(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6791842号
(P6791842)
(45)発行日　令和2年11月25日(2020.11.25)　(24)登録日　令和2年11月9日(2020.11.9)

(51)Int.Cl.　　F I
C07K 14/745 (2006.01)　C07K 14/745
C12N 9/64 (2006.01)　C12N 9/64　Z
C07K 1/18 (2006.01)　C07K 1/18

請求項の数 26　(全 18 頁)

(21)出願番号　特願2017-507847(P2017-507847)
(86)(22)出願日　平成27年8月12日(2015.8.12)
(65)公表番号　特表2017-526669(P2017-526669A)
(43)公表日　平成29年9月14日(2017.9.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/044863
(87)国際公開番号　WO2016/025601
(87)国際公開日　平成28年2月18日(2016.2.18)
審査請求日　平成30年8月13日(2018.8.13)
(31)優先権主張番号　62/036,402
(32)優先日　平成26年8月12日(2014.8.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者　315010787
バクスアルタ　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　６００１５　イリノイ州、バンノックバーン、レイクサイド　ドライブ　１２００
(73)特許権者　515351758
バクスアルタ　ゲーエムベーハー
スイス連邦　８１５２　グラットパーク（オプフィコン），トゥーアガウアーシュトラーセ　１３０
(74)代理人　100114775
弁理士　高岡　亮一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】第Ｘ因子の活性化

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
凝固第Ｘ因子（ＦＸ）を活性化する方法であって、
ａ）少なくとも１０時間の接触期間の間、カルシウムイオンの存在下で陰イオン交換物質と単離されたＦＸを含む水溶液とを接触させて、前記ＦＸを前記陰イオン交換物質に結合させることと、
ここで、前記ＦＸは、哺乳動物の血漿または組織培養系の細胞上清から単離されたものであり、
ｂ）カルシウムイオンを含む溶出バッファーを用いて、前記陰イオン交換物質から活性化ＦＸ（ＦＸａ）を溶出することと
を含む、方法。
【請求項２】
前記接触期間が少なくとも２０時間である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ａ）の結合条件が、８ｍＳ／ｃｍ以下の伝導率を含む、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記ａ）の結合条件が、ｐＨが８～１０であることを含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】

前記ＦＸを、陰イオン交換物質１ｍＬあたり０．５ｍｇ超で充填する、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６】

前記ａ）の接触ステップおよび前記ｂ）の溶出ステップを８℃超の温度で行う、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７】

前記溶出バッファーが、対アニオンをさらに含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項８】

前記対アニオンが、塩素イオン、酢酸イオン、または硫酸イオンのうちの少なくとも１つである、請求項７に記載の方法。

【請求項９】

前記溶出バッファー中のカルシウムイオンまたは対アニオンまたはその両方の濃度が経時的に増加する、請求項７または８に記載の方法。

【請求項１０】

前記カルシウムイオンの濃度が、１ｍＭから１００ｍＭに増加する、請求項９に記載の方法。

【請求項１１】

前記カルシウムイオンの濃度が、１ｍＭから１０ｍＭに増加する、請求項９に記載の方法。

【請求項１２】

前記対アニオンの濃度が、１ｍＭから１０００ｍＭに増加する、請求項９～１１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１３】

前記対アニオンの濃度が、９ｍＭから２００ｍＭに増加する、請求項９～１１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１４】

前記溶出バッファーが、２５℃で１～１００ｍＳ／ｃｍの伝導率を有する、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１５】

前記溶出バッファーが、２５℃で１０～９０ｍＳ／ｃｍの伝導率を有する、請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１６】

前記溶出バッファーが、２５℃で２０～８０ｍＳ／ｃｍの伝導率を有する、請求項１～１５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１７】

前記溶出バッファーが、２５℃で３０～７０ｍＳ／ｃｍの伝導率を有する、請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１８】

前記溶出バッファーが、２５℃で４０～６０ｍＳ／ｃｍの伝導率を有する、請求項１～１７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１９】

前記溶出バッファーが、２５℃で５０～６０ｍＳ／ｃｍの伝導率を有する、請求項１～１８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２０】

エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）の存在下で、前記ＦＸを含む水溶液を前記陰イオン交換物質と接触させる、請求項１～１９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２１】

前記対アニオンの濃度が、１ｍＭから少なくとも５００ｍＭに増加する、請求項９～１１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２２】
前記対アニオンの濃度が、１ｍＭから少なくとも８００ｍＭに増加する、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記陰イオン交換物質が、第四級アンモニウム［Ｑ］、ジエチルアミノエチル［ＤＥＡＥ］、ジエチルアミノプロピル［ＡＮＸ］、または第一級アミンのうちの少なくとも１つを含むリガンドを含む、請求項１～２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２４】
前記陰イオン交換物質が、ポリスチレン、ポリメタクリル酸メチル（ｐｏｌｙｍｅｔｈｙｌｍｅｔａａｃｒｙｌａｔｅ）、ポリビニルベンゼン、ポリビニルピリジン、架橋ポリ（スチレン－ジビニルベンゼン）、セファロース、および架橋アガロースのうちの少なくとも１つに由来するマトリックスを含む、請求項１～２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２５】
前記哺乳動物の血漿または前記組織培養系の細胞上清から前記ＦＸを単離して水溶液を作製することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２６】
前記ＦＸが、前記哺乳動物の血漿または前記組織培養系の細胞上清から沈殿、限外ろ過、またはクロマトグラフィーによって単離される、請求項２５に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
凝固第Ｘ因子は、ＦＸ、Ｆ１０、スチュアート-プラウアー因子という名称、およびトロンボキナーゼとしても知られている、トロンビンを活性化するビタミンＫ依存性の血漿プロテアーゼである。ＦＸは、まず単鎖の前駆体として肝臓で合成され、内因系経路および外因系経路の両方により活性化され、ジスルフィド結合で結合した軽鎖および重鎖からなる活性化ＦＸ（ＦＸａ）を形成する。この軽鎖はγ－カルボキシグルタミン酸（Ｇｌａ）ドメインおよび２つの上皮増殖因子様（ＥＧＦ様）ドメインを含み、重鎖はセリンプロテアーゼドメインに対応する。ＦＸａは、プロトロンビン複合体濃縮製剤の作用に寄与しており、ファイバ（ＦＥＩＢＡ：第ＶＩＩＩ因子バイパス活性（ｆａｃｔｏｒ　ｅｉｇｈｔ　ｂｙｐａｓｓｉｎｇ　ａｃｔｉｖｉｔｙ））の活性成分として同定されている。ＦＥＩＢＡは、ＦＶＩＩＩまたはＦＩＸに対する阻害抗体を発達させる血友病患者を治療するために使用することができる。
【０００２】
ＦＸは、ヒトの血漿から精製でき、または組み換え技術を使用して生成できるが、活性化状態（ＦＸａ）でのみ血液凝固プロセスに影響を与える。この活性化は、ＦＸの重鎖のＡｒｇ５２－Ｉｌｅ５３ペプチド結合の切断からもたらされ、これにより活性化ペプチドが放出される。ＦＸの活性化の標準的な方法は、典型的には、プロテアーゼなどの外因性の薬剤を使用する。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００３】
本明細書中開示される態様は、外因性の薬剤を添加することなく第Ｘ因子（ＦＸ）を活性化する方法を含む。一実施形態では、クロマトグラフィーの樹脂とＦＸの結合を介して、ＦＸを活性化する。
【０００４】
さらなる態様は、ＦＸを活性化するシステムを含む。一実施形態では、このシステムは、液体培地中のＦＸおよび陰イオン交換クロマトグラフィーの樹脂を含む。一実施形態では、液体培地は水性である。
【０００５】
態様は、クロマトグラフィーの樹脂上にＦＸを充填するステップを開始してから２時間

後に活性化ＦＸを溶出することを含む。
【０００６】
態様は、クロマトグラフィーの樹脂上にＦＸを充填するステップを開始してから５時間後に活性化ＦＸを溶出することを含む。
【０００７】
態様は、クロマトグラフィーの樹脂上にＦＸを充填するステップを開始してから１０時間後に活性化ＦＸを溶出することを含む。
【０００８】
態様は、クロマトグラフィーの樹脂上にＦＸを充填するステップを開始してから２０時間後に活性化ＦＸを溶出することを含む。
【０００９】
本明細書中開示されるさらなる態様は、８ｍＳ／ｃｍ以下の伝導率でＦＸを結合させることを含む。
【００１０】
本明細書中開示されるさらなる態様は、ｐＨ８～１０でＦＸを結合させることを含む。
【００１１】
本明細書中開示されるさらなる態様は、陰イオン交換樹脂１ｍＬあたり０．５ｍｇ超でＦＸを充填することを含む。特定の態様では、結合ステップおよび溶出ステップを、８℃超の温度で行う。
【００１２】
本明細書中開示される方法は、二価の陽イオンまたは対イオンを含む溶出バッファーを含む。特定の方法では、対イオンは、塩素イオン、酢酸イオン、クエン酸イオン、硫酸イオン、またはリン酸イオンのうちの少なくとも１つである。本明細書中開示される特定の方法では、溶出バッファー中の二価の陽イオンまたは対イオンまたはその両方の濃度が経時的に増加する。
【００１３】
本明細中開示される態様は、２５℃で１～１００ｍＳ／ｃｍの伝導率の溶出バッファーを含む。さらなる態様は、第四級アンモニウム［Ｑ］、ジエチルアミノエチル［ＤＥＡＥ］、ジエチルアミノプロピル［ＡＮＸ］、または第一級アミンのうちの少なくとも１つであるイオン交換リガンドを含む。さらなる態様は、ポリスチレン、ポリメタクリル酸メチル（ｐｏｌｙｍｅｔｈｙｌｍｅｔａａｃｒｙｌａｔｅ）、ポリビニルベンゼン、ポリビニルピリジン、架橋ポリ（スチレン－ジビニルベンゼン）、セファロース、および架橋アガロースのうちの少なくとも１つに由来するマトリックスであるイオン交換物質を含む。特定の態様では、イオン交換物質は陰イオン交換物質である。
【００１４】
実施形態では、イオン交換物質は、ＰＯＲＯＳ（登録商標）５０ＨＱ（第四級化ポリエチレンイミン（ｐｏｌｙｅｔｈｅｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ）官能基に基づく強力な陰イオン交換担体；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＰＩ（ポリエチレンイミン官能基に基づく弱い陰イオン交換担体；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＰＯＲＯＳ（登録商標）Ｄ（弱い陰イオン交換担体；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、Ｑ　ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）ＦＦ（Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ、第四級アンモニウムの強力な陰イオン交換基を伴う６％の架橋アガロースビーズ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、Ｑ　ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）ＨＰ（第四級の強力な陰イオン交換基で修飾した平均直径３４μｍの架橋アガロースビーズ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＥＳＨＭＵＮＯ（登録商標）Ｑ（強固な表面グラフトポリビニルエーテル親水性ポリマーに架橋したトリメチルアンモニウムメチル官能基を含む強力な陰イオン交換体、Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）、ＦＲＡＣＴＯＧＥＬ（登録商標）ＴＭＡＥ（トリメチルアンモニウムメチル官能基を含むメタクリレートベースのポリマー性ビーズの強力な陰イオン交換体合成物質、ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）、ＦＲＡＣＴＯＧＥＬ（登録商標

）ＥＭＤ　ＤＥＡＥ（ＤＥＡＥ官能基を含むメタクリレートベースのポリマー性ビーズの弱い陰イオン交換体合成物質、ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）、ＦＲＡＣＴＯＧＥＬ（登録商標）ＥＭＤ　ＤＭＡＥ（ジメチルアミノエタノール官能基を含むメタクリレートベースのポリマー性ビーズの弱い陰イオン交換体合成物質、ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）、Ｑ　Ｃｅｒａｍｉｃ　ＨＹＰＥＲＤ（登録商標）Ｆ（第四級アンモニウム官能基を含む強固なセラミック性ビーズのｇｉｇａｐｏｒｅの中で重合化された高性能のハイドロゲル、Ｐａｌｌ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）、ＭＵＳＴＡＮＧ（登録商標）Ｑ（孔径０．８ミクロンの膜上の架橋ポリマーコーティングにおけるペンダント第四級アミン官能基を含む陰イオン交換担体、Ｐａｌｌ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）、ＤＥＡＥ　ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＤＥＡＥの弱い陰イオン交換基を含む６％の架橋アガロースビーズ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＡＮＸ　ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）４　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（弱い陰イオン交換第三級アミン基を含む高度に架橋した４％のアガロース誘導体、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、Ｑ　ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）ＸＬ（デキストラン鎖がアガロースマトリックスと共有結合しており、第四級アンモニウムの強力な陰イオン交換基で修飾された、高度に架橋したビーズ形態の６％のアガロースマトリックス、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、Ｑ　ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）ｂｉｇ　ｂｅａｄｓ（強力なスルホン酸陽イオン交換基で修飾した架橋アガロースビーズ（１００～３００μｍ）、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＤＥＡＥ　ＳＥＰＨＡＤＥＸ（登録商標）（ＤＥＡＥ官能基を含む架橋デキストランマトリックスの弱い陰イオン交換体、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＱＡＥ　ＳＥＰＨＡＤＥＸ（登録商標）（ジエチル－（２－ヒドロキシ－プロピル）アミノエチル官能基を含む架橋デキストランマトリックスの強力な陰イオン交換体、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＳＯＵＲＣＥ（商標）１５Ｑ（第四級アンモニウム官能基で修飾した１５μｍの単一粒径の強固なポリスチレン／ジビニルベンゼンポリマーマトリックスに基づく強力な陰イオン交換体、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、Ｓｏｕｒｃｅ　３０Ｑ（第四級アンモニウム官能基で修飾した３０μｍの単一粒径の強固なポリスチレン／ジビニルベンゼンポリマーマトリックスに基づく強力な陰イオン交換体、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、Ｃａｐｔｏ　Ｑ（デキストラン表面増量剤（ｄｅｘｔｒａｎ　ｓｕｒｆａｃｅ　ｅｘｔｅｎｄｅｒ）および強力な第四級アンモニウム陰イオン交換体で修飾した強固なｈｉｇｈ－ｆｌｏｗアガロースのマトリックス、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、Ｃａｐｔｏ　ＤＥＡＥ（デキストラン表面増量剤および弱いＤＥＡＥ陰イオン交換体で修飾した強固なｈｉｇｈ－ｆｌｏｗアガロースのマトリックス、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、Ｍｏｎｏ　Ｑ（強力な第四級アンモニウム陰イオン交換体に結合したモノビーズの強力な陰イオン交換体、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ（登録商標）Ｓｕｐｅｒ　Ｑ（強力な陰イオン交換体官能基を含むヒドロキシル化メタクリレートポリマー樹脂、Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ（登録商標）ＤＥＡＥ（弱い陰イオン交換体官能基を含むヒドロキシル化メタクリレートポリマー樹脂、Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ（登録商標）ＱＡＥ（強力な陰イオン交換体官能基を含むヒドロキシル化メタクリレートポリマー樹脂、Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ（登録商標）Ｑ（強力な陰イオン交換体官能基を含むヒドロキシル化メタクリレートポリマー樹脂、Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ（登録商標）ＧｉｇａＣａｐ　Ｑ（強力な陰イオン交換体官能基を含むより多くの陰イオン性結合部位を提供するよう修飾されたヒドロキシル化メタクリレートポリマー樹脂、Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＴＳＫｇｅｌ（登録商標）ＳｕｐｅｒＱ（強力な陰イオン交換体官能基を含む高度の架橋を伴うヒドロキシル化メタクリレートポリマー樹脂、Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＴＳＫｇｅｌ（登録商標）ＤＥＡＥ（弱い陰イオン交換体官能基を含む高度の架橋を

伴うヒドロキシル化メタクリレートポリマー樹脂、Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＭＡＣＲＯＰＲＥＰ（登録商標）Ｈｉｇｈ　Ｑ（第四級アミン官能基に結合したメタクリレートコポリマービーズを含む強力な陰イオン交換樹脂、Ｂｉｏ－Ｒａｄ）、ＭＡＣＲＯＰＲＥＰ（登録商標）ＤＥＡＥ（ＤＥＡＥ官能基に結合したメタクリレートコポリマービーズを含む弱い陰イオン交換樹脂、Ｂｉｏ－Ｒａｄ）、ＵＮＯＳＰＨＥＲＥ（商標）Ｑ（第四級アミン官能基に結合した親水性ポリマー担体を含む強力な陰イオン交換樹脂、Ｂｉｏ－Ｒａｄ）、およびＮＵＶＩＡ（商標）Ｑ（第四級アミン官能基に結合した表面増量剤を含む親水性ポリマー担体を含む強力な陰イオン交換樹脂、Ｂｉｏ－Ｒａｄ）のうちの少なくとも１つを含む。

【図面の簡単な説明】

【００１５】

【図１】ＦＸ試料のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示す。活性化のための組み換え（ｒＦＸ）出発物質（レーン「ｒＦＸ」）、活性化ステップ後のｒＦＸａ（活性化組み換えＦＸ）を含む試料番号１－４および１－８（レーン「ｒＦＸ＋ｒＦＸａ　＃１－４」および「ｒＦＸ＋ｒＦＸａ　＃１－８」）、ならびに血漿由来（ｐｄ）のＦＸａ（レーン「ｐｄＦＸａ」）が示されている。電気泳動の後、クーマシー染色によりタンパク質のバンドを可視化させた。最も左のレーンには、分子量マーカーが示されている。ＦＸおよびＦＸａに対応するバンドがマークされている。

【発明を実施するための形態】

【００１６】

本明細書中開示される様々な実施形態は、ＦＸの生成、精製、保存、および活性化の方法を含む。特定の実施形態では、ＦＸは、外因性の薬剤を添加することなく活性化することができる。たとえば、接触期間の間ＦＸをクロマトグラフィー物質に結合させてＦＸを活性化させることができる。一実施形態では、ＦＸは、イオン交換樹脂に結合することができる。結合の後、ＦＸを活性化させてＦＸａを生成し、次に樹脂から溶出することができる。

【００１７】

この明細書にわたり、整数は便宜上使用されており、限定を意図するものではない。たとえば「ｐＨ４」は、限定するものではないが、３．８、３．９、４．１、４．２などの４に近いｐＨを含むことができる。用語「約」は、これらの固有の小さな範囲およびすべての整数からの偏差が本明細書中記載および請求される実施形態の一部と考慮されることを示すために使用されている。ある範囲が使用される場合、たとえば限定を意図するものではないが約１０～１５ｍＳ／ｃｍには、介在する値に関連するすべての端数が含まれている。

【００１８】

ＦＸの生成

【００１９】

特定の実施形態では、ＦＸは、哺乳類のＦＸ、たとえば野生型のＦＸまたはＦＸの保存的変異体などのＦＸ変異体を含むことができる。保存的変異体は、例示的な参照ペプチド由来の本来のアミノ酸と類似する少なくとも１つの特性を有する別のアミノ酸もしくはアミノ酸類似体により置換された少なくとも１つのアミノ酸を有するタンパク質またはポリペプチドを表す。特性の例として、限定するものではないが、類似する大きさ、トポグラフィー、電荷、疎水性、親水性、親油性、共有結合の性質、水素結合の性質、物理化学的な特性など、またはそれらの組み合わせが挙げられる。保存的置換は、たとえば置換されたアミノ酸の物理的な特性（表１）、または本来のアミノ酸がどの程度置換を容認するか（表２）などの様々な要因により評価することができる（表１および２では、ＩＵＰＡＣアミノ酸コードが使用されている）。本明細書中開示されるペプチドにおいてどのアミノ酸を、別のアミノ酸と置換できるかの選択は、当業者に知られている。保存的変異体は、例示的な参照タンパク質またはポリペプチドと実質的に同一の様式で機能でき、本明細書のいずれかの態様の例示的な参照タンパク質またはポリペプチドと置換することができる

。

【表１】

表１：アミノ酸の特性	
特性	アミノ酸
脂肪族	G, A, I, L, M, P, V
芳香族	F, H, W, Y
C-β分枝鎖状	I, V, T
疎水性	C, F, I, L, M, V, W
わずかに極性	D, N, P
わずかに非極性	A, C, G, S, T
著しく極性	E, H, K, Q, R, W, Y
著しく非極性	F, I, L, M, V
荷電性	D, E, H, K, R
非荷電性	C, S, T
負	D, E
正	H, K, R
酸性	D, E
塩基性	K, R
アミド	N, Q

【表２】

表２：アミノ酸の置換			
アミノ酸	好ましい置換	どちらでもない置換	好ましくない置換
A	G, S, T	C, E, I, K, M, L, P, Q, R, V	D, F, H, N, Y, W
C	F, S, Y, W	A, H, I, M, L, T, V	D, E, G, K, N, P, Q, R
D	E, N	G, H, K, P, Q, R, S, T	A, C, I, L,
E	D, K, Q	A, H, N, P, R, S, T	C, F, G, I, L, M, V, W, Y
F	M, L, W, Y	C, I, V	A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T
G	A, S	D, K, N, P, Q, R	C, E, F, H, I, L, M, T, V, W, Y
H	N, Y	C, D, E, K, Q, R, S, T, W	A, F, G, I, L, M, P, V
I	V, L, M	A, C, T, F, Y	D, E, G, H, K, N, P, Q, R,

表２：アミノ酸の置換			
アミノ酸	好ましい置換	どちらでもない置換	好ましくない置換

			S, W
K	Q, E, R	A, D, G, H, M, N, P, S, T	C, F, I, L, V, W, Y
L	F, I, M, V	A, C, W, Y	D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T
M	F, I, L, V	A, C, R, Q, K, T, W, Y	D, E, G, H, N, P, S
N	D, H, S	E, G, K, Q, R, T	A, C, F, I, L, M, P, V, W, Y
P	---	A, D, E, G, K, Q, R, S, T	C, F, H, I, L, M, N, V, W, Y
Q	E, K, R	A, D, G, H, M, N, P, S, T	C, F, I, L, V, W, Y
R	K, Q	A, D, E, G, H, M, N, P, S, T	C, F, I, L, V, W, Y
S	A, N, T	C, D, E, G, H, K, P, Q, R, T	F, I, L, M, V, W, Y
T	S	A, C, D, E, H, I, K, M, N, P, Q, R, V	F, G, L, W, Y
V	I, L, M	A, C, F, T, Y	D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, W
W	F, Y	H, L, M	A, C, D, E, G, I, K, N, P, Q, R, S, T, V
Y	F, H, W	C, I, L, M, V	A, D, E, G, K, N, P, Q, R, S, T

Matthew J. Betts and Robert, B. Russell, Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions, pp. 289-316, In Bioinformatics for Geneticists, (Michael R. Barnes, Ian C. Gray, Wiley, 2003).

【００２０】

様々な実施形態では、ＦＸは、ヒトの血漿などの血漿から単離することができ、または、たとえばヒトの細胞（ＨＥＫ２９３細胞など）もしくはベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ細胞）もしくはチャイニーズハムスター卵巣（細胞）（ＣＨＯ細胞）を含む哺乳類の

組織培養系から組み換え技術を使用して生成することができる。たとえばヒトのＦＸをコードするｃＤＮＡおよび抗体物質選択のためのネオマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドベクターを使用して、ＣＨＯ細胞において組み換えＦＸ（ｒＦＸ）を発現する細胞株を発達させることができる。次に、ｒＦＸ産生細胞のクローンを、限界希釈クローニングにより単離することができる。特定の実施形態は、ＶＫＯＲまたはフューリンなどの「ヘルパー」タンパク質を含むことができる。本明細書中開示される特定の実施形態は、昆虫細胞の発現系、たとえばバキュロウイルスに感染した昆虫細胞の発現系を含むことができる。実施形態は、酵母細胞系における組み換えＦＸの発現を含むことができる。一部の実施形態では、ＦＸは、「タグ化」タンパク質、たとえばＣ末端にポリヒスチジンタグを含むタグ化タンパク質として発現することができる。一部の実施形態では、産生されたＦＸは、組織培養系の細胞上清に存在することができる。

【００２１】

ＦＸの精製／単離

【００２２】

様々な実施形態では、ＦＸは、沈殿、限外ろ過、クロマトグラフィーなどを含む多くの技術を使用して、哺乳類の血漿または組織培養物の細胞上清から単離または精製することができる。たとえば、ＦＸは、アフィニティクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、またはゲルろ過クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー法を使用して精製することができる。特定の実施形態では、イオン交換クロマトグラフィー法は、強力な陰イオン交換樹脂、弱い陰イオン交換樹脂、強力な陽イオン交換樹脂、弱い陽イオン交換樹脂などを含むことができる。たとえば陰イオン交換樹脂は、Ｑ－ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）（Ｇ．Ｅ．　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ（ミシガン州ケントウッド）の登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗなどとすることができる。

【００２３】

特定の実施形態では、精製または部分的に精製したＦＸは、Ｑ－ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）の陰イオン交換クロマトグラフィーカラムに充填することができる。適切なクロマトグラフィーの樹脂は、樹脂がフラスコまたは容器などのレセプタクルに含まれている「バッチ」技術にも利用することもできる。

【００２４】

特定の実施形態では、精製後（活性化の前）にＦＸを保存することができる。

【００２５】

ＦＸの乾燥保存を含む特定の実施形態では、活性化ステップの前にＦＸを再懸濁することができる。

【００２６】

実施形態では、いずれかの適切な形態のＦＸ、たとえば単離または精製したＦＸを、本明細書中記載の方法により活性化することができる。

【００２７】

ＦＸａの生成

【００２８】

溶出の後に、精製または部分的に精製したＦＸを、クロマトグラフィー用の樹脂、たとえばイオン交換樹脂に充填することができる。一実施形態では、ローディングバッファーを使用して、陰イオン交換樹脂、たとえば強力な陰イオン交換樹脂の上に精製したＦＸを充填することができる。一実施形態では、この強力な陰イオン交換樹脂は、Ｑ－ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗである。特定の実施形態では、この充填は陰イオン交換樹脂へＦＸを結合させることができる。特定の実施形態では、ローディングバッファーのｐＨは、たとえば、６、７、８、９、１０、１１、またはそれ以上などとすることができる。一部の実施形態では、ローディングバッファーのｐＨは、たとえば６～９、または７～８などとすることができる。一実施形態では、ローディングバッファーのｐＨは、２５℃で８である。

【００２９】
一部の実施形態では、充填ステップは、１～１０ｍＳ／ｃｍ、または２～８ｍＳ／ｃｍ、または３～６ｍＳ／ｃｍなどの伝導率を有するローディングバッファーでクロマトグラフィーの樹脂を平衡化することを含むことができる。特定の実施形態では、ローディングバッファーの伝導率は、たとえば４ｍＳ／ｃｍ、または５ｍＳ／ｃｍ、または６ｍＳ／ｃｍ、または７ｍＳ／ｃｍ、または８ｍＳ／ｃｍ、または９ｍＳ／ｃｍ、または１０ｍＳ／ｃｍ、または１１ｍＳ／ｃｍ、または１２ｍＳ／ｃｍなどとすることができる。一実施形態では、ローディングバッファーの伝導率は、２５℃で７ｍＳ／ｃｍである。
【００３０】
特定の実施形態では、ローディングバッファーは二価の陽イオンを含むことができる。実施形態では、二価の陽イオンは、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}などとすることができる。特定の実施形態では、バッファー中の二価の陽イオンの濃度は、１～５０ｍＭ、または２～４０ｍＭ、または３～３０ｍＭ、または４～２０ｍＭ、または５～１５ｍＭ、または１０～１２ｍＭなどとすることができる。実施形態では、バッファー中の二価の陽イオンの濃度は、５ｍＭ、または６ｍＭ、または７ｍＭ、または８ｍＭ、または９ｍＭ、または１０ｍＭ、または１１ｍＭ、または１２ｍＭ、または１３ｍＭ、または１４ｍＭ、または１５ｍＭなどとすることができる。一実施形態では、ローディングバッファーは、２．５ｍＭの濃度のCa^{2+}を含む。特定の実施形態では、目的とした樹脂の充填は、５～２５ｍｇＦＸ／ｍＬ樹脂、または１０～２０ｍｇ／ｍＬ、または１５～１８ｍｇ／ｍＬ、または１４～１６ｍｇ／ｍＬである。実施形態では、目的とした樹脂の充填は、０、１～５ｍｇ／ｍＬ、または０．５～２ｍｇ／ｍＬである。実施形態では、目的とした樹脂の充填は、０．１～１ｍｇ／ｍＬ、たとえば０．５ｍｇ／ｍＬである。
【００３１】
一部の実施形態では、充填ステップの後に、結合したＦＸを、ｐＨ約８の洗浄バッファーで洗浄する。この洗浄ステップは、複数のカラム容量（ＣＶ）の洗浄バッファー、たとえば２、３、４、５、６、７、８、９、または１０ＣＶの洗浄バッファーを含むことができる。特定の実施形態では、洗浄バッファーの伝導率は、たとえば１ｍＳ／ｃｍ、または２ｍＳ／ｃｍ、または３ｍＳ／ｃｍ、または４ｍＳ／ｃｍ、または５ｍＳ／ｃｍ、または６ｍＳ／ｃｍ、または７ｍＳ／ｃｍ、または８ｍＳ／ｃｍ、または９ｍＳ／ｃｍなどとすることができる。
【００３２】
一実施形態では、洗浄バッファーの伝導率は、２５℃で４ｍＳ／ｃｍとすることができる。特定の実施形態では、洗浄バッファーの伝導率は、たとえば０．５ｍＳ／ｃｍ～７ｍＳ／ｃｍ、または１ｍＳ／ｃｍ～６ｍＳ／ｃｍ、または２ｍＳ／ｃｍ～５ｍＳ／ｃｍ、または３ｍＳ／ｃｍ～４ｍＳ／ｃｍなどとすることができる。
【００３３】
様々な実施形態では、洗浄バッファーは二価の陽イオンを含むことができる。一部の実施形態では、二価の陽イオンは、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}などとすることができる。実施形態では、洗浄バッファー中の二価の陽イオンの濃度は、０．１～５０ｍＭ、または０．２～４０ｍＭ、または０．３～３０ｍＭ、または０．４～２０ｍＭ、または０．５～１５ｍＭ、または１～１２ｍＭなどとすることができる。実施形態では、洗浄バッファー（ｗａｓ　ｂｕｆｆｅｒ）中の二価の陽イオンの濃度は、０．５ｍＭ、または０．６ｍＭ、または０．７ｍＭ、または０．８ｍＭ、または０．９ｍＭ、または１ｍＭ、または１．１ｍＭ、または１．２ｍＭ、または１．３ｍＭ、または１．４ｍＭ、または１．５ｍＭなどとすることができる。一実施形態では、洗浄バッファーは、１ｍＭの濃度のCa^{2+}を含むことができる。
【００３４】
洗浄ステップの後、ＦＸは、接触期間の間、クロマトグラフィー樹脂に結合したままとすることができる。特定の実施形態では、接触期間の間、ＦＸは自己活性化し、ＦＸａを生成する。一部の実施形態では、接触期間は、少なくとも１時間、または少なくとも２時

間、または少なくとも３時間、または少なくとも４時間、または少なくとも５時間、または少なくとも６時間、または少なくとも７時間、または少なくとも８時間、または少なくとも９時間、または少なくとも１０時間、または少なくとも１１時間、または少なくとも１２時間、または少なくとも１３時間、または少なくとも１４時間、または少なくとも１５時間、または少なくとも１６時間、または少なくとも１７時間、または少なくとも１８時間、または少なくとも１９時間、または少なくとも２０時間、または少なくとも２１時間、または少なくとも２２時間、または少なくとも２３時間、または少なくとも２４時間、または少なくとも２５時間、または少なくとも２６時間、またはそれ以上などとすることができる。特定の実施形態では、接触期間は、１～５時間、または２～６時間、または３～７時間、または４～８時間、または５～９時間、または６～１０時間、または７～１１時間、または８～１２時間、または９～１３時間、または１０～１４時間、または１１～１５時間、または１２～１６時間、または１３～１７時間、または１４～１８時間、または１５～１９時間、または１６～２０時間、または１７～２１時間、または１８～２２時間、または１９～２３時間、または２０～２４時間などとすることができる。

【００３５】

接触期間の後、溶出バッファーを使用して、ＦＸａをカラムから溶出することができる。特定の実施形態では、溶出バッファーは、二価の陽イオン、または対イオン、またはその両方を含むことができる。特定の実施形態では、二価の陽イオンは、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}などとすることができる。実施形態では、対イオンは、たとえば塩素イオン、または酢酸イオン、または硫酸イオン、またはリン酸イオンなどとすることができる。一部の実施形態では、溶出バッファー中の二価の陽イオンまたは対イオンの濃度は、経時的に変化し得、たとえばこの濃度は経時的に増加し得る。たとえば一部の実施形態では、二価の陽イオンの濃度は、一定してまたは段階的に、１から４０ｍＭ、または１から３０ｍＭ、または１から２０ｍＭ、または１から１５ｍＭ、または１から１０ｍＭ、または１から９ｍＭ、または１から８ｍＭ、または１から７ｍＭ、または１から６ｍＭ、または１から５ｍＭなどに増加し得る。一実施形態では、二価の陽イオンの濃度は、１から１０ｍＭに段階的に増加し得る。特定の実施形態では、対イオンの濃度は、一定してまたは段階的に、１から３００ｍＭ、または２から２８０ｍＭ、または３から２６０ｍＭ、または４から２４０ｍＭ、または６から２３０ｍＭ、または７から２２０ｍＭ、または８から２１５ｍＭ、または９から２００ｍＭ、または１０から１８０ｍＭ、または１１から１６０ｍＭ、または１２から１４０ｍＭ、または１３から１２０ｍＭ、または１４から１００ｍＭ、または１５から８０ｍＭ、または１６から６０ｍＭ、または１７から４０ｍＭ、または２０から３０ｍＭなどに増加し得る。一実施形態では、対イオンの濃度は、９から２００ｍＭに段階的に増加し得る。実施形態では、溶出バッファーのｐＨは、たとえば６、７、８、９、１０、またはそれ以上などとすることができる。一実施形態では、溶出バッファーのｐＨは８とすることができる。一部の実施形態では、溶出バッファーは、２５℃で１０～１００ｍＳ／ｃｍ、または２０～９０ｍＳ／ｃｍ、または３０～８０ｍＳ／ｃｍ、または４０～７０ｍＳ／ｃｍ、または５０～６０ｍＳ／ｃｍなどの伝導率を有することができる。一実施形態では、溶出バッファーは、５０～６０ｍＳ／ｃｍの伝導率を有する。溶出したＦＸａは分画に回収することができ、ＦＸａの存在および活性に関して試験することができる。

【００３６】

特定の実施形態では、本明細書中開示される方法は８℃～３０℃で行われるが、特定の開示される実施形態は、他の温度で行うことができる。一実施形態では、本明細書中開示される方法は、８℃超、たとえば２２℃～２５℃、２０℃～２５°Ｃ、１８℃～２２℃、１６℃～２５℃、２０℃～２５℃などの温度で行われる。

【００３７】

本明細書中開示される特定の実施形態は、クロマトグラフィーの樹脂に結合した酵素の使用を特に除外する。

【００３８】

本明細書中開示される特定の実施形態は、活性化工程における外来性酵素の添加を特に除外する。

【００３９】

ＦＸａ

【００４０】

本明細書中開示される実施形態は、活性化ＦＸ、たとえば本明細書中開示される工程により作製されたＦＸａを含むものである。

【００４１】

実施例

以下の非限定的な実施例は、代表的な実施形態のより完全な理解を容易にするためにのみ例示として提供されている。これらの実施形態は、本明細書中記載される実施形態を限定するように解釈すべきではない。

【００４２】

実施例１

ヒトのＦＸをコードするｃＤＮＡおよび抗生物質の選択のためのネオマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドベクターを使用して、組み換え第Ｘ因子（ｒＦＸ）発現細胞株を、ＣＨＯ－Ｓ細胞株において発達させた。ｒＦＸ産生細胞のクローンを、限界希釈クローニングにより単離し、エンドペプチダーゼのフューリンをコードするベクターでトランスフェクトした。フューリンによりトランスフェクトしたｒＦＸを産生する細胞を、２回クローニングした。産生株のクローンを、増殖パラメーター、ならびに外因性テナーゼおよびラッセル蛇毒（ＲＶＶ）による活性化の後の高活性のｒＦＸの生産性に基づき選択し、ＦＸ欠損血漿の凝固アッセイ（プロトロンビン時間（ＰＴ）凝固アッセイ）における外因性経路により活性化した。ＦＸａに特異的な発色アッセイにより不純物を測定することにより、ならびに低カルボキシル化ｒＦＸ、未処理のｒＦＸ形態（単鎖またはプロペプチド含有）、および分解産物に関するドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）により、タンパク質の質を検証した。すべての質の基準と一致したクローンを使用して、市販のＰＯＷＥＲＣＨＯ（商標）（Ｌｏｎｚａ　Ｇｒｏｕｐ（スイスバーゼル）の商標）培地中１０ＬのバイオリアクターでｒＦＸを生成し、培養槽から出る流れを回収することにより、上清を４８時間にわたり定期的に回収した。

【００４３】

無細胞の培養上清を、中性のｐＨ条件および約１０～１５ｍＳ／ｃｍの伝導率（２５℃）下で陰イオン交換カラム（Ｑ－ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標））上に充填した。使用したカラムの充填は、約１．５ｍｇのＦＸ抗原／ｍｌ樹脂であった。充填が完了した後、約１９ｍＳ／ｃｍ（２５°Ｃ）の伝導率を有する５ＣＶの酸性洗浄バッファー（ｐＨ＝６．０）で樹脂を洗浄した。その後、１０ｍＭのカルシウムを含み、約８．０のｐＨ（２５℃）および約１９ｍＳ／ｃｍの伝導率（２５°Ｃ）を有する溶出バッファーで生成物を溶出した。この生成物を５ＣＶの容量で回収した。使用した流速はすべてのステップで５０ｃｍ／ｈ超であり、工程の温度は２～８℃であった。

【００４４】

精製したＦＸ調製物を、約７ｍＳ／ｃｍの伝導率（２５℃）および約８のｐＨ（２５℃）の強力な陰イオン交換カラム（Ｑ－ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）ＦＦまたはＰＯＲＯＳ（登録商標）［Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（ニューヨーク州グランド・アイランド）の登録商標］５０ＨＱ）の上へ、２０時間にわたり充填した。目的としたカラムの充填は、２～１０ｍｇＦＸ／ｍｌ樹脂の範囲であった。

【００４５】

充填の間、カルシウム濃度は約２．５ｍＭであり、ＮａＣｌの濃度は４０ｍＭであった。充填の後、カラムを、約４ｍＳ／ｃｍの伝導率（２５°Ｃ）、ｐＨ８．０、および１ｍＭのカルシウム濃度を有する５ＣＶの洗浄バッファーで洗浄した。約２４ｍＳ／ｃｍ（２５°Ｃ）の伝導率およびｐＨ８で、溶出バッファー中１から１０ｍＭへのCa^{2+}の濃度および９から２００ｍＭへのＮａＣｌの濃度の同時段階増加を使用して、溶出を行った。

すべてのステップを、樹脂のベッド高約１０ｃｍで、３７ｃｍ／ｈの線形流速で行った。活性化の温度は室温（２０～２５℃）であった。

【００４６】

充填および溶出物の集合分画に解析試験を行った。表３では、カラムに充填したｒＦＸの体積および量、ならびにカラムにおける活性化時間が列挙されている。活性化ステップからの各試料由来の生成物のすべてを、ＲＶＶの活性化を伴うＦＸ発色性アッセイにより解析して、試料中の溶出したＦＸ＋ＦＸａの総量を測定し、ＦＸａに特異的な発色アッセイによりＦＸａを選択的に測定した。活性化の後に存在する総ＦＸのパーセントでのＦＸａの含有量を計算した。これもまた表３に列挙されている。ワンステップ精製後および活性化後の試料を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによっても解析した。電気泳動のパターンは図１に示されている。

【００４７】

結論として、ＦＸのＦＸａへの活性化は、この手法により両方の試料に関して成功し、ＦＸａの収率は、両方とも、溶出した総ＦＸのうち約５％のＦＸａであった。試料番号１－８を作製するために、試料番号１－４よりも５倍多くのｒＦＸを充填したが、溶出物中のＦＸおよびＦＸａの絶対量および相対量は、両試料で類似する量であった。血漿由来ＦＸａα由来の重鎖と同様の大きさのバンドを、活性化した両試料の電気泳動図で見ることができる。ＦＸａβに対応するバンドと比較されたこのバンドは、主要なＦＸａ形態として存在したと考えることができる。

【表３】

表3

		充填物				溶出物		
試料ID	カラムの種類	カラムの最大許容容量となるまで充填されたFXの容量（mL）	ＥＬＩＳＡによる充填されたＦＸ（μｇ）	ＰＴ凝固による充填されたＦＸ（μｇ）	カラム上での接触時間（h）	ＦＸ／ＦＸａ量ＲＶＶアッセイ（μｇ）	ＦＸａ量ＦＸａアッセイ（μｇ）	ＦＸ／ＦＸａ混合物中のＦＸａ（％）
#1-4	AEX on Q-SEPHAROSE® FF (GE Healthcare)	20	993	744	20	702	35	5.0
#1-8	POROS® (Applied Biosystems)	100	4967	3722	20	732	42	5.7

【００４８】

表３：ＦＸの活性化により作製された２つの試料からのデータ：ＥＬＩＳＡおよびＰＴ凝固アッセイにより測定された抗原および活性に基づき充填されたＦＸの量、ならびに活性化カラムでの接触期間が示されている。また、溶出物中測定された総ＦＸ／ＦＸａ、およびＦＸａのみの量も示されている。ＦＸａの収率を、総ＦＸ／ＦＸａのパーセントで計算した。

【００４９】
図１は、ＦＸ試料のＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す：活性化のためのｒＦＸ出発物質（レーン「ｒＦＸ」）、活性化ステップ後のｒＦＸａを含む試料番号１－４および１－８（レーン「ｒＦＸ＋ｒＦＸａ　＃１－４」および「ｒＦＸ＋ｒＦＸａ　＃１－８」）、ならびに血漿由来（ｐｄ）のＦＸａ（レーン「ｐｄＦＸａ」）が示されている。電気泳動の後、クーマシー染色によりタンパク質のバンドを可視化させた。最も左のレーンには、分子量マーカーが示されている。ＦＸおよびＦＸａに対応するバンドがマークされている。
【００５０】
実施例２
ヒトＦＸをコードするｃＤＮＡおよび抗生物質選択のためのネオマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドベクターを使用して、組み換え第Ｘ因子（ｒＦＸ）を発現する細胞株をＢＨＫ細胞株で発達させる。ｒＦＸ産生細胞のクローンを、限界希釈クローニングにより単離し、エンドペプチダーゼのフューリンをコードするベクターでトランスフェクトする。フューリンによりトランスフェクトしたｒＦＸを産生する細胞を、２回クローニングする。産生株のクローンを、増殖パラメーターならびに外因性テナーゼおよびＲＶＶによる活性化の後の高活性のｒＦＸの生産性に基づき選択し、ＦＸ欠損血漿の凝固アッセイ（プロトロンビン時間（ＰＴ）凝固アッセイ）の外因性経路により活性化する。ＦＸａに特異的な発色アッセイにより不純物を測定することによって、ならびに低カルボキシル化ｒＦＸ、未処理のｒＦＸ形態（単鎖またはプロペプチド含有）、および分解産物に関するＳＤＳ－ＰＡＧＥにより、タンパク質の質を検証する。すべての質の基準と一致したクローンを使用して、市販の培地中１００ＬのバイオリアクターでｒＦＸを生成し、バイオリアクターから出る流れを回収することにより、７２時間にわたり定期的に上清の収集を行う。
【００５１】
培養上清を、ｐＨ５．０および約３５ｍＳ／ｃｍの伝導率（２５℃）で疎水性相互作用カラム（ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ（登録商標）ＳｕｐｅｒＢｕｔｙｌ－５５０）上に充填する。使用したカラムの充填は、約１．５ｍｇのＦＸ抗原／ｍｌ樹脂である。充填が完了した後、樹脂を、約３５ｍＳ／ｃｍの伝導率（２５℃）の５ＣＶの洗浄バッファー（ｐＨ＝５．０）を用いて洗浄する。その後、１０ｍＭのカルシウムを含み、約８．０のｐＨ（２５℃）および約１０ｍＳ／ｃｍの伝導率（２５℃）を有する溶出バッファーを用いてＦＸを溶出する。この生成物を８ＣＶの容量で回収する。
【００５２】
精製したＦＸ調製物を、約７ｍＳ／ｃｍの伝導率（２５℃）および約８のｐＨ（２５℃）で強力な陰イオンカラム（Ｑ－ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）ＦＦまたはＰＯＲＯＳ（登録商標）５０ＨＱ）上に充填する。目的とするカラムの充填は、２～１０ｍｇＦＸ／ｍｌ樹脂の範囲である。
【００５３】
充填の間、カルシウムの濃度は約２．５ｍＭである。充填の後、約６ｍＳ／ｃｍの伝導率（２５℃）、ｐＨ８．２および１ｍＭのカルシウム濃度を伴う７ＣＶの洗浄バッファーを用いてカラムを洗浄する。ＦＸを１０時間樹脂と接触させた後に溶出を行う。
【００５４】
１から１０ｍＭへの溶出バッファー中のCa^{2+}の濃度の同時の段階的な増加を使用して溶出を行い、ＮａＣｌの対イオンの濃度は、約２０ｍＳ／ｃｍの伝導率（２５℃）およびｐＨ８で９から１６５ｍＭに増加する。すべてのステップを、樹脂のベッド高約１５ｃｍで５０ｃｍ／ｈの線形流速で行う。活性化の温度は室温（２０～２５℃）である。
【００５５】
実施例３
ヒトＦＸをコードするｃＤＮＡおよび抗生物質選択のためのアンピシリン耐性遺伝子を有するプラスミドベクターを使用して、２９３細胞株から組み換え第Ｘ因子（ｒＦＸ）を発現する細胞株を発達させる。ｒＦＸ産生細胞株を、限界希釈クローニングにより単離し、エンドペプチダーゼのフューリンをコードするベクターを用いてトランスフェクトする

。フューリンでトランスフェクトしたｒＦＸを産生する細胞を２回クローニングする。産生株のクローンを、標準的な増殖パラメーター、ならびに外因性テナーゼおよびＲＶＶによる活性化後の高活性のｒＦＸの生産性に基づき選択し、ＦＸ欠損血漿の凝固アッセイ（プロトロンビン時間（ＰＴ）凝固アッセイ）における外因性経路により活性化する。ＦＸａに特異的な発色アッセイにより不純物を測定することにより、ならびに低カルボキシル化ｒＦＸ、未処理のｒＦＸ形態（単鎖またはプロペプチド含有）、および分解産物に関するＳＤＳ－ＰＡＧＥにより、タンパク質の質を検証する。すべての質の基準と一致するクローンを使用して、市販の培地中、５０ＬのバイオリアクターでｒＦＸを生成し、バイオリアクターから流れを回収することによって、３６時間にわたり定期的に上清を回収する。

【００５６】

無細胞の培養物の上清を、５．０のｐＨおよび約３５ｍＳ／ｃｍの伝導率（２５℃）で「バッチ」技術を使用して、疎水性樹脂（ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ（登録商標）［Ｔｏｓｏｈ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（ベルギー）の登録商標］ＳｕｐｅｒＢｕｔｙｌ－５５０）上に充填する。使用するタンパク質の充填は、約１．５ｍｇのＦＸの抗原／ｍｌ樹脂である。充填が完了した後、樹脂を、約３５ｍＳ／ｃｍの伝導率（２５℃）の洗浄バッファー（ｐＨ＝５．０）を使用して洗浄する。その後、１０ｍＭのカルシウムを含み、約８．０のｐＨ（２５℃）および約１０ｍＳ／ｃｍの伝導率（２５℃）を有する溶出バッファーで、樹脂からＦＸを溶出する。

【００５７】

次に、回収したＦＸを、記載される比率での以下の成分：１００μｇのＦＸ／３０ｍｇのグリシン／２０ｍｇのＮａＣｌ／１０ｍｇのＨＥＰＥＳと共に凍結乾燥する。

【００５８】

－７０℃で２カ月間保存した後、ＦＸを再構成し、約８ｍＳ／ｃｍの伝導率（２５℃）および約８．１のｐＨ（２５℃）での強力な陰イオン交換カラム（Ｑ－ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）ＦＦまたはＰＯＲＯＳ（登録商標）５０ＨＱ）上に充填する。目的とするカラムの充填は、２～１０ｍｇのＦＸ／ｍｌ樹脂の範囲である。

【００５９】

充填の間、カルシウムの濃度は約２．５ｍＭである。ＦＸを樹脂と１６時間接触させた後、溶出を行う。

【００６０】

溶出を、２．５から２０ｍＭへの溶出バッファー中のCa^{2+}濃度の同時の段階的な増加を使用して行い、ＮａＣｌ対イオンの濃度は、約３０ｍＳ／ｃｍの伝導率（２５℃）およびｐＨ８．５で、９から２５０ｍＭに増加する。すべてのステップを、樹脂のベッド高約２５ｃｍで、２０ｃｍ／ｈの線形流速で行う。活性化の温度は室温である（２０～２５℃）。

【００６１】

最後に、本明細書の態様は特定の実施形態を表すように強調されているが、当業者が、これら開示された実施形態が単に本明細書中開示される対象物の原則を表すことを容易に認識していることが、理解されている。よって、開示される対象物は、本明細書中記載される特定の方法、プロトコル、および／または試薬などに全く限定されないことを理解すべきである。同様に、開示される対象物の様々な修正もしくは変更、または代替的な構成が、本明細書の趣旨から逸脱することなく本明細書中の教示にしたがい作製できる。最後に、本明細書中使用される用語は、単に特定の実施形態を説明するためのものであり、特許請求の範囲によってのみ定義される本開示の範囲を限定するようには意図されてはいない。よって本開示の実施形態は、示され記載される実施形態に正確に限定されるものではない。

【００６２】

本明細書中記載される方法および装置を行うため本発明者に知られているベストモードを含む特定の実施形態が、本明細書中に記載されている。当然、これら記載される実施形

態の変更は上記の説明を読むことにより当業者に明白である。よってこの開示は、該当する法律によって認められる限り本明細書に添付される特許請求の範囲に記載される対象物のすべての修正および均等物を含む。さらに、それらの可能なすべての変形における上述の実施形態のいずれかの組み合わせは、本明細書中特段他の記載がなく、または文脈と明確に矛盾しない限り、本開示に含まれている。

【００６３】

本開示の代替的な実施形態、要素、またはステップのグループ分けは、限定するよう解釈すべきではない。各グループのメンバーは、個々に、または本明細書中開示される他のグループのメンバーとのいずれかの組み合わせで、記載かつ請求されてもよい。あるグループの中の１つまたは複数のメンバーは、簡便性および／または特許適格性のため、グループに含まれてもよく、グループから削除されてもよいことが予想される。このようないずれかの包有または削除が起こる場合、明細書は修正された群を含むとされ、よって添付の特許請求の範囲で使用されるすべてのマーカッシュ群の記載される説明を満たすものである。

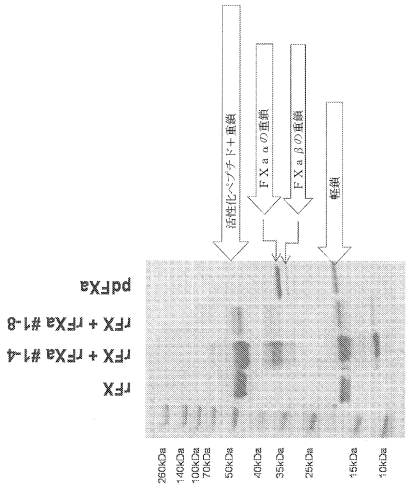
【００６４】

他の記載がない限り、本明細書および特許請求の範囲で使用される特徴、項目、量、パラメーター、特性、用語などを表すすべての数は、用語「約」によりすべての場合で修正されると理解されている。本明細書中使用されるように、用語「約」は、定量化された特徴、項目、量、パラメーター、特性、または用語が、記載される特徴、項目、量、パラメーター、特性、または用語の値の上下±１０％の範囲を含むことを意味する。よって、特段他の記載がない限り、明細書および添付の特許請求の範囲に記載される数値のパラメーターは、変動し得る近似値である。少なくとも、および特許請求の範囲と等価の教義の使用を限定する試みとしてではなく、各数値の記載は、少なくとも、報告される有意な桁の数の観点から、および通常の丸めの技術を使用することにより、解釈されるべきである。開示の広い範囲に記載される数値の範囲および値が近似値であるにも関わらず、特定の実施例に記載される数値の範囲および値は、可能な限り正確に報告されている。しかしながら、いずれかの数値の範囲または値は、本来、それぞれの試験測定値で見いだされる標準偏差からもたらされる特定の誤差を必然的に含む。本明細書中の値の数値の範囲の記載は、単に、当該範囲内の数値をそれぞれ分離するように個別に表す簡潔な方法として作用するよう意図されている。本明細書中特段他の記載がない限り、数値の範囲のそれぞれ個々の値は、本明細書中個々に記載されているかのように本明細書に組み込まれている。

【００６５】

本開示を説明する文脈（特に以下の特許請求の範囲の文脈）で使用される用語「ａ」、「ａｎ」、「ｔｈｅ」、および類似の記載は、本明細書中特段他の記載がない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、単数形および複数形の両方を含むと解釈される。本明細書中記載されるすべての方法は、本明細書中特段他の記載がない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で行うことができる。本明細書中提供されるいずれかおよびすべての例、または例示的な言語（たとえば「など」）の使用は、単に、本開示を良好に例示するように意図されており、請求される範囲に限定を課すものではない。本明細書中の用語は、本明細書中開示される実施形態の実行に重要ないずれかの請求されていない要素を示すように解釈されるものではない。

【図１】


活性化ペプチド＋重鎖
ＦＸａαの重鎖
ＦＸａβの重鎖
軽鎖
pdFXa
rFX + rFXa #1-8
rFX + rFXa #1-4
rFX
250kDa
140kDa
100kDa
70kDa
50kDa
40kDa
35kDa
25kDa
15kDa
10kDa

フロントページの続き

(72)発明者 ハッスラッハー，マインハルト
オーストリア国，エー－１０２０ ウィーン，フォルガテンシュトラッセ ２２１／１７
(72)発明者 ガターニグ，トーマス
オーストリア国，エー－１０９０ ウィーン，ヌスドルフ シュトラッセ １０－１２／１６
(72)発明者 ファイドラー，クリスチャン
オーストリア国，エー－１１００ ウィーン，ラーバーバーンガッセ １８／３６
(72)発明者 ベーム，エムスト
オーストリア国，エー－１２１０ ウィーン，ミュール ９４
(72)発明者 ドチカル，マイケル
オーストリア国，エー－１１５０ ウィーン，マリアヒルファーシュトラッセ １７３－１７５／２／５４
(72)発明者 ホーリング，フランチスカ
オーストリア国，エー－２２３０ ゲンゼルンドルフ，バウエルンフェルトガッセ ３／９

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特開平０９－１１０７１５（ＪＰ，Ａ）
特表２０１０－５２８０９６（ＪＰ，Ａ）
特表２００１－５１４５１６（ＪＰ，Ａ）
特開２００７－０５５８９９（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１３／０５３８８７（WO，Ａ１）
特表２００７－５０７４１９（ＪＰ，Ａ）
HIMMELSPACH M，THROMBOSIS RESEARCH，米国，２０００年，VOL:97，PAGE(S):51 - 67，ＵＲＬ，http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848(99)00145-0
日本血栓止血学会誌,1999，Vol.10，No.2/3，pp.181-188
Biochemistry，1972，Vol.11，No.26，pp.4882-4891
Biotechnology and Bioengineering，2002，Vol.79，No.7，pp.724-732
Cytotechnology，2004，Vol.44，pp.93-102
Protein Science，2008，Vol.17，pp.1354-1361

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ ９／６４
Ｃ０７Ｋ １４／７４５
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＰｕｂＭｅｄ