することができる。例えば、本発明によるクロマトグラフィー工程は、G E H e a l t h c a r e 、 P a l l C o r p o r a t i o n および B i o - R a d から入手可能なものなどの軸流カラムを使用するか、または P r o x c y s から入手可能なものなどの放射流カラムを使用することができる。本発明によるクロマトグラフィー工程はまた、膨張床技術を使用して実行することができる。

【 0 0 7 2 】

一実施形態では、フィブリノーゲンおよび / または第 V I I I 因子および / または V W F を含む回収溶液中におけるプラスミノーゲンおよび / または組織プラスミノーゲン活性化因子および / またはその他のプロテアーゼの濃度は、原材料と比較して少なくとも 6 0 % 、少なくとも 7 0 % 、少なくとも 8 0 % または少なくとも 9 0 % または少なくとも 9 5 % 低下している。

【 0 0 7 3 】

プラスミノーゲンおよび / または組織プラスミノーゲン活性化因子および / またはその他のプロテアーゼなどの不純物の除去を最大限にする方法は、溶液中のフィブリノーゲンおよび / または第 V I I I 因子および / または V W F の安定性および効率が、特に長期貯蔵中において明らかに改善されるので、特に有利である。液体形態での貯蔵は、患者にすぐに使用することができるので、フィブリノーゲンおよび / または第 V I I I 因子および / または V W F を含む溶液には特に有利である。精製したフィブリノーゲンおよび / または第 V I I I 因子および / または V W F の凍結乾燥調製物の使用では、それらを必要とする対象に投与する直前に、注射用に適切な緩衝液および / または水で凍結乾燥タンパク質



を再構成することが必要であるのとは対照的である。

【0074】

フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤを含む溶液からプロテアーゼまたはそれらの酵素前駆体（プラスミンノーゲンなど）を除く利点は、残存するプロテアーゼおよび／または酵素前駆体（例えば、プラスミンまたはプラスミンノーゲン）を阻害するために抗線溶剤を添加する必要性を最小限に抑えられることである。このような薬剤の例には、プラスミンのウシタンパク質阻害剤であるアプロチニン；神経毒副作用も付随する合成プラスミン阻害剤であるトラネキサム酸が含まれる。

【0075】

他の有利な特性は、フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤを含む溶液からⅤⅤⅤⅤによって分離したプラスミンノーゲンは、さらに処理して、例えば、臨床使用するためにプラスミンノーゲン含有濃縮物を作製できることである。したがって、ⅤⅤⅤⅤを使用して単一の開始溶液からプラスミンノーゲンならびにフィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤを含む溶液の両方を調製することができる。

10

【0076】

他の有利な特性は、ⅤⅤⅤⅤ樹脂の生産費用がアフィニティークロマトグラフィー法で使用するリシン・セファロース（商標）または固定されたリシン樹脂の費用よりもはるかに経済的であることである。

【0077】

他の有利な特性は、プロテアーゼ（例えば、第ⅠⅠⅠⅠ因子）を除去するために、ⅤⅤⅤⅤを水酸化アルミニウム（例えば、アルハイドロゲル（商標））工程と置き換えて使用できることである。アルハイドロゲル（商標）は現在、第ⅤⅠⅠⅠ因子およびⅤⅤⅤⅤの商用生産において広く使用されている。しかし、この材料は、バッチ当たり通常使用される100kgではかなり費用が高い。さらに、アルハイドロゲル（商標）は、手動の取り扱いを必要とすることが多く、この材料は1回使用した後に廃棄する。対照的に、ⅤⅤⅤⅤ工程は完全に自動化することができ、樹脂は複数のバッチの製造において使用することができる。

20

【0078】

別の有利な特性は、カラムの洗浄および樹脂の浄化法の最中にウイルスおよびプリオンを含む病原体の不活性化および除去するために使用することができるNaOH 1MにⅤⅤⅤⅤ樹脂が適合することである。

30

【0079】

本発明の方法から得られた液体調製物はまた、費用のかかる貯蔵および輸送手段を必要とし、使用直前に解凍しなければならない凍結調製物を使用するよりも有利である。フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤを凍結乾燥または凍結した調製物として貯蔵する場合でも、再構成または解凍したタンパク質がより長期間安定であるため有利である。例えば、材料を医療処置のために万が一に備えて再構成したが、医学的考察に基づいて使用が必要とされなかった場合、このことは明らかである。こういった材料は、プロトロンビンおよび／またはt-PAおよび／またはその他のプロテアーゼが存在するためにフィブリノーゲンはわずかな短い期間しか安定ではないので、通常は廃棄される。

40

【0080】

特定の実施形態では、フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤを含有する本発明の液体調製物は、液体または凍結乾燥または凍結した調製物として貯蔵する。

【0081】

本発明の別の態様では、フィブリノーゲンを精製する方法であって：

(i) フィブリノーゲンモノマーがイオン交換クロマトグラフィー樹脂に結合するように選択された条件下で、フィブリノーゲンを含有溶液を該樹脂に通過させる工程；

50

( i i ) 該樹脂からフィブリノーゲンモノマーを溶出緩衝液で溶出させる工程 ; および  
 ( i i i ) 工程 ( i i ) からの溶出したフィブリノーゲンモノマーを、孔径が約 15 n m から約 35 n m の範囲のフィルターで濾過する工程  
 を含む、前記方法を提供する。

#### 【 0082 】

一実施形態では、フィブリノーゲンを含む溶液 ( 工程 ( i ) ) は、プラスミノーゲンおよび / または組織プラスミノーゲン活性化因子および / またはその他のプロテアーゼが疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂に結合し、フィブリノーゲンが該樹脂を通過するように選択された条件下で、フィブリノーゲンを含む原材料を該樹脂に通過させた後で回収する。

10

#### 【 0083 】

一実施形態では、イオン交換クロマトグラフィー樹脂は、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂または陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂から選択する。

#### 【 0084 】

一実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂は、強陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂または弱陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂である。一実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂には、第四級アミノ基が含まれる。例には、第四級アルキルアミンおよび第四級アルキルアルカノールアミン、またはアミン、ジエチルアミン、ジエチルアミノプロピル、アミノ、トリメチルアンモニウムエチル、トリメチルベンジルアンモニウム、ジメチルエタノールベンジルアンモニウムおよびポリアミンが含まれる。いくつかの実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂は第三級もしくは第四級アミンが接合したポリマー支持体であるか、または第三級もしくは第四級アミンが接合したヒドロキシル化ポリマー支持体である。いくつかの実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂には、メタクリル酸ポリマー支持体が含まれる。一実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂は Macro Prep ( 商標 ) HQ である。別の実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂は Giga Cap ( 商標 ) Q - 650 M である。その他の実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂はカラムに充填する。

20

#### 【 0085 】

所望に応じて、陰イオン交換クロマトグラフィー膜は、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂の代わりに使用することができる。市販の陰イオン交換クロマトグラフィー膜には、限定はしないが、Sartorius 社製の Sartobind ( 商標 ) Q、Pall Technologies 社製の Mustang ( 商標 ) Q および Millipore 社製の Intercept ( 商標 ) Q 膜が含まれる。

30

#### 【 0086 】

一実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂は、強陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂または弱陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂である。

#### 【 0087 】

市販の陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂には、限定はしないが、例えば、スルホン酸をベースにした基 ( 例えば、GE Healthcare 社製の Mono S、Mini S、Source ( 商標 ) 15 S および 30 S、SP Sepharose Fast Flow ( 商標 )、SP Sepharose High Performance ( 商標 )、Tosoh 社製の Toyopearl ( 商標 ) SP - 650 S および SP - 650 M、BioRad 社製の Macro - Prep High ( 商標 ) S、Pall Technologies 社製の Ceramic HyperD ( 商標 ) S、Trisacryl ( 商標 ) M および LS ( 商標 ) SP および Spherodex ( 商標 ) LS SP ) ; スルホエチルをベースにした基 ( 例えば、EMD 社製の Fractogel ( 商標 ) SE、Applied Biosystems 社製の Poros ( 商標 ) S - 10 および S - 20 ) ; スルホプロピルをベースにした基 ( 例えば、Tosoh 社製の TSK ( 商標 ) Gel SP 5PW および SP - 5PW - HR、Applied Biosystems

40

50

社製の Poros (商標) HS-20 および HS-50 ; スルホイソブチルをベースにした基 (例えば、EMD 社製の Fractogel (商標) EMD-SO3<sup>+</sup>) ; スルホキシエチルをベースにした基 (例えば、Whatman 社製の SE52、SE53 および Express-Ion S)、カルボキシメチルをベースにした基 (例えば、GE Healthcare 社製の CM-Sepharose Fast Flow (商標)、Biochrom Labs Inc. 社製の Hydrocell (商標) CM、BioRad 社製の Macro-Prep (商標) CM、Pall Technologies 社製の Ceramic HyperD (商標) CM、Trisacryl (商標) M-CM、Trisacryl (商標) LS-CM、Millipore 社製の Matrex Cellulfine (商標) C500 および C200、Whatman 社製の CM52 (商標)、CM32 (商標)、CM23 (商標) および Express (商標) Ion C、Tosoh 社製の Toyopearl (商標) CM-650S、CM-650M および CM-650C) ; スルホン酸およびカルボン酸をベースにした基 (例えば、J.T. Baker 社製の BAKERBOND (商標) Carboxy-Sulfon) ; カルボン酸をベースにした基 (例えば、J.T. Baker 社製の WP (商標) CBX、Dow Liquid Separations 社製の DOWEX MAC-3 (商標)、Sigma-Aldrich 社製の Amberlite (商標) 弱陽イオン交換体、DOWEX (商標) 弱陽イオン交換体 および Diaion (商標) 弱陽イオン交換体 ならびに EMD 社製の Fractogel (商標) EMD-COO<sup>-</sup>) ; スルホン酸をベースにした基 (例えば、Biochrom Labs Inc. 社製の Hydrocell (商標) SP、Dow Liquid Separations 社製の DOWEX (商標) Fine Mesh Strong Acid Cation Matrix、J.T. Baker 社製の UNOsphere (商標) S、WP Sulfonic、Sartorius 社製の Sartobind (商標) S 膜、Sigma-Aldrich 社製の Amberlite (商標) Strong Cation Exchanger、DOWEX (商標) Strong Cation および Diaion Strong Cation Exchanger) ; ならびにオルトリン酸をベースにした基 (例えば、Whatman 社製の PL1) を有するものが含まれる。所望に応じて、陽イオン交換クロマトグラフィー膜、例えば、Sartobind (商標) S (Sartorius ; Edgewood、NY) は、陽イオン交換マトリクスの代わりに使用することができる。

#### 【0088】

一実施形態では、フィブリノーゲンを含む溶液の pH は約 pH 7 から pH 10 の範囲である。一実施形態では、フィブリノーゲンを含む溶液の pH は約 pH 8 である。いくつかの実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂は、フィブリノーゲンを含む溶液と類似の pH を有する緩衝液で予め平衡化し、フィブリノーゲン添加後に洗浄する。

#### 【0089】

一実施形態では、溶出緩衝液の伝導率は、約 18 から約 30 mS/cm の範囲である。例えば、溶出緩衝液の伝導率は、約 18 から約 25 mS/cm ; または約 19 から約 24 mS/cm ; または約 20 から約 24 mS/cm ; または約 21 から約 23 mS/cm の範囲であってもよい。一実施形態では、溶出緩衝液の伝導率は約 22 mS/cm である。その他の実施形態では、溶出緩衝液は NaCl を含む。一実施形態では、溶出緩衝液は、NaCl を約 180 mM から約 230 mM、または約 190 mM から約 210 mM の範囲の濃度で含む。一実施形態では、溶出緩衝液の NaCl 濃度は約 200 mM である。

#### 【0090】

一実施形態では、フィブリノーゲンを含む溶出緩衝液は、約 0.5 から約 10 mg/mL のタンパク質濃度を含有する。いくつかの実施形態では、フィブリノーゲンを含む溶出緩衝液のタンパク質濃度は、約 4 から約 8 mg/mL の範囲である。特定の実施形態では、フィブリノーゲンを含む溶出緩衝液は、約 6 mg/mL である。

#### 【0091】

一実施形態では、濾過 (工程 (iii)) の前に、溶出したフィブリノーゲンモノマー

に、１種または複数のアミノ酸が配合される。一実施形態では、アミノ酸は、アルギニンまたはグリシンまたはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、フィブリノーゲンを含む溶出緩衝液におけるアミノ酸の濃度は、約０．５から約１０％（ｗ／ｗ）の範囲である。一実施形態では、フィブリノーゲンを含む溶出緩衝液におけるアミノ酸の濃度は、約１％から約６％（ｗ／ｗ）、または約２％から約６％（ｗ／ｗ）、または約２％から約５％（ｗ／ｗ）である。一実施形態では、フィブリノーゲンを含む溶出緩衝液は、約２％、または約３％、または約４％、または約５％（ｗ／ｗ）のアルギニンが配合される。

【００９２】

一実施形態では、溶出したフィブリノーゲンモノマーのｐＨは約ｐＨ７から約ｐＨ９である。

10

【００９３】

一実施形態では、工程（ｉｉ）のフィルターの孔径は、約１５ｎｍから約３５ｎｍ；または約１５ｎｍから約３０ｎｍ；または約１５ｎｍから約２５ｎｍ；または約１５ｎｍから約２０ｎｍの範囲である。

【００９４】

ウイルス濾過は、タンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）または「デッドエンド」濾過（通常フロー濾過としても知られている）のいずれかを使用して実施することができる。ウイルスフィルターは元々、ＴＦＦにおいて非対称膜の上部スキン層に隣接した供給流を用いて使用するために考案された。ＴＦＦは、濃度の偏りおよび付着を抑えるために、膜表面を掃引することによって高い流速を実現する。しかし、デッドエンド濾過は簡単で費用が低いので、デッドエンド濾過用に特に考案されたウイルスフィルターが普及することになった。ＴＦＦとは対照的に、これらのデッドエンドフィルターは通常、供給流に面した膜のより解放された側で操作されるので、タンパク質凝集物およびその他の付着物がマクロ多孔質な基礎部分内に捕捉され、それによってウイルスを保持するスキン層が保護される。使い捨てのデッドエンドフィルターを使用する利点には、系の設計および検証が簡単で、労力および費用が抑えられることが含まれる。

20

【００９５】

デッドエンド濾過には通常、表面から膜内へ流体を向かわせる単一のポンプを使用することが必要である。

30

【００９６】

タンジェンシャル濾過には一般的に、フィルター膜の表面で一定の流速を維持するための第１のポンプおよび膜の裏で陰圧を生じさせることによって膜内へタンパク質を引き込む第２のポンプが必要である。

【００９７】

一実施形態では、濾過はデッドエンド濾過によって実施する。

【００９８】

一実施形態では、デッドエンド濾過方法は、一定圧濾過または一定速度濾過のいずれかを使用して実施する。一実施形態では、デッドエンド濾過方法は、一定圧濾過を使用して実施する。

40

【００９９】

濾過は通常、本明細書で使用するウイルス除去膜の材料に応じて、膜が持ちこたえられるレベルと同じか、または下回る濾過圧、例えば、約０．２から約３．４ｂａｒの圧で実施する。一実施形態では、濾過圧は、約０．２ｂａｒから約３．４ｂａｒの間で維持する。別の実施形態では、濾過圧は、約１から約３ｂａｒ；または約１から約２ｂａｒ；または約１．２から約２ｂａｒで維持する。別の実施形態では、濾過圧は、約１．５ｂａｒから約１．９ｂａｒで維持する。

【０１００】

温度は、タンパク質溶液の粘度およびウイルス除去膜による濾過の流速に影響を及ぼすことがある。当業者には、濾過工程で使用する溶液は通常、約０ から関心のあるタンバ

50

ク質が変性する温度までの範囲内の温度であることは理解されよう。溶液の温度は、約 10 から約 50 までの範囲内であると適切である。一実施形態では、溶液の温度は、約 18 から約 35 までの範囲内である。別の実施形態では、溶液は、約 18 から約 26 の室温で濾過する。

【0101】

一実施形態では、ウイルスフィルターの能力は、フィルター表面積の  $1\text{ m}^2$  当たり少なくとも  $0.20\text{ kg}$  または少なくとも  $0.50\text{ kg}$  または少なくとも  $0.75\text{ kg}$  または少なくとも  $1.00\text{ kg}$  または少なくとも  $1.25\text{ kg}$  または少なくとも  $1.50\text{ kg}$  または少なくとも  $2\text{ kg}$  のフィブリノーゲンである。

【0102】

場合により、大きなサイズの粒子を除去するために、ウイルス濾過の前に前濾過または清澄濾過工程を使用することができる。一実施形態では、前濾過は、ウイルス除去膜よりも大きな孔径の膜を含むプレフィルターで実施する。一実施形態では、プレフィルターは、孔径約  $0.1\text{ }\mu\text{m}$  の膜フィルターである。別の実施形態では、プレフィルターは、Pall ナイロン膜フィルター (SKL 7002 NTP  $0.1\text{ }\mu\text{m}$  もしくは FTKN I) またはタンパク質凝集物および/または微粒子の除去のために類似の特性を有する市販のその他のプレフィルターから選択する。前濾過は、ウイルスフィルターと並べて、またはウイルスフィルターとは並べずに実施することができる。一実施形態では、前濾過は、ウイルスフィルターと並べて実施する。

【0103】

本発明のこの態様によるウイルス濾過法に適したフィルターは、当業者に公知であろう。一例には、特に Planova BioEx (商標) が含まれる。このようなフィルターは、時々「小型ウイルス」除去フィルターと呼ばれる。

【0104】

一実施形態では、フィルター膜は、平板シートまたは中空線維膜である。平板シート膜の例には、Pegasus (商標) SV4 等級小型ウイルス除去フィルター (Pall Corporation) などの親水化した PVDF フィルター膜が含まれる。一実施形態では、フィルターは、Pegasus (商標) SV4 等級である。

【0105】

その他の実施形態では、フィルター膜は、中空線維膜である。中空線維膜は、各中空線維の壁が、細かい毛細管と相互接続した空隙から構成された孔の 3 次元ウェブ構造を含有するストロー型の中空線維の束を含有していてもよい。中空線維フィルターの例には、中空線維膜形態に親水性に改変されたフッ化ポリビニリデン (PVDF) を組み込んだ Planova (商標) BioEX (商標) フィルター (Asahi Kasei Corporation) が含まれる。一実施形態では、フィルターは、Planova (商標) BioEX である。

【0106】

一実施形態では、2 種類以上の小型ウイルスフィルターを連続して使用する。一実施形態では、濾過は、約 15 から約 20 nm の範囲の孔径の連続した 2 種類のフィルターを使用して実施する。このような濾過工程によって、パルボウイルス様 MVM のために少なくとも LRV 6.9 log LRV でフィブリノーゲンを製造することが潜在的に可能である。

【0107】

本発明の別の態様では、溶液中に存在するフィブリノーゲンがイオン交換クロマトグラフィー樹脂を通過するように選択された条件下で、フィブリノーゲンを含む溶液を該樹脂に通過させる。すなわち、イオン交換クロマトグラフィーは、溶液が樹脂を通過したとき、溶液中に存在するフィブリノーゲン凝集体、プラスミノゲンおよびフィブロンectin などの不純物は、樹脂に連結した荷電を有する官能基に結合し、溶液中に存在するフィブリノーゲン、特にフィブリノーゲンモノマーは、樹脂からフロースルー (素通り) 画分に通過するような条件下で、フィブリノーゲンに関してネガティブモードで実施される。フ

10

20

30

40

50

ィブリノーゲンを含有するフロースルー画分が一旦樹脂を通過したら、イオン交換クロマトグラフィー樹脂を当業者公知の適切な洗浄緩衝液で洗浄することができる。洗浄緩衝液の構成物および洗浄工程の条件は通常、結合した不純物が洗浄工程中樹脂に保持されるように選択する。

【0108】

一実施形態では、イオン交換クロマトグラフィー樹脂は、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂または陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂から選択する。

【0109】

一実施形態では、フィブリノーゲンを含む溶液を、約150mMから約270mMのNaClの存在下で陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂に通過させる。これは、約18mS/cm(150mM NaCl)から約29mS/cm(270mM NaCl)の範囲の伝導率と同等である。これらの条件下で、特にモノマー形態のフィブリノーゲンは陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂を通過し、一方、凝集物ならびにプラスミノーゲンおよびフィブロネクチンなどのその他の不純物を含有するフィブリノーゲンは樹脂に結合する。他の実施形態では、フィブリノーゲンを含む溶液は、約170mMから約230mM(約19mS/cmから約25mS/cm)のNaClまたは約200mMから約220mM(約22mS/cmから約24mS/cm)のNaClの存在下で陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂を通過する。この種の条件下で、不純物は陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂に結合し、フィブリノーゲンは樹脂からフロースルー画分に通過すると予測される。

【0110】

本発明の方法によって回収されたフィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅠⅠⅠ因子および/またはVWFを含む溶液は、室温であっても、既存の凍結乾燥調製物よりも安定性が高いフィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅠⅠⅠ因子および/またはVWFの調製物を形成するので、有利である。必要に応じて、輸送および/または貯蔵中に低温を確保することができない長期輸送経路において、このことは特に有利であり得る。溶液中におけるフィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅠⅠⅠ因子および/またはVWFの安定な貯蔵はまた、多くの点で、製造、使用、輸送およびそれらを必要とする患者への投与を容易にする。本発明によって調製したフィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅠⅠⅠ因子および/またはVWFは安定性が高いので、多くの医薬品調製物において、状況によっては望ましくない副作用を導く可能性があるか、または潜在的危険性を低下させるために回避すべき繊維素溶解阻害剤またはフィブリノーゲン溶解阻害剤などの安定剤を添加しないで済ませることが可能である。

【0111】

本明細書で使用した「安定」という用語は、貯蔵前のフィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅠⅠⅠ因子および/またはVWFの活性レベルと比較して(例えば、本発明によるフィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅠⅠⅠ因子および/またはVWFを含む溶液の回収直後に測定された活性レベルと比較して)、貯蔵期間後のフィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅠⅠⅠ因子および/またはVWFの活性の損失がほとんどないか、または実質的にないことを意味する。本明細書で開示した一実施形態では、フィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅠⅠⅠ因子および/またはVWFを含む溶液は、約0 から約30 の温度で、貯蔵期間後に少なくとも70%の活性、好ましくは少なくとも80%の活性、より好ましくは少なくとも90%の活性、さらにより好ましくは少なくとも95%の活性、最も好ましくは100%の活性を保持している。当業者であれば、フィブリノーゲン活性は貯蔵期間開始直前のフィブリノーゲン調製物で測定することができ、この初期値を100%活性と指定して使用して、貯蔵期間中の様々な時点で測定したフィブリノーゲン活性をこれと比較したこの初期値に対する割合として表現できることが理解されよう。

【0112】

本明細書で開示した一実施形態では、本発明の方法によって回収したフィブリノーゲンは、約2 から約8 の温度で溶液を貯蔵して少なくとも4週間後に約90%から100

%の活性を保持しており、好ましくは約2 から約8 の温度で溶液を貯蔵して4週間後に約90%の活性を保持している。本明細書で開示した別の実施形態では、フィブリノーゲンは、約30 の温度で溶液を貯蔵して少なくとも4週間後に約60%から80%の活性を保持しており、好ましくは約30 の温度で溶液を貯蔵して5週間後に約60%から約70%の活性を保持している。フィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅢⅢⅢ因子および/またはⅤⅤⅤⅤの活性レベルは、当業者公知の任意の手段によって測定することができる。フィブリノーゲンの活性の適切な測定方法の例は、例えば、MacKie等(British J. Haematol. 121: 396~404, 2003)によってまとめて記載されている。特定の方法には、Clauss(Clauss, 1957, Acta-Haematol. 17, 237~246)および/または凝固タンパク質(Jacobsson K., Scand J Clin Lab Invest 1955; 7(補足14): 1~54またはFibrin sealant Ph. Eur. Monograph 903, 2012)が含まれる。結果は、凝固タンパク質の%; 初期凝固タンパク質の%および/またはClauss法または類似法を使用して測定した初期フィブリノーゲン活性の%として報告することができる。

10

#### 【0113】

当業者であれば、フィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅢⅢⅢ因子および/またはⅤⅤⅤⅤを含む回収溶液中におけるプラスミノーゲンおよび/または組織プラスミノーゲン活性化因子および/またはその他のプロテアーゼの濃度は、貯蔵の長さおよび/または貯蔵条件(例えば、温度)を決定づける可能性があることを理解しているものと予想される。例えば、回収溶液中のプラスミノーゲンおよび/または組織プラスミノーゲン活性化因子および/またはその他のプロテアーゼの濃度が原材料と比較して80%に低下している調製物は、フィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅢⅢⅢ因子および/またはⅤⅤⅤⅤを含む回収溶液中におけるプラスミノーゲンおよび/または組織プラスミノーゲン活性化因子および/またはその他のプロテアーゼの濃度が原材料と比較してわずか50%に低下している調製物と比較して、フィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅢⅢⅢ因子および/またはⅤⅤⅤⅤの活性をあまり不安定化することなく、長期間および/または高温で貯蔵できることが理解されよう。

20

#### 【0114】

本発明の方法は研究室規模で実施することができる一方、条件をあまり変化させることなく産業規模まで規模拡大することが可能である。したがって、本明細書で開示した一実施形態では、本発明の方法は、産業または商用規模で実施される。好ましくは、本発明の方法は、フィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅢⅢⅢ因子および/またはⅤⅤⅤⅤの商用規模の製造に適している。例えば、本発明の方法の開始材料として血漿画分を使用するとき、商用規模製造には、少なくとも約500kgの血漿から得られた血漿画分を使用することが必要であろう。より好ましくは、開始血漿画分は、バッチ当たり少なくとも約5,000kg、7,500kg、10,000kgおよび/または15,000kgの血漿から得られる。特定の実施形態では、本発明のフィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅢⅢⅢ因子および/またはⅤⅤⅤⅤを含む溶液および医薬製剤は、血漿画分または組換え原材料から商用規模で製造する。

30

40

#### 【0115】

フィブリノーゲンおよび/または第ⅢⅢⅢⅢ因子および/またはⅤⅤⅤⅤを含む溶液を、臨床適用または獣医学的適用のため(例えば、フィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅢⅢⅢ因子および/またはⅤⅤⅤⅤ不足の対象に投与するため、またはフィブリン糊として使用するため)に使用する場合、当業者であれば、溶液中の活性のあるウイルス含量(ウイルス力価)およびその他の感染の可能性がある因子(例えば、プリオン)のレベルを低下させることを所望されることがあることを理解しているものと予想される。フィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅢⅢⅢ因子および/またはⅤⅤⅤⅤを含む原材料(すなわち、開始材料)を血漿から得る場合、このことは特に所望されることがある。溶液中のウイルス力価を低下させる方法は当業者には公知である。例には、低温殺菌(例えば、グリシン(例えば

50

、2.75 M) およびスクロース(例えば、50%)などの高濃度の安定化剤および/またはその他の選択した賦形剤もしくは塩の存在下で、溶液を60 で10時間インキュベートすること)、乾熱処理、ウイルス濾過(溶液をナノフィルター;例えば、20 nmカットオフに通過させること)および/または溶液を適切な有機溶媒および界面活性剤で、溶液中のウイルスを不活性化する期間および条件下で処理することが含まれる。溶媒界面活性剤は、特にフィブリノーゲンおよび第V I I I 因子および/またはV W Fを含む血漿由来生成物において、エンベロープウイルスを不活性化するために20年にわたって使用されてきた。したがって、当業界で公知の様々な試薬および方法を使用して実施することができる(例えば、参照によって本明細書に組み入れる米国特許第4540573号および米国特許第4764369号を参照のこと)。適切な溶媒には、トリ-n-ブチルホスフェート(T n B P)およびエーテル、好ましくはT n B P(通常約0.3%)が含まれる。適切な界面活性剤には、ポリソルベート(T w e e n) 80、ポリソルベート(T w e e n) 20およびトリトンX-100(通常約0.3%)が含まれる。溶媒および界面活性剤濃度を含む処理条件の選択は、一部には原材料の特性に左右され、純度が低い原材料は一般的に高濃度の試薬およびより極端な反応条件を必要とする。好ましい界面活性剤は、ポリソルベート80で、特に好ましい組み合わせはポリソルベート80およびT n B Pである。原材料は、存在する可能性があるいかなるエンベロープウイルスも不活性化するのに十分な温度および時間で、溶媒および界面活性剤試薬と攪拌することができる。例えば、溶媒界面活性剤処理は、25 で約4時間実施することができる。溶媒界面活性剤化学物質はその後、例えば、C-18疎水性樹脂などのクロマトグラフィー媒体に吸着させるか、または関心のあるタンパク質を吸着する条件下でイオン交換樹脂の素通り画分へ溶出させることによって除去する。

#### 【0116】

ウイルス不活性工程は、本明細書で開示した方法の任意の適切な段階で実施することができる。一実施形態では、工程(i)の前に、フィブリノーゲンおよび/または第V I I I 因子および/またはV W Fを含む原材料にウイルス不活性化工程を行う。別の実施形態では、疎水性電荷誘導クロマトグラフィー樹脂(すなわち、工程(i i)および/または(i v))から回収したフィブリノーゲンおよび/または第V I I I 因子および/またはV W Fを含む溶液に、ウイルス不活性化工程を行う。本明細書で開示した一実施形態では、ウイルス不活性化工程は、低温殺菌または有機溶媒および界面活性剤による処理を含む。本明細書で開示した別の実施形態では、ウイルス不活性化工程は、ウイルス濾過を含む。ウイルス濾過を使用する場合、本発明者らは、濾過工程前に遊離アミノ酸(例えば、アルギニン)を添加すると、フィルターからのフィブリノーゲンおよび/または第V I I I 因子および/またはV W Fの流動速度および回収を顕著に改善できることを見いだした。このような方法の一例は、米国特許第7919592号に記載されている。

#### 【0117】

本明細書で開示した一実施形態では、フィブリノーゲンおよび/または第V I I I 因子および/またはV W Fを含む原材料または溶液を陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂に通過させる前に、該溶液にウイルス不活性化工程を行う。処理した溶液または原材料を陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂に通過させる前に溶媒界面活性剤処理などのウイルス不活性化工程を使用する利点は、陰イオン交換樹脂では、フィブリノーゲンおよび/または第V I I I 因子および/またはV W Fの樹脂への結合ならびにフロースルー(素通り)画分による有機溶媒および界面活性剤の除去を促進する条件を利用することによって、有機溶媒および界面活性剤を処理溶液から除去できることである。

#### 【0118】

低温殺菌は、フィブリノーゲンを含む溶液(本明細書ではまた、「フィブリノーゲン溶液」と称する)中では特に、タンパク質凝集物およびポリマーを生じ得る。したがって、場合によっては、低温殺菌した溶液中における凝集物/ポリマーのレベルを低下させることが所望されることがある。これは、当業者公知の任意の手段によって実施することができるが、さらなるクロマトグラフィー精製によって便利に実現することができる。本明細

10

20

30

40

50



書で開示した一実施形態では、低温殺菌した溶液または原材料は、いかなる凝集物またはポリマーもフロースルー（素通り）画分に除去されるように、フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤに関してポジティブモードで陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂に通過させる。

#### 【0119】

「原材料」という用語は、本明細書ではフィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤを含む任意の溶液を示すために使用する。原材料はまた、当業者公知のその他のタンパク質（例えば、治療タンパク質）を含むことがある。例には、血液凝固カスケードに関与するタンパク質が含まれる。本明細書で開示した一実施形態では、原材料はフィブリノーゲンを含む。

10

#### 【0120】

フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤを含む適切な原材料は当業者に公知である。例には、血漿または可溶化した血漿寒冷沈降物などの血漿画分またはヒトもしくは動物血漿もしくは血漿画分から得られた可溶化した第Ⅰ画分ペースト、組換え技術による細胞培養画分、トランスジェニック動物のミルクから得られた画分などが含まれる。組換えフィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤタンパク質の原料も本発明による原材料として使用するために適している。原材料が血漿または血漿画分の場合、プールされた輸血血漿であってもよく、または個々のドナーから入手してもよい。本明細書で開示した一実施形態では、フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤを含む原材料は、可溶化した血漿寒冷沈降物である。全血から得られるか、またはアフエーシスによって収集したこの成分は、凍結した新鮮な血漿を1～6の間で制御解凍し、沈殿物を回収することによって調製する。寒冷不溶性沈殿物は、再凍結する。寒冷沈降物アフエーシス1単位は、全血から得られた寒冷沈降物2単位とほぼ同等である。これは、凍結した新鮮な血漿由来の第ⅩⅠⅠⅠ因子およびフィブロネクチンなどのその他のタンパク質と共にフィブリノーゲン、第ⅤⅠⅠⅠ因子およびⅤⅤⅤⅤのほとんどを含有する。フィブリノーゲンのその他の原料は、解凍し、遠心もしくは濾過によって寒冷沈降物を除去することによって凍結血漿から調製することができる第Ⅰ画分沈殿物である。得られた寒冷上清物を次にエタノールと混合して、第Ⅰ画分を沈殿させる。例えば、第Ⅰ画分沈殿物は、約8%（v/v）エタノールをpH7.2で添加し、温度を約-3に制御することによって得ることができる（Cohn等、1946、J. Am. Chem. Soc. 62: 459～475）。一実施形態では、フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤを含む原材料は、寒冷沈降物である。

20

30

#### 【0121】

明細書において「プロテアーゼ」とは、HCC樹脂に曝露したとき、フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤが樹脂を通過する条件下でHCC樹脂に結合することができる、フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤを含む原材料または溶液中に存在する任意のプロテアーゼおよび／またはその酵素前駆体であってもよい。プロテアーゼは、セリンプロテアーゼ（例えば、プラスミン、トリプシン、トリプシン）、トレオニンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ（例えば、カテプシンBおよびカテプシンH）、アスパラギン酸プロテアーゼ（例えば、ペプシン）、メタロプロテアーゼ（例えば、コラゲナーゼおよびゼラチナーゼ）およびグルタミン酸プロテアーゼを含むいかなる種類であってもよい。フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤを含む原材料をヒトまたは動物の血漿から得る場合、プロテアーゼ/酵素前駆体には、プラスミノゲン、組織プラスミノゲン活性化因子（tPA）、トリプシン、エラスターゼ、第ⅤⅠⅠⅠa因子、第ⅠⅩa因子、第Ⅹa因子、第ⅩⅠa因子、第ⅩⅠⅠa因子、第ⅩⅠⅠⅠa因子、血漿カリクレインなどが含まれることがある。フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤを含む溶液に関して、除去することが特に好ましいプロテアーゼ/酵素前駆体は、プラスミノゲンである。フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅠⅠⅠ因子および／またはⅤⅤⅤⅤ

40

50

を含む溶液から除去することが好ましいその他のプロテアーゼ/酵素前駆体は、t - P A、プロおよび/または活性トロンピン(第I I / I I a 因子)である。フィブリノーゲンおよび/または第V I I I 因子および/またはV W F を含む原材料を細胞培養上清から得るとき、プロテアーゼ/酵素前駆体には、セリンプロテアーゼ(例えば、カゼイナーゼ)、メタロプロテアーゼ(例えば、ゼラチナーゼ、M M P 3、M M P 1 0 もしくはM M P 1 2 を含むマトリクスメタロプロテアーゼ(M M P))、アスパラギン酸プロテアーゼ(カテプシンD)などの任意の宿主細胞プロテアーゼ、中でも酸プロテアーゼが含まれることがある。

#### 【0122】

場合によって、原材料を工程(i)においてH C I C 樹脂に通過させる前に、原材料の不純物を除去するか、または不純物のレベルを低下させることが所望されることがある。原材料から不純物を除去するか、または不純物のレベルを低下させると、クロマトグラフィー精製中のH C I C 樹脂への負荷を低下させ、したがって、原材料からのプラスミノーゲンおよび/または組織プラスミノーゲン活性化因子および/またはその他のプロテアーゼの分離効率を改善することができる。不純物は、例えば、原材料からフィブリノーゲンおよび/または第V I I I 因子および/またはV W F を沈殿させ、沈殿したタンパク質を回収することによって除去するか、または低下させてもよい。フィブリノーゲンおよび/または第V I I I 因子および/またはV W F を含む原材料からフィブリノーゲンおよび/または第V I I I 因子および/またはV W F を沈殿させる適切な方法は当業者に公知である。一例には、水酸化アルミニウム懸濁液を原材料に添加することが含まれ、これは、ビタミンK依存性タンパク質(例えば、凝固因子I I、V I I、I X およびX)ならびにプロトロンピン(第I I 因子)およびt - P A などの水酸化アルミニウムに結合親和性を有するその他のタンパク質を血漿または血漿寒冷沈降物から除去するために特に有用である。

#### 【0123】

したがって、本明細書で開示した一実施形態では、工程(i)の前に、原材料からビタミンK依存性タンパク質を除去するか、または低減させる。他の実施形態では、ビタミンK依存性タンパク質を、原材料に水酸化アルミニウムを添加することによって除去するか、または低減させる。水酸化アルミニウムは、アルハイドロゲル(登録商標)の形態で、最終濃度が約10%から約80% w/wになるまで原材料に添加してもよい。いくつかの実施形態では、水酸化アルミニウムは、最終濃度約10%から約50%(w/w)の範囲で原材料に添加する。その他の実施形態では、水酸化アルミニウムは、最終濃度約10%から約30%(w/w)の範囲で原材料に添加する。好ましい実施形態では、濃度は、約15%から約30%(w/w)である。最も好ましくは、最適なフィブリノーゲン回収およびプロトロンピンなどの不純物の除去のために、水酸化アルミニウムは約15%から約25%(w/w)で原材料に添加する。別の実施形態では、ビタミンK依存性タンパク質を、水酸化アルミニウムを使用したバッチ吸着によって原材料から除去する。

#### 【0124】

本発明の別の態様では、本明細書で記載したように、本発明の方法によって回収したフィブリノーゲンおよび/または第V I I I 因子および/またはV W F を含む溶液を提供する。一実施形態では、溶液中におけるプラスミノーゲンおよび/または組織プラスミノーゲン活性化因子および/またはその他のプロテアーゼのレベルは、全タンパク質の20%未満、好ましくは全タンパク質の10%未満、より好ましくは全タンパク質の5%未満、または全タンパク質の1%未満、または全タンパク質の0.1%未満、または全タンパク質の0.01%未満、または全タンパク質の0.001%未満である。当業者であれば、フィブリノーゲンおよび/または第V I I I 因子および/またはV W F を含む溶液中に存在するプラスミノーゲンおよび/または組織プラスミノーゲン活性化因子および/またはその他のプロテアーゼのレベルは、溶液の企図する使用または貯蔵の長さに左右され得ることを理解しているものと予想される。例えば、溶液を約0 から約8 の室温で少なくとも4週間貯蔵する場合、その溶液が含むプ

ラスミノーゲンおよび/または組織プラスミノーゲン活性化因子および/またはその他のプロテアーゼが(全タンパク質の)約10%より多いことは許容され得る。溶液を約30の温度で少なくとも4週間貯蔵する場合、その溶液が含むプラスミノーゲンおよび/または組織プラスミノーゲン活性化因子および/またはその他のプロテアーゼが(全タンパク質の)約10%未満であることが所望され得る。

【0125】

本明細書で開示した一実施形態では、本発明の方法によって回収したフィブリノーゲンを含む溶液を提供する。別の実施形態では、溶液は、全タンパク質の少なくとも80%のフィブリノーゲンを含む。

【0126】

本発明の別の態様では：

- (a) 全タンパク質の少なくとも75%のフィブリノーゲン；
- (b) 全タンパク質1mg当たり50pg未満の組織プラスミノーゲン活性化因子；および/または
- (c) 全タンパク質1mg当たり1μg未満のプラスミノーゲンを含む溶液を提供する。

【0127】

一実施形態では、溶液は、全タンパク質1mg当たり $1.5 \times 10^{-5}$  U未満の第II因子をさらに含む。

【0128】

本発明の別の態様では：

- (a) 全タンパク質の少なくとも90%のフィブリノーゲン；
- (b) 全タンパク質1mg当たり50pg未満の組織プラスミノーゲン活性化因子；および/または
- (c) 全タンパク質1mg当たり150ng未満のプラスミノーゲンを含む溶液を提供する。

【0129】

一実施形態では、溶液はさらに：

- (a) 全タンパク質1mg当たり $3.5 \times 10^{-6}$  U未満の第II因子；および/または
- (b) 全タンパク質1mg当たり150μg未満のフィブロネクチンを含む。

【0130】

本発明の別の態様では：

- (a) 全タンパク質の少なくとも90%のフィブリノーゲン；
- (b) 全タンパク質1mg当たり50pg未満の組織プラスミノーゲン活性化因子；および/または
- (c) 全タンパク質1mg当たり10ng未満のプラスミノーゲンを含む溶液を提供する。

【0131】

本発明の別の態様では：

- (a) 全タンパク質の少なくとも90%のフィブリノーゲン；
- (b) 全タンパク質1mg当たり20pg未満の組織プラスミノーゲン活性化因子；および/または
- (c) 全タンパク質1mg当たり10ng未満のプラスミノーゲンを含む溶液を提供する。

【0132】

一実施形態では、溶液はさらに：

- (a) 全タンパク質1mg当たり $2.7 \times 10^{-6}$  U未満の第II因子；および/また

は

(b) 全タンパク質 1 mg 当たり 15  $\mu$ g 未満のフィブリンゲンを含む。

【0133】

本明細書で開示した方法によって回収した溶液中におけるフィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅢⅢ因子および/またはVWFの濃度および不純物(例えば、プラスミノーゲンおよび/または組織プラスミノーゲン活性化因子および/またはその他のプロテアーゼ)の濃度は、当業者公知の任意の手段によって測定することができる。フィブリノーゲンを測定するための適切アッセイ法の例は、Mac k i e 等(B r J . H a e m a t o l . 2 0 0 3 M a y ; 1 2 1 ( 3 ) : 3 9 6 ~ 4 0 4 ) に記載されている。サイズ排除H P L C はまた、フィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅢⅢ因子を含む溶液中におけるフィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅢⅢ因子または不純物の濃度を測定するために使用することができる(例えば、C a r d i n a l i 等、2 0 1 0、A r c h . B i o c h e m . B i p h y s . 4 9 3 ( 2 ) : 1 5 7 ~ 1 6 8 ; およびK o s l o s k i 等、2 0 0 9、A A P S J . 1 1 ( 3 ) ; 4 2 4 ~ 4 3 1 )。H P L C はまた、当業者によるフィブリノーゲンのモノマーと凝集物の間の区別を可能にする。さらに、フィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅢⅢ因子および/またはVWFの濃度は、使用するアッセイの感度によって異なることがある。例えば、C l a u s s アッセイを使用して測定した溶液中のフィブリノーゲンの濃度は、H P L C によって同じ溶液で測定した濃度よりもわずかに低いことがある。

【0134】

本明細書で開示した一実施形態では、溶液中におけるモノマーフィブリノーゲンの濃度は、サイズ排除H P L C によって測定すると全タンパク質の少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%である。

【0135】

本発明の別の態様では、本明細書で開示した方法によって回収したフィブリノーゲンおよび/または第ⅤⅢⅢ因子および/またはVWFを含む溶液および薬学的に許容される担体を含む医薬製剤を提供する。薬学的に許容される希釈剤および/または賦形剤を含む適切な薬学的に許容される担体は、当業者には公知である。例には、溶媒、分散媒、抗真菌剤および抗菌剤、表面活性剤、等張剤および吸収剤などが含まれる。

【0136】

医薬製剤はまた、適切な安定化剤、例えば、アミノ酸、炭水化物、塩および界面活性剤の組み合わせを添加することによって製剤化することができる。特定の実施形態では、安定化剤には、糖アルコールおよびアミノ酸の混合物が含まれる。安定化剤は、糖(例えば、スクロースまたはトレハロース)、糖アルコール(例えば、マンニトールまたはソルビトール)およびアミノ酸(例えば、プロリン、グリシンおよびアルギニン)の混合物を含むことができる。好ましい実施形態では、製剤は、アルギニンなどのアミノ酸を含む。その他の実施形態では、製剤は、最高100 mMの濃度の二価金属イオンおよび米国特許第7045601号に記載されたような複合体形成剤を含む。特定の実施形態には、米国特許第7045601号の実施例1に記載されたような製剤1から7が含まれる。特定の実施形態では、製剤は、いかなる抗線溶剤またはアルブミンなどの安定化タンパク質も添加することなく製剤化する。実施形態では、製剤がフィブリノーゲンを含む場合、pHは、好ましくは約6.5から7.5であり、浸透圧は少なくとも240 m o s m o l / k g である。

【0137】

医薬製剤はまた、分注および長期貯蔵の前に濾過によって滅菌してもよい。好ましくは、製剤は、少なくとも2、4、6、8、10、12、18、24、36カ月またはそれ以上の月数間、元の安定特性を実質的に保持する。例えば、2~8 または25 で貯蔵した製剤は通常、6カ月以上貯蔵しても、H P L C - S E C によって測定すると、実質的に同じ分子サイズ分布を保持することができる。医薬製剤の特定の実施形態は、2~8 お

10

20

30

40

50

よび／または室温で貯蔵したとき、少なくとも6カ月、12カ月、18カ月、24カ月、36カ月またはそれ以上であっても、商用の薬学的使用のために安定であり、適切であり得る。

【0138】

本明細書で記載したような本発明の溶液および医薬製剤は、注射製剤などの多くの可能な剤形のいずれかに製剤化することができる。製剤およびその後の投与（投薬）は、当業者の範囲内である。投薬は、治療する対象の応答性に左右されるが、所望する効果（例えば、フィブリノーゲンの正常な血漿レベルへの回復）が必要な限りずっと継続する。当業者は、最適な投薬量、投与方法および反復数を容易に決定することができる。

【0139】

本明細書で開示した一実施形態では、本発明の医薬製剤は、少なくとも5 mLの容量を有し、フィブリノーゲンを少なくとも5 mg/mL含む。別の実施形態では、医薬製剤の容量は少なくとも5 mLで、フィブリノーゲンを少なくとも20 mg/mL含む。特定の実施形態では、医薬製剤の容量は少なくとも5 mLで、フィブリノーゲンを約20 mg/mL、25 mg/mL、30 mg/mL、35 mg/mL、40 mg/mL、45 mg/mL、50 mg/mL、55 mg/mL、60 mg/mL、65 mg/mL、70 mg/mL、75 mg/mL、80 mg/mL、90 mg/mLまたは100 mg/mLの濃度で含む。別の態様では、少なくとも5 mLの安定した薬学的に許容されるフィブリノーゲン溶液を含有する容器であって、フィブリノーゲンの濃度は少なくとも20 mg/mLである、前記容器を提供する。

【0140】

本発明の別の態様では、フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅢⅢⅢ因子および／またはⅤⅤⅤⅤ不足に関連した症状を治療または予防する方法であって、本明細書で開示したように本発明の方法によって回収したフィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅢⅢⅢ因子および／またはⅤⅤⅤⅤを含む溶液または本明細書で開示したような本発明の医薬製剤を、それらを必要とする対象に投与することを含む、前記方法を提供する。

【0141】

本発明の別の態様では、フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅢⅢⅢ因子および／またはⅤⅤⅤⅤ不足に関連した症状を治療または予防するための医薬品の製造における、本明細書で開示したような本発明の方法によって回収したフィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅢⅢⅢ因子および／またはⅤⅤⅤⅤを含む溶液の使用を提供する。当業者であれば、フィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅢⅢⅢ因子および／またはⅤⅤⅤⅤ不足に関連した症状の種類はよくわかるであろう。一実施形態では、このフィブリノーゲン症状は、無フィブリノーゲン血症、低フィブリノーゲン血症および異常フィブリノーゲン血症からなる群から選択される。一実施形態では、第ⅤⅢⅢⅢ因子および／またはⅤⅤⅤⅤ症状は、出血障害である血友病A（例えば、血小板機能欠陥、血小板減少症またはフォンビルブランド病）、血管損傷、外傷もしくは手術による出血、抗凝固療法による出血、肝臓疾患による出血からなる群から選択される。

【0142】

本明細書で開示したように、本発明の方法によって回収したフィブリノーゲンおよび／または第ⅤⅢⅢⅢ因子および／またはⅤⅤⅤⅤを含む溶液で治療することができるその他の症状には、大怪我および重篤な出血および熱傷が含まれる。低フィブリノーゲン血症および無フィブリノーゲン血症の場合、本発明によって調製したフィブリノーゲンを含む溶液は、フィブリノーゲン不足の状態を補うためにそれらを必要とする患者に静脈注射することができ、投薬量は不足の程度に基づいて当業者が決定することができる。

【0143】

本発明の方法によって回収したフィブリノーゲンを含む溶液はまた、プラスミノーゲンおよび／または組織プラスミノーゲン活性化因子および／またはその他のプロテアーゼが不安定レベルではないため、フィブリン糊（フィブリンシーラント（fibrin sealant）としても知られている）の使用において有利である。tPAは、プラスミノー

10

20

30

40

50

ーゲンを活性型プラスミンに変換し、これは次にフィブリン血餅を消化することから、局所適用（例えば、止血）において血餅形成を低下させる。

【0144】

フィブリン糊は通常、2種類の成分：(i)フィブリノーゲン（第XIII因子およびアプロチニンなどの線溶阻害剤と一緒にであることが多い）および(ii)トロンビン（カルシウムイオンと一緒にであることが多い）を含む。2種類の成分は、すぐに使える接着剤を調製するために再構成される。フィブリン糊は、カルシウムおよび第XIII因子の存在下でフィブリノーゲンとトロンビンの組み合わせを使用して架橋したフィブリン繊維を形成することによって、血液凝固の最終工程を刺激するために、臨床適用および獣医学的適用に使用する。フィブリン糊は、臨床薬および獣医薬において、止血、創傷閉鎖、癒着予防および創傷治療を含めて様々な応用される。フィブリン糊はまた、密封縫合ならびに骨、軟骨および腱などの結合組織を結合するために、皮膚の創傷（皮膚移植を含む）を閉じるために使用することができる。したがって、本明細書で開示した別の態様では、本明細書で開示したように、本発明の方法によって回収したフィブリノーゲンを含む溶液を含むフィブリン糊を提供する。

10

【0145】

当業者であれば、本明細書で記載した本発明では、特に記載したもの以外の変更および改変も許容されることがわかるであろう。本発明には、精神および範囲内に入るこのような変更および改変が全て含まれることを理解されたい。本発明はまた、本明細書で述べるか、または示した工程、特徴、組成物および化合物全てを、個別に、または集合的に含み、前記工程または特徴の任意の2種以上のありとあらゆる組み合わせも含む。

20

【0146】

ここで本発明の所定の実施形態を以下の実施例を参照にして記載するが、これらは単に例示することを目的とするものであって、前述した一般原則の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0147】

〔実施例1〕

HEA、PPAおよびMEP疎水性電荷誘導クロマトグラフィー（HCIC）樹脂によるフィブリノーゲンの精製

30

プールしたヒト血漿寒冷沈降物を開始材料（すなわち、フィブリノーゲン含有原材料）として使用した。簡単に説明すると、プールした血漿寒冷沈降物は、20 mMクエン酸3ナトリウム、200 mMイブシロン-アミノカプロン酸（-ACA）、60 IU/mLヘパリンおよび500 mM NaCl（pH 7.2 ± 2）を含有する抽出緩衝液中において31 ± 2 で30分間可溶化した（緩衝液4 g当たり寒冷沈降物1 g）。次に、水酸化アルミニウム2%（w/w）を可溶化した寒冷沈降物に25%（w/w）の濃度で添加した。その後、水酸化アルミニウムゲルを遠心または深層濾過のいずれかによって除去し、フィブリノーゲン含有上清をHCICクロマトグラフィー樹脂によるクロマトグラフィーでさらに精製するために回収した。

【0148】

40

フィブリノーゲン含有上清を、HEA、PPAまたはMEP Hypercel（商標）樹脂のいずれか1.8 mLを充填したクロマトグラフィーカラムに添加した。クロマトグラフィーカラムを、6.5から8.5の範囲の様々なpHの25 mMトリスで予め平衡化した。フィブリノーゲン含有上清を、クロマトグラフィーカラムに約11 mL/mL樹脂の比で添加した。HCIC精製は、フィブリノーゲンに関してネガティブモードで実施され、フィブリノーゲンを未結合フロースルー画分に素通りさせ、一方、t-PA、プラスミノーゲンおよび第II因子のほとんどは樹脂に結合して維持した。

【0149】

図1から3は、HEA Hypercel（商標）、PPA Hypercel（商標）およびMEP Hypercel（商標）を使用したフィブリノーゲン、プラスミノー

50

ゲン、t-P Aおよび第I I因子のポストクロマトグラフィー精製後の工程回収率を示す。結果は、p Hはこれらの樹脂へのプラスミノーゲン結合にはほとんどまたは全く影響を及ぼさず、一方、樹脂へのt-P Aの結合は、低いp H範囲で最も効果的に見えることを示す。H E A H y p e r c e l (商標)カラムは、素通り画分において最も高いフィブリノーゲン回収率を示し、試験した操作p H範囲では、P P AおよびM E P H y p e r c e l (商標)カラムの両方で認められた回収率と比較して、フィブリノーゲン回収率にほとんど影響を及ぼさないようであった。P P AおよびM E P 両カラムは、p H 8 . 5 で素通り画分において最高のフィブリノーゲン回収率を示した。

【0150】

〔実施例2〕

H E A H y p e r c e l によって低下したフィブリノーゲン溶液における不純物レベル  
実施例1によって調製したフィブリノーゲンを含有する可溶化寒冷沈降物約48.5 mLを、p H 6 . 5、7 . 0、7 . 5、8 . 0または8 . 5のいずれかの25 mMトリスで予め平衡化した5 mL H E A H y p e r c e l (商標)カラムに添加した。H C I C 精製は、フィブリノーゲンに関してネガティブモードで実施され、フィブリノーゲンを未結合フロースルー画分に素通りさせ、一方、t-P A、プラスミノーゲンおよび第I I因子は樹脂に結合して維持した。図4 aは、H E A H y p e r c e l (商標)を使用したポストクロマトグラフィー精製後のフィブリノーゲン、プラスミノーゲン、t-P Aおよび第I I因子の工程回収率を示す。結果は、p HはH C I C 樹脂へのプラスミノーゲンおよび第I I因子の結合にはほとんどまたは全く影響を及ぼさず、一方、樹脂へのt-P Aの結合は、6 . 5 ~ 7 . 0の低いp H範囲で最も効果的に見えることを示す。フィブリノーゲンの回収率は、カラム洗浄を実施しなかったにもかかわらず、様々なp H条件下で、素通り画分において90%を上回った。図4 aに示したように、これらの結果は、H C I C 樹脂によって可溶化寒冷沈降物などの粗フィブリノーゲン含有原材料中におけるプロテアーゼが効果的に除去されることを示している。例えば、p H 7 . 0 で実施した実験条件は、可溶化寒冷沈降物溶液からの第I I因子は99.9%、t-P Aは88.3%およびプラスミノーゲンは98.2%低下することを示した。

【0151】

フィブリノーゲンは、室温(約20 )で少なくとも6日間溶液中で安定に維持された。結果は図4 bおよび図4 cに示す。

【0152】

〔実施例3〕

H E A H y p e r c e l によって精製されたフィブリノーゲン溶液中における不純物のレベル

実施例1によって生成したアルハイドロゲル(商標)吸着工程後に得られたフィブリノーゲン含有上清約500 mLを、25 mMトリスp H 7 . 0 で予め平衡化したH E A H y p e r c e l (商標)の樹脂36 mLを充填したX K 1 6 / 3 0カラムに添加した。素通り画分は、フィブリノーゲン、プラスミノーゲン、t-P Aおよび第I I因子を試験するために収集した。結果の概要を以下の表1に示す。

【0153】

【表 1】

表 1

	容量 (mL)	タンパク質 (mg/mL)	Clauss による フィブリノー ゲン (mg/mL)	プラスミ ノーゲン (ng/mL)	t-PA (pg/mL)	第 II 因子 (U/mL)
フィブリノー ゲン上清	500	21.8	16.0	53172.0	1716.5	0.00097
素通り画分	540	17.6	13.2	15655.5	706.7	0.00025
素通り画分 における回収 率%		87.2 %	89.1%	31.8 %	44.5 %	27.8 %

10

## 【 0 1 5 4 】

## 〔 実施例 4 〕

HEA Hypercel によって精製したフィブリノーゲン溶液中における不純物のレベルに対するグリシン沈殿の効果

20

実施例 1 によって生成したアルハイドロゲル吸着工程後のフィブリノーゲン含有上清に、グリシン 2.4 M、2.7 M NaCl、2.1 mM CaCl<sub>2</sub> および 23 mM クエン酸 3 ナトリウムを含む生理食塩水 (pH 6.6 ~ 7.3) を添加することによって、さらに沈殿工程を行った。可溶化した沈殿物を 30℃ まで温めてから、同様に 30℃ でインキュベートしたグリシン緩衝液を、生成物の緩衝液に対する比 1 : 2 で添加した。混合物を 10 分間攪拌し、得られた沈殿物を遠心によって液相から回収した。主にフィブロネクチンおよび IgG を含有する液相を廃棄して、フィブリノーゲン含有沈殿物を収集し、100 mM NaCl、1.1 mM CaCl<sub>2</sub>、10 mM クエン酸 3 ナトリウム、10 mM トリス - (ヒドロキシメチルメチルアミン) および 4.5 mM スクロースを含有する可溶化緩衝液 (pH 7.0) に再懸濁した。可溶化したフィブリノーゲン中間体 (250 mL) は、1 μm フィルターを使用して清澄にしてから、HEA Hypercel (商標) 樹脂 36 mL を充填し、25 mM トリス pH 7.0 で予め平衡化した XK16/30 カラムに通過させた。素通り画分は、フィブリノーゲン、プラスミノゲン、t-PA および第 II 因子を試験するために収集し、結果の概要を以下の表 2 に示した。

30

## 【 0 1 5 5 】

結果は、プラスミノゲン、t-PA および第 II 因子の HEA Hypercel (商標) 樹脂への結合は、実施例 2 で記載した条件下で観察されたものと比較して、これらの処理条件下でより効果的であることを示している。解析結果は、工程の回収率がフィブリノーゲン約 93%、プラスミノゲン 6%、t-PA 12% および第 II 因子 5% であることを示した。

40

## 【 0 1 5 6 】



【表 2】

表 2

	容量 (mL)	タンパク質 (mg/mL)	Clauss による フィブリノー ゲン (mg/mL)	プラスミ ノーゲン (ng/mL)	t-PA (pg/mL)	第 II 因子 (U/mL)
可溶化フィブ リノーゲン 中間体	250.0	29.7	30.3	48457.0	3408.4	0.002
素通り画分	285.2	26.4	24.6	2646.8	984.2	0.00008
素通り画分に おける回収 率%		101 %	92.6	6.2 %	12.3 %	4.6 %

10

## 【 0 1 5 7 】

## 〔 実施例 5 〕

血漿寒冷沈降物から精製したフィブリノーゲンの調製

処理工程 1 - 血漿寒冷沈降物の可溶化；

20

処理工程 2 - 可溶化した血漿寒冷沈降物のアルハイドロゲル（商標）（水酸化アルミニウム）吸着（アルハイドロゲル（商標）濃縮物：標的 15 から 20 % w / w、10 から 50 % w / w の範囲）および遠心または濾過助剤の存在下での深層濾過などの方法を使用したフィブリノーゲン含有上清の回収。あるいは、この工程は、フィブリノーゲンに関してネガティブモード（素通り）の H C I C クロマトグラフィー工程またはフィブリノーゲンに関していずれもネガティブモードの H C I C および陰イオン交換クロマトグラフィーの組み合わせによって置き換えることができる。H C I C および陰イオン交換クロマトグラフィーの両方を組み合わせて使用する場合、処理工程 3 を選択する；

処理工程 3 - 工程 2 のフィブリノーゲン含有上清からのフィブリノーゲンのグリシン沈殿。あるいは、この工程は、フィブリノーゲンに関してネガティブモードの陰イオン交換クロマトグラフィーによって置き換えることができる；

30

処理工程 4 - 可溶化した工程 3 のグリシン沈殿物をフィブリノーゲンに関してネガティブモードの H C I C クロマトグラフィー樹脂に通過させる；

処理工程 5 - 病原体を不活性化するために、工程 4 で回収した精製フィブリノーゲン溶液を溶媒もしくは界面活性剤で処理するか、または低温殺菌する；

処理工程 6 - 工程 5 の処理溶液をフィブリノーゲンに関してポジティブモードの陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂に通過させ、弱く結合したタンパク質を樹脂から洗浄し、フィブリノーゲンを樹脂から溶出させる；

処理工程 7 - 工程 6 の陰イオン交換樹脂から溶出したフィブリノーゲンにナノ濾過（35 nm または 20 nm または 35 / 20 nm の組み合わせ）を行い；

40

処理工程 8 - 工程 7 で濾過したフィブリノーゲンを限外濾過（50、100、200 および 300 k D a 膜フィルター）する。

## 【 0 1 5 8 】

## 〔 実施例 6 〕

H C I C および陰イオン交換クロマトグラフィーの組み合わせによる精製フィブリノーゲンの調製

H E A H y p e r c e l（商標）カラムを使用した混合型クロマトグラフィー工程で、実施例 1 から 3 で記載した工程によって、寒冷沈降物約 100 g を調製した 3 回の実験室規模の実験を完遂した。

## 【 0 1 5 9 】

50

主にフィブリノーゲンを含有するH E A H y p e r c e l (商標) カラムからの素通り画分に、ウイルス不活性化のため溶媒/界面活性剤処理を一晩行った。

【0160】

次に、ウイルスを不活性化した溶液を25mMトリス(pH8.0)を使用して10mS/cmまで希釈してから、25mMトリス(pH8.0)で予め平衡化したMacroPrep(商標)-HQ樹脂約412mLを充填した陰イオン交換カラム(XK50/30、GE Health care)に添加した。フロースルー画分を廃棄し、MacroPrep(商標)-HQカラムを90mM NaCl、50mMトリス、20mM EACAを含有する洗浄緩衝液(pH8.0)4カラム容量で洗浄した。これらのクロマトグラフィー条件下で、最初のフロースルー画分および洗浄画分は主にプラスミノーゲンおよびt-PAを含有し、一方、フィブリノーゲンはクロマトグラフィー樹脂に結合したままだった。モノマー型のフィブリノーゲンはMacroPrep(商標)-HQカラムから、200mM NaCl、10mMトリス、10mMクエン酸3ナトリウム、46mMスクロースおよび1.1mM CaCl<sub>2</sub>を含む溶出緩衝液(pH7.0)を使用して選択的に溶出し、フィブリノーゲン凝集物および低分子量タンパク質はMacroPrep(商標)-HQ樹脂に結合したままにした。

10

【0161】

MacroPrep(商標)-HQクロマトグラフィー溶出物に通過した、可溶化寒冷沈降物から生じた生成物中間体の特徴を、フィブリノーゲン、t-PA、プラスミノーゲン、フィブロネクチンおよび第II因子のレベルならびに様々な処理段階でのこれらのタンパク質それぞれの処理工程回収率によって明らかにした。表3に示した結果は、研究室規模で一貫して行った3回の別々のバッチの平均値を表している。血漿寒冷沈降物から開始してMacroPrep(商標)-HQ溶出物までの、処理全体のフィブリノーゲンおよび同時精製したタンパク質の回収率を図5に示す。

20

【0162】

MacroPrep(商標)-HQクロマトグラフィー樹脂から回収したフィブリノーゲンの純度は、サイズ排除HPLCクロマトグラムの分析によって明らかのように、95%を上回った。TSK Gel(商標)G4000SWXL(Tosoh Corporation)で分析したフィブリノーゲンのHPLC特性の代表例を図6に示す。図6に示したように、フィブリノーゲンモノマーは約17.4分の保持時間で溶出し、全ピーク面積の96.6%に当たり、一方フィブリノーゲンダイマーおよび/またはその他の高分子量タンパク質は約14.8分の保持時間で溶出した。

30

【0163】

実施例5および6で記載した方法に従って、他のフィブリノーゲンバッチをパイロット規模(血漿同等物81kg)で製造した。フィブリノーゲン調製物の特徴を表4に示す。

【0164】

〔実施例7〕

精製したフィブリノーゲンのウイルス濾過

MacroPrep(商標)-HQ溶出工程に190mM NaCl緩衝液(21.5mS/cm)、200mM NaCl緩衝液(22.5mS/cm)、210mM NaCl緩衝液(23.5mS/cm)または1%(w/w)アルギニンを含有する200mM NaCl緩衝液(25mS/cm)のいずれかを使用した実施例6の方法に従って、20nmウイルスフィルターによる濾過性を得られたフィブリノーゲン調製物で調べた。

40

【0165】

この方法では、調製物に3%(w/w)アルギニンをpH約7.5で配合することが必要であった(試料のタンパク質濃度は約6g/Lであった)。次に、配合した調製物は、ウイルス濾過工程前に0.1μmフィルターを使用して濾過した。ウイルス濾過工程は、47mm Pall SV4(商標)フィルターを用いて、デッドエンド様式で、定圧1.8barを使用して実施した。結果は、190mM、200mMまたは210mMのいずれかを使用してMacroPrep(商標)HQカラムから得られたフィブリノーゲン調

50

製物は、類似の濾過特性を生じることを示唆している。対照的に、1% (w/w) アルギニンを含む 200 mM NaCl 緩衝液を使用して MacroPrep (商標) HQ カラムから溶出したフィブリノーゲン調製物は、フィルターに迅速に付着した (図 7)。

【0166】

〔実施例 8〕

#### 安定性試験

前記の実施例 5 で記載した方法によって回収した精製フィブリノーゲン溶液を滅菌濾過し、9/7 週にわたって 2 ~ 8 または 30 で安定性試験を行った。2 ~ 8 に置いた液体フィブリノーゲン調製物は、貯蔵期間 9 週間後に Claus 法によって測定したところ、元の活性の約 90% を保持していた。30 に置いた液体フィブリノーゲン調製物は、貯蔵期間 2 週間後に元の活性の約 70% を保持し、少なくとも 5 週間はさらなる活性の喪失はなかった。60% を下回る活性のさらなる低下は、30 で 7 週間インキュベートすることによって認められた。30 でのフィブリノーゲン活性の喪失は、プロテアーゼ阻害剤 (C1 エステラーゼ) を添加しても貯蔵期間 5 週間にわたるフィブリノーゲン活性の損失を阻害しなかったため、タンパク質分解よりも熱変性によるものと考えられる。安定性データの概要を図 8 に示す。

【0167】

【表 3】

表 3

処理工程	タンパク質 mg/mL (n=3)		凝固タンパク質 (n=3)		プラスミノーゲン (n=3)		t-PA (n=3)		第 II 因子 (n=3)		フィブ्रोネクチン (n=3)	
	濃度 (mg/mL)	工程 回収率 (%)	濃度 (mg/mL)	工程 回収率 (%)	濃度 (ug/mL)	工程 回収率 (%)	濃度 (ng/mL)	工程 回収率 (%)	濃度 (U/mL)	工程 回収率 (%)	濃度 (mg/mL)	工程 回収率 (%)
可溶化した 寒冷沈降物	31.0		23.5		65.44		9.00		0.28041		8.15	
可溶化した寒冷沈降物濾液 - Al(OH) <sub>3</sub> 処理後	15.8	81%	11.6	80%	39.04	96%	2.20	39%	0.00057	0.3%	3.47	70%
可溶化したグリシン生理食塩水沈殿物	30.3	76%	27.6	95%	45.78	46%	5.55	101%	0.00025	26.0%	3.18	37%
HEA Hypercel 素通り画分	22.7	93%	20.5	92%	2.20	6%	0.98	22%	0.00008	39%	2.79	97%
SDインキュベーション & Macrorep-HQ クロマトグラフィー	7.4	80%	6.7	79%	0.04	5%	0.13	38%	<0.00002	0%	0.09	8%

【 0 1 6 8 】

10

20

30

40

【表 4】

表 4

バッチ番号	1	2	3	4
凝固タンパク質%	96	94	95	94
タンパク質 1mg 当たり tPA	12	24	17	21
タンパク質 1mg 当たり プラスミノーゲン (ng/mg)	5	6	5	6
タンパク質 1mg 当たり 第 II 因子(IU/mg)	$3.3 \times 10^{-7}$	$3.9 \times 10^{-7}$	$5.5 \times 10^{-7}$	$9.6 \times 10^{-7}$

10

【 0 1 6 9 】

〔 実施例 9 〕

HEA Hypercel を使用した第 V I I I 因子および / または V W F を含有する溶液中における血漿プロテアーゼレベルの低下

20

この実施例は、H C I C クロマトグラフィー工程も、第 V I I I 因子および / または V W F 含有調製物中におけるプロテアーゼを低下させるために使用できることを示す。この方法には、実施例 4 から得られたフィブリノーゲン含有溶液を、深層フィルターを使用して清澄化してから、清澄化した溶液を第 2 の疎水性電荷誘導クロマトグラフィー ( H C I C ) 樹脂に通過させることが必要である。H C I C 工程は、プラスミノーゲンなどのプロテアーゼが樹脂に結合し、一方、第 V I I I 因子および V W F が樹脂を通過することができる条件下で操作した。特に、X K 5 0 / 3 0 カラムに H E A H y p e r c e l ( 商標 ) 樹脂 3 4 0 m L を充填した。カラムは、5 0 m M トリス p H 6 . 7 で予め平衡化した。次に、実施例 4 によって調製した清澄なフィブリノーゲン溶液をこのカラムに添加し、カラムを 5 0 m M トリス p H 6 . 7 で洗浄した。素通り画分を収集し、第 V I I I 因子、V W F、プラスミノーゲンおよび t - P A のレベルを測定した ( V W F : R C o = フォンビルブランドリストセチンコファクター )。4 回の個々の実験から得られた平均結果の概要を、表 5 に示す。結果は、H C I C クロマトグラフィー工程は第 V I I I 因子および V W F を含む画分からプラスミノーゲンおよび t P A などのプロテアーゼを効果的に除去したことを示す。さらに、第 V I I I 因子および V W F の良好な回収率が認められた。

30

【 0 1 7 0 】

【表 5】

表 5

	容量 (mL)	第 VIII 因子 (IU/mL)	VWF:RCO (IU/mL)	プラスミ ノーゲン (ng/mL)	t-PA (pg/mL)
HEA Hypercel 前	3377.7	10.9	11.9	28617.1	2957.4
HEA Hypercel 後 素通り画分	3949.3	8.7	10.6	1874.0	683.5
素通り画分における 回収率%		93%	104%	8%	27%

10

## 【 0 1 7 1 】

## 〔 実施例 1 0 〕

様々な方法から精製したフィブリノーゲンの比較研究

20

実施例 6 で記載したように、本発明の方法によって製造したフィブリノーゲン調製物を国際公開第 2 0 0 1 0 4 8 0 1 6 号、国際公開第 2 0 1 2 0 3 8 4 1 0 号および国際公開第 2 0 1 3 1 3 5 6 8 4 号で記載された方法によって製造したフィブリノーゲン調製物と比較した。

## 【 0 1 7 2 】

( a ) 国際公開第 2 0 0 1 0 4 8 0 1 6 号で記載された方法の好ましい実施形態によって製造されたフィブリノーゲン調製物。

## 【 0 1 7 3 】

簡単に説明すると、この方法には、抽出緩衝液 ( 0 . 8 M NaCl、5 mM EACA ( イブシロン - アミノカプロン酸 )、2 0 mM クエン酸 Na、6 0 IU / mL ヘパリン、pH 7 . 3 ) 中に第 I 画分ペーストを懸濁することが必要である ( 抽出緩衝液 8 . 3 3 g に対して第 I 画分 1 g )。次に、この溶液を 3 7 で 1 . 5 時間混合してから、2 % Al ( OH )<sub>3</sub> ( アルハイドロゲル ) 溶液 5 0 g を第 I 画分 1 g に添加した ( 1 0 . 8 % )。この混合物を室温で 1 5 分間攪拌して、次に 5 0 0 0 g で 1 0 分間遠心し、ペレットを廃棄した。アルハイドロゲル処理した上清にグリシン / NaCl 緩衝液 ( グリシン 2 . 1 M、2 0 mM クエン酸 Na、3 . 6 M NaCl および 2 . 4 mM CaCl<sub>2</sub> ) を添加した ( いずれの溶液も 3 0 に予め平衡化した )。上清の緩衝液への添加は、約 4 . 5 分で完了した ( 緩衝液 2 . 0 5 部に対して上清 1 部 )。次に、この混合物を 3 0 で 2 0 分間攪拌してから 5 0 1 0 g で 1 0 分間遠心した ( 上清を廃棄した )。次に、沈殿物を緩衝液 D ( 1 0 0 mM NaCl、1 . 1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 0 mM クエン酸 Na、1 0 mM トリス、4 5 mM スクロース、pH 6 . 9 ) に室温で 2 時間混合して再溶解した ( 第 I 画分を再懸濁するために使用した量の 1 / 3 の量 ) ( 国際特許第 0 1 4 8 0 1 6 号、実施例 1、1 . 1 . 1 ~ 1 . 1 . 6 項 )。次に、再溶解したフィブリノーゲンを含有する溶液を Macro Prep ( 商標 ) HQ カラム ( 床高 2 0 cm の XK 2 6 ) に添加した。カラムを、少なくとも 1 . 5 カラム容量 ( CV ) の MQ 緩衝液 ( 5 0 mM トリス、1 0 0 mM NaCl、2 0 mM EACA、pH 8 . 0、1 0 mL / 分 ( 1 1 3 cm / hr ) で予め平衡化した。カラム後の伝導度が調製した緩衝液の 9 0 ~ 1 1 0 % になるまで、平衡化を継続した。次に、フィブリノーゲン溶液をこのカラムに添加し、カラムを 6 CV の MQ 緩衝液で洗浄した。フィブリノーゲンは、ME 緩衝液 ( 5 0 0 mM NaCl、1 . 1 M CaCl<sub>2</sub>、1 0 mM クエン酸 Na、1 0 mM トリスおよび 4 5 mM スクロース、p

30

40

50

H7.0)を使用して単一ピークとして溶出した。カラムは、2CVの1M NaClを使用して再生することができた(国際公開第2001048016号、実施例2)。

【0174】

(b) 国際公開第2012038410号および国際公開第2013135684号で以前に記載された方法の好ましい実施形態によって製造されたフィブリノーゲン調製物。

【0175】

確立された方法によって血漿から生産した寒冷沈降物をほぼ中性のpHで再構成または可溶化し、 $Al(OH)_3$ による吸着を行い、得られたゲルを遠心によって除去した。次に、溶媒/界面活性剤(S/D)処理によって上清のウイルスを不活性化した。S/D化合物、トリトンおよびTnBPを植物油で抽出し、水相をFractogel(登録商標)EMD-TMAEと接触させた。フィブリノーゲンがゲルに結合せず、したがってフロースルーまたは上清に見いだされるクロマトグラフィー条件(pH値6.9~7.1および浸透圧570~610mosmol/l)を使用した。結合していないフィブリノーゲンの溶液は、グリシン添加後(最終濃度1mol/lでpH=7.4)、フィブリノーゲンを沈殿させるために20mM EDTAの存在下で約90分間攪拌した。その後、フィブリノーゲン含有沈殿物を遠心によって分離して、中間体フィブリノーゲンペーストを生成した。中間体フィブリノーゲンペーストを20mMトリス緩衝液(pH=約8.0)に再懸濁した。次に、得られた懸濁液を濾過し、限外濾過/ダイアフィルトレーションを行った。次に、得られたフィブリノーゲン含有溶液をGigaCap Q-650M(登録商標)に添加し、フィブリノーゲン溶液を添加する前に、再懸濁するために使用したのと同じトリス緩衝液でクロマトグラフィーゲルまたは樹脂を予め平衡化した。緩く結合した物質を平衡化緩衝液で、次いで洗浄緩衝液(pH=約7.0および伝導率約12.0mS/cmに調節したクエン酸ナトリウム1.5g/l、塩化ナトリウム6.0g/l)で洗浄した。次に、フィブリノーゲンを溶出緩衝液(洗浄緩衝液と同じpHに調節し、約7.0g/lのNaCl、伝導率約13.1~15mS/cmに調節したクエン酸ナトリウム1.5g/l、グリシン10.0g/l)でクロマトグラフィーカラムから溶出した。

【0176】

国際公開第2001048016号、国際公開第2012038410号および国際公開第2013135684号で記載された方法から得られたフィブリノーゲン含有溶液の全タンパク質(ビウレット)、フィブロンекチンおよびプラスミノーゲンレベルを試験した。さらに、2~8および30で試料の安定性試験を行った。

【0177】

フィブリノーゲン調製物の特性の比較を表6に示す。試験の結果は、本発明の方法から製造されたフィブリノーゲンは、その他の方法と比較してプラスミノーゲン含有レベルが低いことを示す。

【0178】

10

20

30

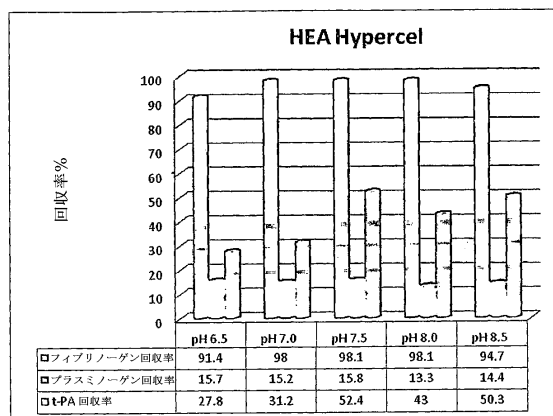
【表 6】

表 6

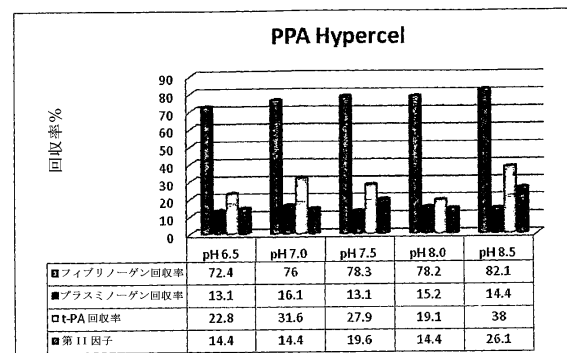
フィブリノーゲン調製物	実施例 6 の方法	国際公開第 2001048016 号の方法	国際公開第 2012038410 号/ 国際公開第 2013135684 号の方法
フィブロンекチン( $\mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質)	12	11	0.09
プラスミノーゲン( $\text{ng}/\text{mg}$ タンパク質)	5	54	791

10

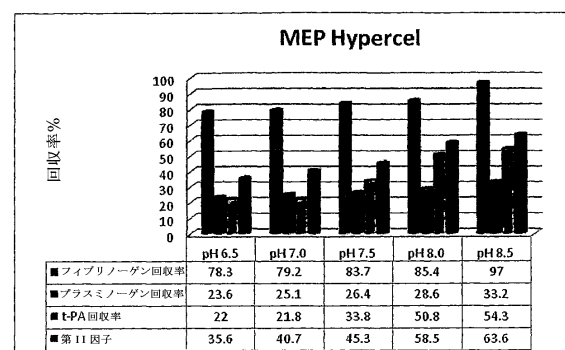
【図 1】



【図 2】

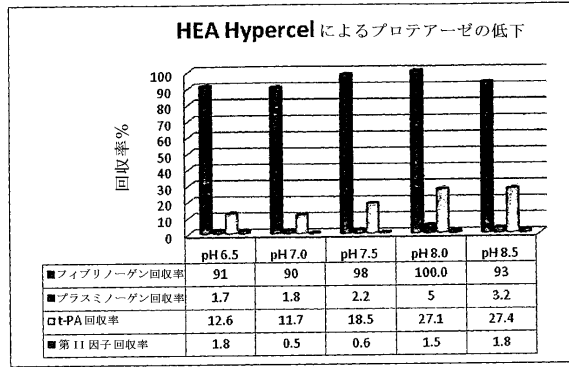


【図 3】

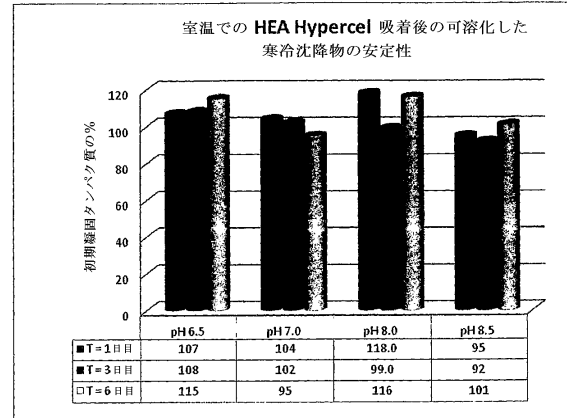




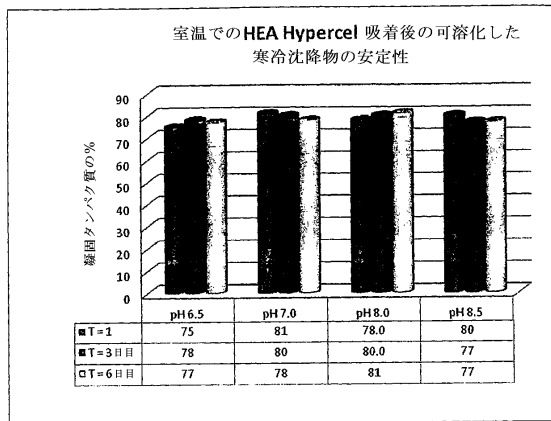
【図 4 a】



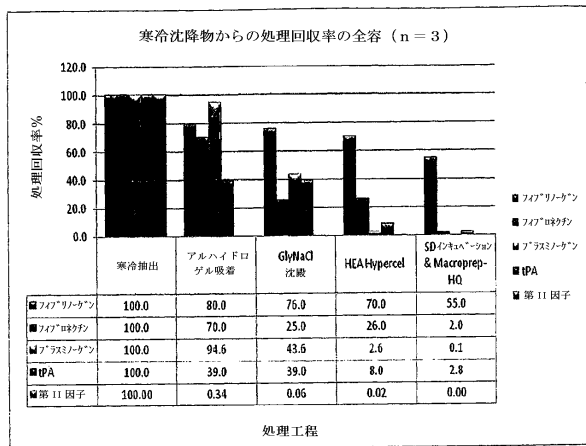
【図 4 b】



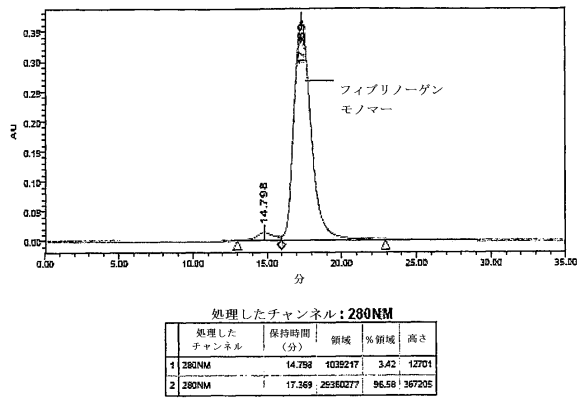
【図 4 c】



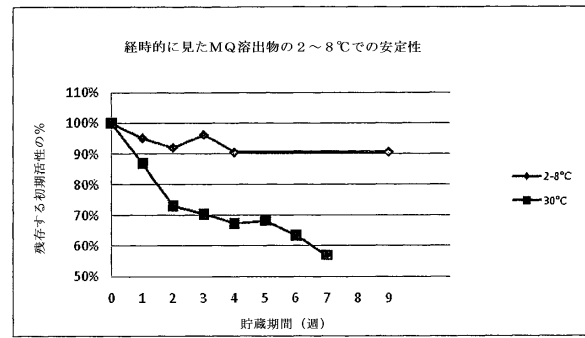
【図 5】



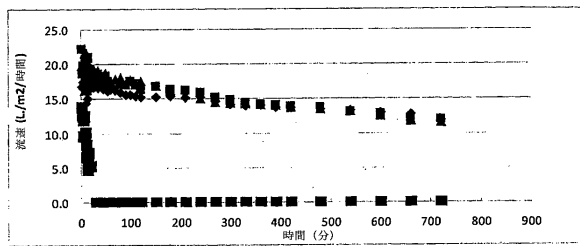
【図 6】



【図 8】



【図 7】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	9/68 (2006.01)	C 1 2 N	9/68
C 1 2 N	9/64 (2006.01)	C 1 2 N	9/64 Z
A 6 1 K	38/37 (2006.01)	A 6 1 K	38/37
A 6 1 K	38/36 (2006.01)	A 6 1 K	38/36
A 6 1 K	35/14 (2015.01)	A 6 1 K	35/14 D
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	7/04
A 6 1 L	24/10 (2006.01)	A 6 1 L	24/10

(31)優先権主張番号 13/803,740

(32)優先日 平成25年3月14日(2013.3.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 2013203357

(32)優先日 平成25年4月10日(2013.4.10)

(33)優先権主張国 オーストラリア(AU)

(72)発明者 ジェフリー・マイケル・ヘイ

オーストラリア連邦ビクトリア州3099・ハーストブリッジ・フォウクナークレセント19

(72)発明者 ダレン・ングイ

オーストラリア連邦ビクトリア州3030・デリムット・スターリングドライブ1

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特開2005-239719(JP,A)

特表2005-524092(JP,A)

特表2010-536832(JP,A)

特表平03-501974(JP,A)

国際公開第2012/038410(WO,A1)

特表2003-518513(JP,A)

特表平10-506607(JP,A)

米国特許第07211650(US,B1)

米国特許出願公開第2010/0062512(US,A1)

特表2008-503725(JP,A)

特表2010-537960(JP,A)

特表2006-505508(JP,A)

SPADIUT, O. et al., PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, 2012年 9月28日, Vol.8  
6, No.2, pp.89-97, [online], URL, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.09.008>CHEN, J. et al., JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, 2008年 1月11日, Vol.1177, No.2,  
pp.272-281

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 N 9 / 0 0 - 9 / 9 9

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

P u b M e d