(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3787154号
(P3787154)
(45)発行日　平成18年6月21日(2006.6.21)　(24)登録日　平成18年3月31日(2006.3.31)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 14/755	(2006.01)	C07K	14/755	
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	
A61P 7/04	(2006.01)	A61P	7/04	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A

請求項の数 3　(全 17 頁)

(21)出願番号　特願平8-515993
(86)(22)出願日　平成7年11月14日(1995.11.14)
(65)公表番号　特表平10-509144
(43)公表日　平成10年9月8日(1998.9.8)
(86)国際出願番号　PCT/SE1995/001351
(87)国際公開番号　WO1996/015150
(87)国際公開日　平成8年5月23日(1996.5.23)
審査請求日　平成14年10月4日(2002.10.4)
(31)優先権主張番号　9403915-3
(32)優先日　平成6年11月14日(1994.11.14)
(33)優先権主張国　スウェーデン(SE)

(73)特許権者　398020862
ジエネテイツクス　インステイテユート　エルエルシー
アメリカ合衆国　マサチユーセツツ州　０２１４０　ケンブリツジ，ケンブリツジ　パーク　ドライブ　８７
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(72)発明者　アルムステツト，アンネリ
スウェーデン国、エス－１６３　５４・スポンガ、レンステイーゲン・８・ベー
(72)発明者　サンドベリ，ヘレーナ
スウェーデン国、エス－１６１　３７・ブロンマ、イエルコツツベーゲン・２１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＶＩＩＩ因子の精製方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
活性を発揮するのにＺｎ$^{2+}$が必要であるか又は構造の一体部分としてＺｎ$^{2+}$を含む金属活性化プロテアーゼ及び／又はメタロプロテアーゼによって惹起されるフォンビルブランド因子を実質的に含まない組換え血液凝固ＶＩＩＩ因子の分解を低減させる方法であって、Ｚｎ$^{2+}$依存性プロテアーゼの阻害剤を採取後の溶液に添加すること、及び、阻害剤が、ＶＩＩＩ因子分子を安定化する１種又は複数のイオンに対するよりもプロテアーゼのＺｎ$^{2+}$イオンに対して強い親和性を有する錯化剤であって、イミダゾール、Ｌ－ヒスチジン及び１，１０－フェナントロリンからなる群から選択されるものであることを特徴とする方法。
【請求項２】
カチオン性ゲルに吸着されたＶＩＩＩ因子分子を少なくとも０．３Ｍのイオン強度をもつ溶液によって溶出させることを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
血友病の症状を有する患者に投与する医薬を製造するための、請求項１又は２に記載の方法で組換えＶＩＩＩ因子を精製し、該精製された組換えＶＩＩＩ因子を含有する水溶液の使用。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
プロテアーゼは一般に、分子を分解することによって血液凝固VIII因子の活性を低下させ

る傾向を有している。本発明は、採取後の溶液に金属依存性プロテアーゼの阻害剤を添加することによって組換えVIII因子に対する金属依存性プロテアーゼの有害な影響を低減させる方法に関する。好適な溶液は、採取溶液であるかまたは精製処理系の最初の段階である一次単離に供給されるかもしくは一次単離後に得られる任意の水溶液である。阻害剤は、（１）VIII因子分子を安定化する１種または複数のイオンに対するよりもプロテアーゼのアルカリ土類金属イオンまたは金属イオンに対して強い親和性を有する錯形成剤、及び、（２）プロテアーゼの天然基質に構造的に近縁であり電気陰性部分を含んでいる化合物、から選択される。採取後に阻害剤、好ましくは錯形成剤が存在すると、採取期間が延長され、収率がかなり向上し、しかもVIII因子活性がほぼ維持される。本発明は更に、本発明方法によって精製された組換えVIII因子を含有する水溶液、及び、血友病の症状を有する患者に投与する医薬を製造するためのかかる水溶液の使用に関する。本発明はまた、本発明方法によって精製した組換えVIII因子を治療有効量で投与する血友病の治療方法に関する。

発明の背景

血友病は何世紀も前から知られていた遺伝性疾患であるが、種々の形態、即ち血友病Ａ及び血友病Ｂが判別できるようになってから４０年しか経っていない。発病頻度が多いのは血友病Ａのほうである。血友病は出生男児１０，０００あたり１～２人の割合で男性だけに発生する。生物学的に活性の血液凝固VIII因子（抗血友病因子）は普通は血漿中に存在するタンパク質であるが、血友病の原因はこの因子の極度のレベル低下または欠損にある。血友病Ａの臨床症状は、強い出血傾向であり、VIII因子濃縮物による治療が導入される前は、罹患患者に平均寿命は２０歳に達していなかった。ほぼ３０年前からは血漿から得られたVIII因子濃縮物が使用できるようになっている。これは血友病患者の治療状況をかなり改善し、普通の生活を送ることも可能になっている。

最近まで、治療用VIII因子濃縮物は血漿の分画化によって調製されていた。しかしながら、例えばW．Ｗｏｏｄら，Ｎａｔｕｒｅ，３１２，ｐ．３３０－３７（１９８４）及び欧州特許ＥＰ－Ａ－０１６０４５７に報告されているように、組換えＤＮＡ技術を用いた細胞培養でVIII因子を産生させる方法が数年前から使用できるようになっている。

タンパク質がセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ及びメタロプロテアーゼのようなプロテアーゼによって開裂されることは公知である。多くのプロテアーゼはそれらの活性にアルカリ土類金属または金属（以下の記載では単に金属と呼ぶ）を必要とする。金属依存性プロテアーゼは、金属活性化プロテアーゼ（活性を発揮させるために金属イオンを付加する必要である）またはメタロプロテアーゼ（構造の一体部分として金属を含む）のいずれかであると考えられている。最初のグループに属するセリンプロテアーゼ及びシステインプロテアーゼのような複数のクラスのプロテアーゼにおいては金属による酵素の活性化及び安定化が頻繁に生じる。

培養された内皮細胞中のメタロプロテアーゼがある種の代謝産物を分泌するために重要であることは、Ｒ．ＩｋｅｇａｗａらによってＢｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．１７１（２），ｐ．６６９－６７５（１９９０）に記載されている。これは、メタロプロテアーゼ特異的阻害剤を添加したときに分泌抑制効果が認識されたことによって判明した。しかしながら、無細胞のならし培地では阻害剤の効果が全く得られなかったので酵素が細胞間隙に拘束されていることは明らかであった。

プロテアーゼの作用は、対象となるタンパク質の分解という潜在的な危険性に関連してこれまでにもしばしば言及されている。

米国特許ＵＳ－Ａ－５１４９７８７（Ｔｈｅ Ｂｌｏｏｄ Ｃｅｎｔｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ）は、VIII因子（ＦVIII）／フォンビルブラント因子（ｖＷｆ）複合体を開裂し得るカルシウム（$Ｃａ^{2+}$）活性化プロテアーゼの細胞性ソースを同時に含有する血液、血漿及び血漿分画の処理中にVIII因子（ＦVIII）／フォンビルブラント因子（ｖＷｆ）の完全形（ｉｎｔａｃａｔ）の非分解分子複合体を維持する方法に関する。複合体のｖＷｆ部分に特異的な（１種または複数の）プロテアーゼの作用を防ぐことによってＦVIII／ｖＷｆ複合体の機能的完全性が維持される。血漿から（１種または複数の

）プロテアーゼの血小板ソースを除去するか、または、（１種または複数の）プロテアーゼを失活させることによって、カルシウム活性化された（１種または複数の）プロテアーゼの作用を阻止し得る。例えばキレート化などによって活性化に必要なカルシウムを除去するか、または、システインプロテアーゼに対する特異的阻害剤で（１種または複数の）プロテアーゼを阻害することによって、（１種または複数の）プロテアーゼを失活させ得る。従って米国特許ＵＳ－Ａ－５１４９７８７は特に、血液または血漿から得られたＦＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体のフォンビルブラント因子部分を維持する方法を目的とする。

種々の解決方法は、血漿由来分子及び組換えVIII因子分子のプロテアーゼによる分解を抑制することを示唆している。これらの解決方法は、血漿中及び細胞培養物中で最も有害であると考えられているセリンプロテアーゼ及びシステインプロテアーゼの影響を抑制することを目的としている。従って、国際特許ＷＯ－Ａ－９３１０１４３（Ｊｏｈｎｓｏｎら）は、VIII因子を含有する生物サンプルを少なくとも１種類のプロテアーゼ阻害剤またはプロテアーゼ除去剤と接触させることによって安定な精製タンパク質を回収する方法を開示している。方法は特に、トロンビンを阻害または除去することを目的としており、その理由は、先天的に血漿中に存在する微量のこのセリンプロテアーゼに対してVIII因子が極めて感受性であると言われているからである。プロテアーゼ阻害剤としては例えば、ヘンズアミジン、抗トロンビンIII、ヘパリン及びヒルジンがある。この方法の効果は血漿由来のVIII因子に対してのみ証明された。

国際特許ＷＯ－Ａ－９００２１７５（Ｎｏｖｏ－Ｎｏｒｄｉｓｋ）は、プロテアーゼ阻害剤の存在下で真核細胞を培養することによってポリペプチドを産生する方法を開示している。特定実施例は、VIII因子をポリペプチドとして含むが、プロテアーゼ阻害剤はいずれもセリンプロテアーゼ及びシステインプロテアーゼを対象としており、また、阻害剤が細胞培養物自体に存在する。

種々のタンパク質の産生における金属依存性プロテアーゼに関する問題は、セリンプロテアーゼ及びシステインプロテアーゼの役割ほどには十分に研究されていない。より詳細には、この問題がVIII因子に関連してこれまで特別に取り上げられたことはない。従って、本発明の目的は、採取後に得られたVIII因子活性が精製方法を通じてほぼ完全に維持されるように、組換えVIII因子の産生中の金属依存性プロテアーゼの影響を防ぐことである。

発明の詳細な説明

本発明の目的は、金属依存性プロテアーゼ自体の作用を阻害することによって組換えVIII因子に対する金属依存性プロテアーゼの影響を低減させることである。

本発明の別の目的は、これらのプロテアーゼの活性に必要な金属イオンの作用を阻害するかまたは金属イオンを除去することによって組換えVIII因子に対する金属依存性プロテアーゼの影響を低減させることである。

本発明の別の目的は、組換えVIII因子の活性がほぼ保持される効率的な精製方法を提供することである。

本発明の更に別の目的は、高度に濃縮された極めて純粋な組換えVIII因子の溶液を製造するための効率的な方法を提供することである。

上記目的が本発明によって達成される。本発明は、金属依存性プロテアーゼによって惹起される組換え血液凝固VIII因子の分解を低減させる方法であって、金属依存性プロテアーゼの阻害剤を採取後の溶液に添加すること、及び、阻害剤を、

（１）VIII因子分子を安定化する１種または複数のイオンに対するよりもプロテアーゼのアルカリ土類金属イオンまたは金属イオンに対して強い親和性を有する錯形成剤、及び、

（２）プロテアーゼの天然基質に構造的に近縁であり電気陰性部分を含んでいる化合物

から成るグループから選択することを特徴とする。

本発明の発明者らは意外にも、ある種の金属依存性プロテアーゼ阻害剤が精製処理系中またはその後の組換えVIII因子の活性に肯定的な影響を有することを知見した。これらの阻害剤の存在は、金属依存性プロテアーゼ自体の作用を効率的に阻害し及び／または組換えVIII因子分子に特に有害なプロテアーゼの活性に必要な金属イオンを効率的に除去し得る。従って、金属依存性プロテアーゼの作用を低下させ、活性は精製工程全体を通じてほぼ

維持されたVIII因子活性を与える。
金属依存性プロテアーゼは、金属活性化プロテアーゼ（活性を発揮させるために金属イオンを付加する必要がある）またはメタロプロテアーゼ（構造の一体部分として金属を含む）のいずれかであると考えられる。最初のグループの場合、セリンプロテアーゼ及びシステインプロテアーゼのような複数のクラスのプロテアーゼにおいて金属による酵素の活性化及び安定化が頻繁に生じる。例えば、血液機能に分野、特に血液凝固、線維素溶解及び補体活性化においては、一群のビタミンＫ依存性カルシウム結合ドメインが共通に存在する（例えばＬａｓｚｌｏ　Ｐａｔｔｈｙ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２２２，ｐ．１０－２１（１９９３））。後者のメタロプロテアーゼに関しては、このプロテアーゼのクラスの重要なサブグループである哺乳類メタロエンドペプチダーゼに関する概説がＢｏｎｄら，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１７，ｎｏ．５，ｐ．５６５－５７４（１９８５）に記載されている。著者らは、特性決定されたすべての哺乳類メタロプロテアーゼに対してZn^{2+}が必須金属であると結論している。より最近の論文でも（Ｄ．Ａ．Ａｕｌｄ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２４８，ｐ．２２９－２４２（１９９５））、このイオンがやはり、圧倒的に多数のメタロプロテアーゼの活性イオンであると考えられている。これは、Cu^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+}、Mn^{2+}、Co^{2+}及びCd^{2+}のような他の金属の構造的及び機能的役割を排除しない（Ａｕｌｄ、前出）。例えば、Zn^{2+}及びCa^{2+}に依存する酵素は、Ｂｕｔｌｅｒら，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．，２４１，ｐ．２２９－２３５（１９８７）に記載されている。
本発明において、「採取後」なる用語は、例えば遠心及び／または濾過によってならし培地から細胞を分離した後の処理作業及び処理段階に関する。本発明において、金属依存性プロテアーゼの阻害剤は、採取後に得られるかまたは使用される任意の溶液に添加し得る。しかしながら、採取溶液及び一次単離に供給されるかまたは一次単離後に得られる任意の水溶液から成るグループから選択された溶液に阻害剤を添加するのが好ましい。より詳細には、本発明においては阻害剤が、採取溶液中、充填前の任意に予め濃縮されたVIII因子含有水溶液中、洗浄用液体中、溶出用液体中、一次単離後に得られた溶液中またはその混合物中に存在し得る。一次単離がクロマトグラフィー段階であるとき、一次単離後に得られた溶液を溶出物と呼ぶ。一次単離後に得られた溶液に阻害剤を添加する場合は、その次の処理段階に溶液を導入する前に添加を行う。このようにすると、分解されたVIII因子分子の含有量をかなり減少させることが可能である。
本発明において、VIII因子は組換え体であり、全長VIII因子であるかまたは好ましくは血液凝固活性を有する全長VIII因子の欠失誘導体である。本文中の「欠失誘導体」なる用語は、Ｂ－ドメインの全部または一部が欠損しているが血液凝固活性は保持している血液凝固VIII因子を意味する。組換えVIII因子産物一般の構造及び生化学はＫａｕｆｍａｎによってＴｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，９，ｐ．３５３－３５９（１９９１）及びＨｅｍａｔｏｌｏｇｙ，６３，ｐ．１５５－６５（１９９１）に記載されている。
ヒト血漿に由来のVIII因子濃縮物は、ＡｎｄｅｒｓｓｏｎらによってＰｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８３，ｐ．２９７９－８３（１９８６年５月）に記載されているように、フラグメントに分割された複数の完全に活性のVIII因子形態を含有している。最も小さい活性形態は分子量１７０ｋＤａを有しており、（１つまたは複数の）金属イオンによって互いに結合された９０ｋＤａと８０ｋＤａとの２つの鎖から構成されている。これに関しては欧州特許ＥＰ－Ａ－０１９７９０１（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　ＡＢ）を参照するとよい。
Ｐｈａｒｍａｃｉａ　ＡＢ，Ｓｔｏｃｋｈｏｌｍ，Ｓｗｅｄｅｎは、治療用VIII因子濃縮物中の１７０ｋＤａの血漿VIII因子形態に対応する組換えVIII因子産物を開発した。切断された組換えVIII因子の分子はｒ－VIIIＳＱと命名され、無血清培地中で細胞培養処理されるチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞によって産生される。
ｒ－VIIIＳＱの構造及び生化学は国際特許ＷＯ－Ａ－９１０９１２２（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　ＡＢ）に記載されている。本発明において、より好ましくは欠失誘導体は組換えVIII

ＳＱ（ｒ－VIIIＳＱ）因子である。
本発明に従って組換え血液凝固VIII因子を産生するときに細胞培養物の採取後に得られるならし培地は、フォンビルブラント因子（ｖＷｆ）をほぼ含んでいないのが好適であり、全く含んでいないのが好ましい。組換え血液凝固VIII因子を産生するために使用される細胞培養物は、フォンビルブラント因子（ｖＷｆ）をほぼ含有しないのが好ましく、全く含有しないのがより好ましい。このような場合、組換えVIII因子を産生する処理全体がｖＷｆを含むことなく行われる。これによって、極めて高い活性を有するVIII因子を産生することが可能である。
多くのタンパク質はアルカリ土類金属または金属を含有している。この事実は、構造的一体性及び活性維持のために少なくとも１つの二価イオンのブリッジを必要とするVIII因子分子においても同様である。このイオンは通常はカルシウムであると考えられている。しかしながらｉｎ－ｖｉｔｒｏ試験では、カルシウム、マンガン、コバルトまたはその組合わせなどの種々の二価イオンが有利に使用された。これに関しては、Ａｎｄｅｒｓｓｏｎら（前出）、Ｎｏｒｄｆａｎｇら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６３，ｐ．１１１５－１１１８（１９８８）及びＦａｙら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．ｃｈｅｍ．，２６７，ｐ．１３２４６－１３２５０（１９９２）を参照するとよい。最近になって、VIII因子中の銅の含有量がＮ．Ｂｉｈｏｒｅａｕら，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２２２，ｐ．４１－４８（１９９４）によって明らかにされた。この著者らは、このカチオンの存在は血液凝固活性に直接には関連しないが分子にとって構造的に重要であることを示唆している。しかしながらＮｏｒｄｆａｎｇら（前出）は、解離したVIII因子鎖を銅の添加によって再結合させる試みには失敗した。
カルシウムのような二価イオンが存在すると、VIII因子はアルカリ土類金属または金属のイオンをトラップする傾向を有している錯形成剤の存在の特に感受性のタンパク質となる。従って、Ｂｏ　Ｅｒｓｓｏｎら，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ；Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ，Ｈｉｇｈ　Ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ＶＣＨ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，ｐ．７－１０（１９８９）を引用すると、「多くのタンパク質はカルシウムイオンによって安定化される。二価イオンのカルシウム及びマグネシウムはＥＤＴＡによってトラップされるので、このキレート化剤と併用することができない（Ｍａｎｙ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ａｒｅ　ｓｔａｂｉｌｉｚｅｄ　ｂｙ　ｃａｌｃｉｕｍ　ｉｏｎｓ．Ｔｈｅ　ｄｉｖａｌｅｎｔ　ｉｏｎ　ｃａｌｃｉｕｍ　ａｎｄ　ｍａｇｎｅｓｉｕｍ　ａｒｅ　ｔｒａｐｐｅｄ　ｂｙ　ＥＤＴＡ　ａｎｄ　ｃａｎｎｏｔ　ｂｅ　ｕｓｅｄ　ｉｎ　ｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ　ｗｉｔｈ　ｔｈｉｓ　ｃｈｅｌａｔｏｒ）」。
Ａｎｄｅｒｓｓｏｎら（前出）は、ヒト血漿に由来のVIII因子の構造中の金属イオンの役割を決定するために周到な試験を実施した。結果は、ＥＤＴＡは２００から９０ｋＤａまでの分子サイズを有する重いほうの鎖の各々から８０ｋＤａの二重鎖を解離させることを示した。キレート化剤の存在は、Ｆａｙら（前出）にも開示されているように二量体サブユニットの解離を惹起した。
以上のような理由から、錯形成剤がVIII因子分子の認識できる程度の不安定化を全く伴うことなくVIII因子溶液中に存在し得ることは特に意外である。従って、これまでの定説と対照的に、錯形成剤は組換えVIII因子の精製処理に有利に使用できる。
本発明において、金属依存性プロテアーゼの阻害剤は、（１）VIII因子分子を安定化する１種または複数のイオンに対するよりもプロテアーゼの金属イオンに対して強い親和性を有する錯形成剤、及び、（２）プロテアーゼの天然基質に構造的に近縁であり電気陰性部分を含んでいる化合物から成るグループから選択される。後者のグループの化合物は好適にはペプチドまたはペプチド類似体であり、好ましくは、ヒドロキサメート、ホスホラミデート及びカルボキシレートから成るグループから選択される。例えば、ヒドロキサメート、ホスホラミデートまたはカルボニル基によって官能化されたペプチドまたはペプチド類似体によるメタロプロテアーゼ阻害のメカニズムは完全には解明されていない。しかしながら文献においては、それらの効果がキレート化機能によると考えられている（特に、

Ｂｉｒｋｅｄａｌ－Ｈａｎｓｅｎら，Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗ ｉｎ Ｏｒａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，４（２），ｐ．１９７－２５０のｐ．２２１－２２２（１９９３）参照）。従って、本発明による金属依存性プロテアーゼ阻害剤として使用できる２つのクラスの化合物は、単一の普遍的な発明概念を形成できるほど近縁である。

構造的に近縁の化合物のグループから選択される化合物はホスホラミドンの場合のように天然化合物でもよくまたは合成化合物でもよい。このような合成阻害剤の設計は、Ｂｏｎｄら（前出）に概説されている。Ｎ．Ｎｉｓｈｉｎｏ ａｎｄ Ｊ．Ｃ．ＰｏｗｅｒｓによってＢｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１７（１４），ｐ．２８４６－２８５０（１９７８）に記載されている１つの実例は、亜鉛メタロエンドペプチダーゼであるサーモリシンに対して特異的な阻害剤の合成である。この場合、阻害剤であるペプチド類似体の特異性は、酵素の活性部位の対応するポケットと相互作用する疎水性アミノ酸、及び、亜鉛原子と相互作用するヒドロキサム酸残基を加えることによって得られた。この現象の説明は、Ｂ．Ｒｏｑｕｅｓら，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２４８，ｐ．２６３－２８３、特にｐ．２６８－２６９及び２７２（１９９５）に収載されている。ヒドロキサメートの別の実例は国際特許ＷＯ９０／０５７１９に開示されている。

本発明において、金属依存性プロテアーゼの阻害剤は好適には錯形成剤である。従って以下の記載では、金属依存性プロテアーゼ阻害剤として錯形成剤を使用した場合について本発明を説明する。本発明における錯形成剤の選択は、例えば該当する種々のイオンに対する親和性、必要な濃度、毒性及び経費などに基づいて行われる。本発明の錯形成剤は、VIII因子分子を安定化する１種またはそれ以上のイオンに対するよりもプロテアーゼの金属イオンに対して高い親和性を有している。本文中で、親和性の順位は、実際の金属キレート化平衡状態を対象として、即ち、実際のイオンと実際のタンパク質中のキレート化部位との間の結合の強度に関して決められる。上記の結合の強度を、これらのイオンと添加された錯形成剤との間の結合の強度に比較する。更に、平衡状態は実際のイオン強度、ｐＨ及び他の重要な生理化学的要因に関連する。

本発明による適当な錯形成剤としては、窒素含有ポリカルボン酸、複素環アミン、フェナントロリン、ピリジンカルボン酸、キノリン、サリチル酸塩、コラーゲンのＮ－アシル誘導体、β－ジケトンのＮ－アミノアシル誘導体、チオール化合物、並びに、ジ－及びトリカルボン酸などがある。窒素含有ポリカルボン酸の例は、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、〔（エチレンジオキシ）ジエチレンジニトリロ〕四酢酸（ＥＧＴＡ）及びニトリロ酢酸（ＮＴＡ）である。複素環アミンの例は、イミダゾール及びＬ－ヒスチジンである。フェナントロリンの例は、１，１０－フェナントロリン及びフェナントロリンのメチル誘導体である。ピリジンカルボン酸及びキノリンの例は、ピリジン－２，６－ジカルボン酸（ジピコリン酸）及び８－ヒドロキシキノリンである。ジ－及びトリカルボン酸の例は、シュウ酸及びクエン酸である。他の例は、Ｄａｖｉｄ Ａｕｌｄ（前出、特に表１参照）及びＶｉｎｃｅｎｔ Ｈ．Ｌ．Ｌｅｅ，Ｊ．Ｃｏｎｔ．Ｒｅｌｅａｓｅ，１３，ｐ．２１３－２２３（１９９０）に開示されている。プロテアーゼの１種または複数の金属イオンに対する親和性及びVIII因子分子を安定化する１種または複数のイオンに対する親和性、並びに、毒性、利便性及び経済性などを勘案すると、本発明においてはＥＤＴＡの使用が好ましい。ＥＤＴＡの種々の塩のうちでも、VIII因子分子を安定化するイオンを少なくとも１種類は含有する塩、例えば、ＥＤＴＡのカルシウム塩及びナトリウム塩を使用するのが有利であろう。ＥＤＴＡの二ナトリウム塩及び三ナトリウム塩並びに対応するカルシウム二ナトリウム塩の毒性データ及び他の特性はＭｅｒｃｋ Ｉｎｄｅｘ，Ｍｅｒｃｋ ＆ Ｃｏ．，Ｉｎｃ．，Ｒａｈｗａｙ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ，ＵＳＡ，１１ｔｈ ｅｄ．，ｐ．５５０（１９８９）及びＭａｒｔｉｎｄａｌｅ，Ｔｈｅ Ｅｘｔｒａ Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐｒｅｓｓ，３０ｔｈ ｅｄ．，ｐ．６８１－６８２及び６９３－６９４（１９９３）に記載されている。

錯形成剤の濃度は、VIII因子を安定化する１種類または複数のイオンが問題の溶液中で遊離イオンとして検出され得るように調整しなければならない。これによってVIII因子分子

の活性を保持することが可能である。VIII因子を安定化する１種類または複数のイオンの総濃度は好適には少なくとも約０．２ｍＭであり、好ましくは１－３００ｍＭの範囲、より好ましくは５－５０ｍＭの範囲である。濃度は添加の時期には左右されないが、錯形成剤の濃度には左右される。

錯形成剤が窒素含有ポリカルボン酸であり採取溶液に添加される場合、錯形成剤の濃度は、約０．０１－約１０ｍＭの範囲、好適には０．１－５ｍＭ、好ましくは０．３－３ｍＭの範囲でなければならない。

錯形成剤が窒素含有ポリカルボン酸であり一次単離における洗浄用液体に添加される場合、錯形成剤の濃度は、約０．０１－約５０ｍＭの範囲、好適には０．１－１０ｍＭ、好ましくは０．５－５ｍＭの範囲でなければならない。

一次単離がクロマトグラフィー段階である場合、吸着VIII因子を溶出させるために使用される液体中で錯形成剤として作用する窒素含有ポリカルボン酸の濃度は約０．１－約３０ｍＭの範囲、好適には０．５－１５ｍＭ、好ましくは１－５ｍＭの範囲でなければならない。

錯形成剤が窒素含有ポリカルボン酸であり一次単離後に得られた溶液に添加される場合、錯形成剤の濃度は、約０．１－約３０ｍＭの範囲、好適には０．５－１５ｍＭ、好ましくは１－５ｍＭの範囲でなければならない。

錯形成剤が窒素含有ポリカルボン酸以外の化合物である場合、当業者は本発明を実施するための好適な濃度を想到し得るであろう。例えば、フェナントロリンを使用する場合、必要な濃度は窒素含有ポリカルボン酸の２倍であろう。複素環アミンであるヒスチジン及びイミダゾールの場合にはより高い濃度でもよく、弱い錯形成剤であるイミダゾールの場合には特に高い濃度が必要であろう。

本発明の一次単離は、採取溶液中のVIII因子の濃度増加を目的とするいかなる処理段階でもよい。公知の好適例としては、種々のクロマトグラフィー処理、限外濾過、例えば硫酸アンモニウムなどによる沈殿がある。クロマトグラフィー処理にはカチオン交換クロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフイー、アフィニティクロマトグラフイー及び疎水性相互作用クロマトグラフィーなどがある。本発明では、イオン交換クロマトグラフィー段階を一次単離として使用するのが特に有利である。その理由は、イオン交換ゲルが剛性であるため、溶出後のゲル表面がまだ汚染されているときに、吸着能力を回復させるために強アルカリ性溶液で処理できるからである。好ましい実施態様では、一次単離がカチオン交換クロマトグラフィー段階である。一次単離としてカチオン交換段階を使用すると、液体容量及び採取溶液の総タンパク質含有量を即座に且つ飛躍的に減少させることが可能である。採取溶液中にアルブミンが存在するときはこれが特に有効である。従って、カチオン性ゲルを用いた場合にはアニオン性ゲルと対照的に、アルブミンが実質的にいかなる程度にもゲル表面に吸着されないので洗浄によって容易に除去できる。

本発明において、様々な種類のカチオン交換ゲルを使用し得る。リガンドは、スルホエチル、スルホプロピル、スルホブチル、スルホネート及びカルボキシメチルから成るグループから適宜選択される。好ましくはリガンドは広いｐＨ範囲を許容するスルホプロピルまたはスルホネートである。適当なカチオン交換ゲルの特性値は、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ；Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ，Ｈｉｇｈ Ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐ．１０７－１４８（１９８９）及びＥ．Ｂｏｓｃｈｅｔｔｉ．Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．，Ａ６５８，１９９４，ｐ．２０７－２３６に記載されている。これらの文献の記載内容は参照によって本明細書に含まれるものとする。マトリックスは、例えば、Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎによって販売されている種々のＳｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）のようなアガロースマトリックス、Ｔｏｓｏｈ Ｃｏｒｐ．，Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎによって販売されているＴＳＫ－ＧＥＬ：ｓのような有機ポリマーマトリックス、または、Ｐｅｒ Ｓｅｐｔｉｖｅ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＵＳＡによって販売されている極めて多孔性の有機ポリマーマトリックス、のような種々の強い疎水性のマトリックスから選択できる。例

えば、Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ，Ｇｅｒｍａｎｙから販売されているＳａｒｔｏｂｉｎｄ（登録商標）及びＭｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＵＳＡによって販売されているＭｅｍＳｅｐ（登録商標）のような膜マトリックスも適当である。好ましいマトリックスはアガロースマトリックスである。本発明に適したアガロースマトリックスとしては、Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）以外にも、Ｋｅｍ－Ｅｎ－Ｔｅｃ　Ａ／Ｓ，Ｃｏｐｅｎｈａｇｅｎ，Ｄｅｎｍａｒｋによって販売されているＭｉｎｉｌｅａｋ（登録商標）及びＢｉｏ－Ｒａｄ，Ｂｒｕｓｓｅｌｓ，Ｂｅｌｇｉｕｍによって販売されているＢｉｏ－Ｇｅｌ　Ａがある。好ましくは、高速流（ＦＦ）を可能にし、高い生産能力を与えるようにマトリックスを架橋させる。より好ましくは、本発明のクロマトグラフィーをＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＦＦゲルにおいて行う。

以下の記載では、一次単離がカチオン交換段階から成る場合について本発明を説明する。一次単離が別の段階から成る場合には、当業者は本発明を実施するための適当な条件を想到し得るであろう。これは例えば種々の溶液のｐＨ及びイオン強度並びに処理温度に関しても同様である。

カチオン交換樹脂に充填される溶液のイオン強度及び溶出用溶液のイオン強度は、得られる精製のタイプ及び精製効率にとって重要である。従って、主としてVIII因子とＤＮＡとの効率的な分離を可能にするためには、カチオン交換樹脂に充填される溶液のイオン強度、及び／またはカチオン交換樹脂に吸着されたVIII因子の洗浄用溶液のイオン強度は、約０．０５－０．３Ｍ、好適には０．１－０．２５Ｍ、好ましくは０．１５－０．２Ｍの範囲でなければならない。カチオン交換樹脂からVIII因子を溶出させるために使用される溶液のイオン強度は、溶出開始のときに約０．３Ｍ以上、好適には０．４－２Ｍ、好ましくは０．５－０．９Ｍでなければならない。溶出段階全体にわたってイオン強度を一定に維持してもよくまたは直線状もしくは段階的もしくは双方の組合わせの形態で減少させてもよい。

カチオン交換樹脂に充填される溶液及びVIII因子を溶出させるために使用される溶液のイオン強度は好適には、アルカリ金属塩化物、例えば、塩化ナトリウムもしくは塩化カリウムまたは酢酸アンモニウムまたはその任意の組合わせの存在によって得られる。

VIII因子をゲル表面に吸着させるためにカチオン交換樹脂に充填される溶液、並びに、VIII因子分子をゲル表面から溶出させるために使用される溶液は、約５－約８、好適には５．４－７．０の範囲にｐＨを有していなければらない。

本発明において、処理温度は従来技術ほど重要ではない。従来技術では、過度の収率低下を防止するために室温を十分に下回る温度が必要であると考えられていた。本発明では、一次単離及びその後の処理段階を室温で実施しても、VIII因子分子が顕著に不安定化する危険性がない。従って、カチオン交換段階のVIII因子の吸着及び脱着は、例えば１８－２５℃の温度で実施し得る。しかしながら、吸着及び脱着を室温よりも低温、好ましくは約２℃－約１０℃の範囲の温度で行うのが適当である。

本発明においては、精製処理系に合計で２回、３回またはより多い回数のカチオン交換段階が含まれるようにカチオン交換クロマトグラフィー段階を繰り返してもよい。複数のカチオン交換段階の使用によって不純物の含有量が更に減少し、同時にVIII因子の濃度が増加する。これらの利点及びその他の利点は勿論、装置の経費増加を勘案し、採算が合うように調整する。カチオン交換段階を２回以上使用する場合、各カチオン交換段階の間に中間処理段階を任意に存在させてもよい。

実施例に基づいて本発明をより詳細に以下に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されない。

実験

組換えVIII因子の調製

組換えVIIIＳＱ（ｒ－VIIIＳＱ）因子の産生を国際特許ＷＯ－Ａ－９１０９１２２の実施例１３に記載の手順にほぼ従って実施した。ＤＨＦＲ欠失ＣＨＯ細胞系（ＤＧ４４Ｎ．Ｙ．）にｒ－VIIIＳＱ遺伝子含有発現ベクターとジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子含有発現ベクターとを電気穿孔によって導入した。選択培地で選択後、段階的に増量するメトトレ

キセート中で増殖させることによって生存コロニーを増幅した。得られたコロニーの上清をVIII因子活性に基づいて個々にスクリーニングした。産生クローンを選択し、次いで、規定培地中で無血清懸濁増殖させ、最後に大規模細胞培養処理に発展させた。複数の時期に上清を採取し、以下に記載の手順で更に精製した。

実施例１

Ｔｗｉｎｎｉｎｇに従って修正されＢｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａに開示されているタンパク質分解活性の定量によって本発明の効果を確認した。選択された方法は、レゾルフィン（ｒｅｓｏｒｕｆｉｎ）標識したカゼインを用いるプロテアーゼアッセイであった。プロテアーゼで処理することによってレゾルフィン標識ペプチドがカゼインから分離する。上清中のこれらのレゾルフィン標識ペプチドの濃度が存在するタンパク質分解活性の測定値となる。試験サンプルを３７℃で、問題のサンプルに基づく長さの時間だけインキュベートした。試験全体を通じて５７４ｎｍを吸収波長として選択した。

（ヒト血清アルブミンを含有する）ならし培地を清澄化し、次いでＥＤＴＡの二ナトリウム塩を０．２３ｍＭから２３ｍＭの範囲の量で添加した。

ＥＤＴＡ添加または非添加のならし培地のプレインキュベーションを３７℃で２時間行った。基質の添加後、インキュベーションを更に１７時間行った。インキュベーション混合物のｐＨは７．５であった。

補正吸光度は、ブランク値の減算後の吸光度を示す。結果を以下に示す。

表　1

ＥＤＴＡ添加及び非添加の採取溶液中のプロテアーゼ活性

実験番号	ＥＤＴＡ mM	平均吸光度	補正値	ﾌﾟﾛﾃｱｰｾﾞ活性（％）
1	0（ﾌﾞﾗﾝｸ）	970	0	---
2	0.23	1835	865	43
3	1.2	1141	171	8
4	2.3	1069	99	5
5	11.5	994	24	1
6	23	933	-37	-2

表から明らかなように、採取溶液に錯形成剤を添加するとプロテアーゼ活性が飛躍的に減少する。実験を２回反復して得られた結果は表１に示す結果と一致した。

実施例２

（ヒト血清アルブミンを含有する）ならし培地を清澄化し、次いでイミダゾールを３．６ｍＭから３６０ｍＭの範囲の量で添加した。

プレインキュベーション、インキュベーション及び相対プロテアーゼ活性試験を実施例１に記載の手順で実施した。結果を以下の表に示す。

表　2

イミダゾール添加及び非添加の採取溶液中のプロテアーゼ活性

実験番号	ｲﾐﾀﾞｿﾞｰﾙ mM	平均吸光度	補正値	プロテアーゼ活性（%）
1	ﾌﾞﾗﾝｸ	970	0	---
2	3.6	2891	1921	95
3	18	2985	2015	100
4	36	3190	2220	110
5	180	1258	288	14
6	360	1143	173	9

表から明らかなように、採取溶液に錯形成剤を添加するとプロテアーゼ活性が飛躍的に減少する。

実施例３

（ヒト血清アルブミンを含有する）ならし培地を清澄化し、次いでヒスチジンを０．１４ｍＭから１３．６ｍＭの範囲の量で添加した。

プレインキュベーション、インキュベーション及び相対プロテアーゼ活性試験を実施例１に記載の手順で実施した。結果を以下の表に示す。

表　3

ヒスチジン添加及び非添加の採取溶液中のプロテアーゼ活性

実験番号	ヒスチジン mM	平均吸光度	補正値	ﾌﾟﾛﾃｱｰｾﾞ活性（％）
1	ﾌﾞﾗﾝｸ	970	0	---
2	0.14	2561	1591	79
3	0.7	2857	1887	94
4	1.4	3153	2183	108
5	7	1495	525	26
6	13.6	1684	714	35

表から明らかなように、採取溶液に錯形成剤を添加するとプロテアーゼ活性が飛躍的に減少する。

実施例４

連続する２つの採取物から（ヒト血清アルブミンを含有する）ならし培地を清澄化し、NH_4Acで緩衝させた。得られたｐＨ６．８の溶液の各々を、Ｐｈａｒｍａｃｉａ　ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎによって販売されているＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＦＦを含むカラムに充填した。このカチオン交換クロマトグラフィー段階を約８℃で実施した。洗浄後、０．８ＭのＮａＣｌと０．１ＭもNH_4Acとを含有する塩バッファによってVIII因子を溶出させた。洗浄用液体及び溶出用液体は採取溶液ｎｏ．２との試験中に３ｍＭのＥＤＴＡを含んでいた。比較のためにＥＤＴＡを存在させない試験（採取溶液ｎｏ．１）を実施した。プレインキュベーション、インキュベーション及び相対プロテアーゼ活性試験を、インキュベーション時間を２時間にした以外は実施例１に記載の手順で実施した。未結合のCa^{2+}イオンの濃度をイオン選択電極によって測定した。結果を以下の表に示す。

表　4

一次単離としてＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＦＦから溶出した後のプロテアーゼ活性

採取溶液番号	ＥＤＴＡ mM	平均吸光度	補正値	ﾌﾟﾛﾃｱｰｾﾞ活性（%）	未結合Ca^{2+}イオン（mM）
—	ﾌﾞﾗﾝｸ	0.041	0	---	
1	0	0.324	0.283	100	44
2	3	0.064	0.023	8	25

表から明らかなように、洗浄用液体及び溶出用液体に錯形成剤を添加するとプロテアーゼ活性が飛躍的に減少する。

実施例５

先行実施例とは異なる４つの採取物から（ヒト血清アルブミンを含有する）ならし培地を清澄化し、NH_4Acで緩衝させた。得られたｐＨ６．８の溶液の各々を、ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＦＦを含むカラムに充填した。このカチオン交換クロマトグラフィー段階を約８℃で実施した。洗浄後、０．８ＭのＮａＣｌと０．１ＭのNH_4Acとを含有する塩バッファによってVIII因子を溶出させた。洗浄用液体及び溶出用液体は３ｍＭのＥＤＴＡを含んでいた。比較のためにＥＤＴＡを存在させない試験を実施した。室温で２４時間以内の期間保存後、発色基質法Ｃｏａｔｅｓｔ（登録商標）VIII因子キット（Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｘ　ＡＢ，Ｓｗｅｄｅｎ）を使用してVIII因子のプロ凝固活性を測定した。方法の相対標準偏差（ＲＳＤ）は７％である。結果を以下の表に示す。

表　5

一次単離としてＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＦＦから溶出し次いで室温で保温した後のⅧ因子の安定性

比較実験番号	採取溶液番号	Ｓ溶出物保存時間（ｈ）	Ⅷ因子活性（％）[1] EDTA非添加調製物	3mMのEDTA添加調製物
A	1	0	100	100
	1	6	96	98
	1	24	84	100
B	2	0	100	100
	2	6	82	101
	2	24	15	98
C	3	0	100	100
	3	6	89	109
	3	24	29	109
D	4	0	100	100
	4	6	81	103
	4	24	15	102

（１）各貯蔵シリーズの０時間に対する比較

表から明らかなように、洗浄用液体及び溶出用液体に錯形成剤を添加するとVIII因子の活性を維持する可能性が飛躍的に増加する。

実施例６

先行実施例とは異なる採取物から（ヒト血清アルブミンを含有する）ならし培地を清澄化し、NH_4Acで緩衝させた。得られたｐＨ６．８の溶液を、ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＦＦを含むカラムに充填した。このカチオン交換クロマトグラフィー段階を約８℃で実施した。洗浄後、０．４ＭのＮａＣｌと０．１ＭのNH_4Acとを含有する塩バッファによってVIII因子を溶出させた。溶出後、種々の量のＥＤＴＡを得られた溶液に添加した。比較のためにＥＤＴＡを存在させない試験を実施した。室温で２６時間以内の期間保存後、実施例５に記載の手順に従ってVIII因子のプロ凝固活性を測定した。結果を以下の表に示す。

表　6

一次単離としてＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＦＦから溶出した溶液にＥＤＴＡを添加した後のⅧ因子活性の初期値に対する％

EDTA (mM)	保存時間（時） 0	2.5	5	10	24	48	72	100	246
0	100	79	55	30	1.7				
0.01	100	77	59	32	1.9				
0.03	100	76	59	33	2.1				
0.1	100	82	65	43	4.6				
0.3	100	79	71	55	11				
1.0	100	90	97	97	75	54			
3.0	100	92	102	104	100	96	80	91	72

表から明らかなように、カチオン交換樹脂から既に溶出させた溶液に錯形成剤を添加するとVIII因子の活性を維持する可能性が飛躍的に増加する。

実施例７

先行実施例とは異なる採取物から（ヒト血清アルブミンを含有する）ならし培地を清澄化し、NH_4Acで緩衝させた。得られたｐＨ６．８の溶液を、ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＦＦを含むカラムに充填した。このカチオン交換クロマトグラフィー段階を約８℃で実施した。洗浄後、０．８ＭのＮａＣｌと０．１ＭのNH_4Acとを含有する塩バッファによってVIII因子を溶出させた。溶出後、種々の量のＥＤＴＡを得られた溶液に添加した。比較のためにＥＤＴＡを存在させない試験を実施した。室温で２８時間以内の期間保存後、実施例５に記載の手順に従って、VIII因子のプロ凝固活性を測定した。結果を以下の表に示す。

表　7

一次単離としてＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＦＦから溶出した溶液にＥＤＴＡを添加した後のⅧ因子活性の初期値に対する％

ＥＤＴＡ（ｍＭ）	保存時間（時） 0	5	28
0	１００	８２	０
1	１００	１１９	６４
2	１００	１２０	１００
3	１００	１２０	９０
4	１００	１０９	１０３
5	１００	１１６	９１

表から明らかなように、カチオン交換樹脂から既に溶出させた溶液に錯形成剤を添加するとVIII因子の活性を維持する可能性が飛躍的に増加する。

実施例８

先行実施例とは異なる採取物から（ヒト血清アルブミンを含有する）ならし培地を清澄化し、NH_4Acで緩衝させた。得られた溶液を、ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＦＦを含むカラムに充填した。このカチオン交換クロマトグラフィー段階を約１０℃で実施した。洗浄後、０．８ＭのＮａＣｌと０．１ＭのNH_4Acとを含有する塩バッファによってVIII因子を溶出させた。溶出後、ＥＤＴＡまたは１，１０－フェナントロリンを得られた溶液に添加した。室温で２４時間以内の期間保存後、実施例５に記載の手順に従って、VIII因子のプロ凝固活性を測定した。結果を以下の表に示す。

表　8

一次単離としてＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＦＦから溶出した後の溶液のⅧ因子の安定性

実験番号	インキュベーション時間（時）	EDTA (mM)	フェナントロリン (mM)	Ⅷ因子活性 (IU/ml)	(%)
1	0	0	0	888	100
2	4.5	0	0	448	50
3	4.5	3	0	813	92
4	4.5	0	5	750	84
5	4.5	0	11	869	98
6	7.5	0	0	264	30
7	7.5	3	0	862	97
8	7.5	0	5	964	109
9	7.5	0	11	996	112
10	24	0	0	8	1
11	24	3	0	763	86
12	24	0	5	933	105
13	24	0	11	916	103

表から明らかなように、カチオン交換樹脂から既に溶出させた溶液に錯形成剤を添加するとVIII因子の活性を維持する可能性が飛躍的に増加する。

フロントページの続き

(72)発明者 スメツズ，アンナーリーサ
スウェーデン国、エス－１９１ ３９・スーレンチユーナ、テーイエルハクスベーゲン・４１
(72)発明者 ブランゲル，マリア
スウェーデン国、エス－１６２ ２４・ベリングビユ、エルスビイベーゲン・３０
(72)発明者 エストリーン，アンナ
スウェーデン国、エス－１１２ ６４・ストックホルム、エクネスベーゲン・２・アー

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表平０５－５０２１６１（ＪＰ，Ａ）
特表平０５－５０７４２０（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９４／００７５１０（WO，Ａ１）
特開平０４－２４３８９９（ＪＰ，Ａ）
特開平０１－１５７９１７（ＪＰ，Ａ）
特開平０１－１４９７３３（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９３／０２２３３６（WO，Ａ１）
国際公開第９３／０２２３３７（WO，Ａ１）
欧州特許出願公開第００４１１８１０（ＥＰ，Ａ１）
米国特許第０４７１０３８１（ＵＳ，Ａ）
特開昭５６－１５００１９（ＪＰ，Ａ）
特表平０９－５００６２４（ＪＰ，Ａ）
特表平１０－５０１５２２（ＪＰ，Ａ）
米国特許第５１４９７８７（ＵＳ，Ａ）
国際公開第９３／１０１４３（WO，Ａ１）
国際公開第９０／０２１７５（WO，Ａ１）
国際公開第９３／２４１３７（WO，Ａ１）
特開平５－２６８９６８（ＪＰ，Ａ）
特表平８－５０９７４５（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
CA(STN)
REGISTRY(STN)