

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3976351号
(P3976351)

(45) 発行日 平成19年9月19日(2007.9.19)

(24) 登録日 平成19年6月29日(2007.6.29)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 38/48 (2006.01)
A 6 1 P 7/04 (2006.01)

A 6 1 K 37/475

A 6 1 P 7/04

請求項の数 7 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平10-542133
 (86) (22) 出願日 平成10年4月6日(1998.4.6)
 (65) 公表番号 特表2001-524953(P2001-524953A)
 (43) 公表日 平成13年12月4日(2001.12.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/AT1998/000091
 (87) 国際公開番号 W01998/044942
 (87) 国際公開日 平成10年10月15日(1998.10.15)
 審査請求日 平成14年2月21日(2002.2.21)
 (31) 優先権主張番号 A594/97
 (32) 優先日 平成9年4月8日(1997.4.8)
 (33) 優先権主張国 オーストリア(AT)
 (31) 優先権主張番号 A1592/97
 (32) 優先日 平成9年9月19日(1997.9.19)
 (33) 優先権主張国 オーストリア(AT)

(73) 特許権者
 バクスター・アクチエンゲゼルシャフト
 オーストリア、アー—1 2 2 1 ヴィーン、
 インダストリーシュトラッセ 6 7 番
 (74) 代理人
 弁理士 青山 稔
 (74) 代理人
 弁理士 田村 恭生
 (74) 代理人
 弁理士 齋藤 みの里
 (72) 発明者
 シュヴァルツ、ハンス—ペーター
 オーストリア、アー—1 1 8 0 ヴィーン、
 シンドラーガッセ 3 2 番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫寛容プロトロンビン複合体の調製

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

因子ⅠⅠ、ⅠⅩ、Ⅹ、および場合により因子ⅤⅠⅠを含み、因子ⅤⅠⅠⅠ抗原の含量が、
 因子ⅤⅠⅠⅠ：Ⅰ抗原／ファイバ単位が 0 . 1 (U / U) 以下であることを特徴とする免
 疫寛容プロトロンビン複合体医薬調製物。

【請求項 2】

血漿または血漿フラクションから製造されることを特徴とする請求項 1 に記載の医薬調製
 物。

【請求項 3】

該調製物が因子ⅠⅩ a、Ⅹ a およびⅤⅠⅠ a の少なくとも 1 つを含み、因子ⅤⅠⅠⅠ阻害
 剤バイパス活性を有することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の医薬調製物。

10

【請求項 4】

リン脂質を含まないことを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれかに記載の医薬調製物。

【請求項 5】

以下の工程を含む請求項 1 から 4 のいずれかに記載の調製物の製造方法：

a) 因子ⅠⅠ、ⅠⅩ、Ⅹ、および場合により因子ⅤⅠⅠを含む血漿または血漿フラクシ
 ョンを得る工程、

b) 場合により界面活性剤の存在下に該血漿または血漿フラクションを担体物質と接触さ
 せ、因子ⅤⅠⅠⅠ、および場合によりリン脂質を因子ⅠⅠ、ⅠⅩ、Ⅹ、および場合により
 因子ⅤⅠⅠから分離する工程、

20

【請求項 6】

【請求項 7】

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

調製物または活性化プロトロンビン複合体調製物、例えば F E I B A 中に含まれる因子 V I I I は、機能的な因子 V I I I 阻害剤を有する患者内において、因子 V I I I を新たに投与することにより、これらの阻害抗体がブースト (boost) され、結果的に阻害剤血友病の症状が一時的に悪化しさえする効果を有する。

しかし、因子 V I I I 阻害剤血友病における有効な止血に関し、因子 V I I a 調製物の作用はプロトロンビン複合因子調製物の作用より劣ることが認められた (Turecek P. et al., Thrombosis & Haemostasis, 1997, p.222)。

したがって、プロトロンビン複合因子調製物の効力または効率を有するが、このような調製物の望ましくない免疫学的副作用を生じない調製物を提供することが本発明の目的である。

10

本発明では、因子 V I I I 抗原含量の低い、因子 I I、因子 I X、因子 X、および場合により因子 V I I を含む免疫寛容のプロトロンビン複合体医薬調製物を提供することにより上述の目的を達成する。

本発明に記載の調製物の因子 V I I I 抗原含量は、10%以下、特に5%以下であるのが好ましい。因子 V I I I : C 抗原 / F E I B A U (ファイバ単位) が 0.1 (U/U) 以下であることが好ましい。特に好ましい態様では、因子 V I I I 抗原含量は 0.03 / F E I B A U 以下、より好ましくは 0.02 / F E I B A U 以下、最も好ましくは検出下限以下でさえる。

特に、血漿または血漿フラクションからプロトロンビン複合因子をさらに精製する場合、プロトロンビン複合因子の活性を大部分維持したまま、因子 V I I I 含量、および場合によりリン脂質含量を大きく減少させることができるという発見は驚くべきことであると考えられるに違いない。

20

特に、本発明に記載の医薬調製物は少なくとも因子 I X a、X a および V I I a を含み、F E I B 活性を有し、すなわちこれは、機能的阻害剤を含み、因子 V I I I が欠如した血漿の凝固時間を短縮する (本明細書中、例えば AT-B 350 726 参照)。

本発明に記載の調製物は血漿または血漿フラクションから調製することができる。血漿フラクションは、血漿、特にヒト起源の血漿から、クロマトグラフィー処理、沈降または遠心によって調製することができ、あるいはクリオ沈降物の上清を用いる。

血漿フラクションは、ビタミン K 依存因子、例えばプロトロンビン複合体の因子を含み、さらにまたタンパク質 S、C および / または Z が含まれるのが好ましい。

30

特に好ましい態様では、調製物はリン脂質を含まない。好ましくは、含まれるリン脂質の上限は 0.1 nmol / F E I B A U である (測定に関しては、実施例参照)。

リン脂質を含まないため、因子 V I I I に対する望ましくない抗体の形成を減少させ、阻害することができる。

また、本発明により、この調製物を生産する方法をも提供する。この方法は以下の工程を含む：

a) 因子 I I、I X、X、および場合により因子 V I I を含む血漿または血漿フラクションを得る工程；

b) 場合により界面活性剤の存在下で、血漿または血漿フラクションを担体物質と接触させ、因子 I I、I X、X、および場合により因子 V I I から因子 V I I I、および場合によりリン脂質を分離する工程；

40

c) 血漿または血漿フラクションを精製する工程；ならびに、

d) 因子 I I、I X、X、および場合により因子 V I I を含むフラクションを回収する工程。

特に好ましいバリエーションでは、工程 b および c または b、c および d を一方法工程として行う。

用いる血漿フラクションは少なくとも中間の純度を有するものが好ましい。

「中間の純度を有する調製物」とは、血漿フラクションが、中間の純度の因子 V I I I 調製物の定義と類似であることを意味する (本明細書中、例えば Wood Clive (ed.) Factor VIII: Purity and prophylaxis, Royal Society of Medicine 参照)。

50

したがって、クロマトグラフィー精製によって除去されない付随タンパク質は中間の純度の調製物中に依然として存在していてもよい。

出発物質として、慣用の市販プロトロンビン複合因子調製物、例えばIMMUNOのFEIBA[▲]R[▼]S-TIM 4または活性化プロトロンビン複合体を用いることができる。

各精製処理として、先行技術から既知の方法を用い、好ましくはクロマトグラフィー処理、沈降または遠心を行う。また血漿フラクションとして、クリオ沈降物の上清を用いることもできる。

担体物質はクロマトグラフィー、ろ過および/またはナノフィルトレーションに適当な物質である。ろ過とは特にアフィニティーろ過または膜ろ過である。

前精製された物質、例えばアニオン交換体によって前精製された物質を用いる場合、変化させた条件下で、さらなる担体物質、好ましくは前精製用に用いたのと同じ担体物質への再吸着を用いる。

好ましい態様では、担体物質は因子VII特異的担体物質、特にアフィニティークロマトグラフィーに適当な基質(マトリックス)である。特に好ましくは、vWF含有基質を用いる。

このような担体物質に対し、因子VII、および場合によりリン脂質は吸着し、一方、因子II、IX、X、および場合によりVIIは結合しないのが好ましい。

しかし、担体物質はまた、因子VIIに対して非特異的な担体物質、例えば弱いアニオン交換体、例えばDEAE、TMAEアニオン交換体または先行技術から十分に既知のさらなるアニオン交換体であり得る。

選択された条件に依存して、因子VII、および場合によりリン脂質は担体物質に吸着し、因子II、IX、X、および場合により因子VIIは結合しないか、あるいはその逆である。

さらに好ましい態様では、担体物質は因子VIIに対してよりプロトロンビン複合体に対して高いアフィニティーを有する。したがって、例えば、因子II、IX、X、および場合により因子VIIは吸着し、因子VII、および場合によりリン脂質は溶出する。因子VIIを意図的に不活化し、次いで例えばもはや担体物質と結合しないような不活化形態にすることもできる。このような因子VIIの不活化は、例えばキレート試薬を用いて解離させることによって、分解、特に、例えばセリンプロテアーゼ、例えばトロンビンまたは活性化プロテインCによってタンパク質分解することによって、アフィニティーパートナー、例えば抗体またはペプチドを結合させることによって行うことができる。開示するすべてのバリエーションの方法を界面活性剤、特に非イオン性界面活性剤の存在下で行うこともできる。好ましくは、界面活性剤としてポリエーテルまたはポリソルベートを用い、特にトウイーンまたはトリトンを用いる。

界面活性剤が存在する場合、好ましい態様では、これを再び除去し、あるいは分離する。さらに好ましい態様では、特に熱処理、蒸気処理、溶媒での処理および/または界面活性剤での処理の群から選択される、存在する可能性のある病原体の不活化工程を提供する。したがって、概して前記方法にしたがい、本発明に記載の調製物を得ることができる。これは、因子VII阻害剤(=血友病A)患者、特に1ベテスダ(Bethesda)U/血漿mL以上、好ましくは5ベテスダU/血漿mL以上の阻害剤力価を有する患者に対する処置に適当な薬剤の製造に特に適当である。また、高度に精製された個々の因子II、IXおよびX、ならびに場合により因子VIIの組み合わせによってこれを製造することもできる。

生物学的物質、すなわち生物または体液または微生物から誘導された物質は、病原体、例えば感染分子または微生物およびウイルスまたは発熱原で汚染されているかもしれないので、病原体または発熱原を不活化あるいは涸渇させる種々の方法が開発された。

このような方法には、物理的および/または化学的処理、例えば種々のろ過方法(例えばナノ-、ディア(dia)-、ウルトラフィルトレーション)、熱処理、酸またはアルカリでの処理、界面活性剤および/または有機溶媒での処理、ならびにUV光またはレーザー

10

20

30

40

50

光での処理が含まれる。このような病原体を不活化あるいは涸渇させる方法の種々の組み合わせもまた、先行技術においてしばしば示されている。

例えば、E P 0 1 9 7 5 5 4 から、生成物が吸着した固相上、ウイルス不活化試薬およびウイルス脱発熱原化試薬、例えば両親媒性物質および/または溶媒で処理することとを特徴とする、生物学的生成物または医薬生成物中のウイルスを脱発熱原化および不活化する方法が既知である。この処理に続いて、ウイルス不活化試薬およびウイルス脱発熱原化試薬を固相から分離し、吸着した生成物を洗浄し、最後に固相から溶出させる。

E P 0 1 3 1 7 4 0 から、場合により界面活性剤の存在下、溶液中のタンパク質含有組成物を有機溶媒、例えばジ - またはトリ - アルキルホスフェイトで処理すること（溶媒 / 界面活性剤処理）が既知であり、これにより脂質含有ウイルスを含まないタンパク質組成物を得ることができる。

10

A T 特許第 4 0 2 , 1 5 1 号から、加熱前に、少なくとも 1 重量 % の濃度のテンシド (tenside) を水溶液中に存在する調製物と混合する熱処理が既知である。

生物学的生成物あるいは医薬生成物中の望ましくない活性を減少させ、あるいは抑制するさらなる方法は、E P 0 0 8 3 9 9 9 から既知である。この方法は、非変性両親媒性試薬の溶液または懸濁液と長時間接触させることに基づく。脱発熱原化生成物をイオン交換体で処理し、両親媒性試薬を除去する。

先行技術から既知のこれらの多くの方法の不都合な点は、処理される組成物に含まれている不安定なタンパク質、例えば血液タンパク質の活性がしばしば失われることである。特にクロマトグラフィー精製工程を行う場合、タンパク質の不活化が比較的高い程度に生じる。また、タンパク質の分解は活性化を導くこともある。したがって、例えばクロマトグラフィー精製の間に、自触媒作用的工程のせいで、因子 V I I が非常に容易に活性化し、非常に不安定なので望ましくない因子 V I I a になることが知られている。

20

さらなる不都合な点は、多くの方法に必要とされる多大な時間および装置に存し、これは該方法の実用性を大きく減少させ、それゆえしばしば産業規模での適用に不適当なものにする。

したがって、本発明の範囲内では、タンパク質、特に不安定なタンパク質に対して容易であり、生物学的物質中の病原体を効果的に不活化する方法を用いるべきであり、これは容易に産業規模で適用でき、経済的に実施できるものである。特に、この病原体不活化方法では、起こり得るタンパク質の分解および可能な活性化が大部分回避されるべきである。

30

生物学的物質中の病原体、特にウイルスを不活化する本方法では、この物質を化学物質と、少なくとも 2 0 0 mmol / L、好ましくは少なくとも 3 0 0 mmol / L の N a C l 濃度に相当するエルオトロピック (eluotropic) 塩の存在下でインキュベートする。

溶液中の病原体の不活化は、吸着剤の処理よりもいくらか有利である。したがって、例えばこのような方法は、均質の単相系でより高い実用性を示し、不活化の確認がより可能である。さらに、比較的均質の相において病原体がより影響を受けやすいことは、本方法工程の効率を増加させると思われる。

このような生物学的物質はヒトタンパク質を含み、特にそれは血漿または血漿フラクションであるか、あるいは細胞培養物から誘導されるものである。好ましくは、生物学的物質は血液因子、例えば因子 X I I、X I、V I I I、V、フォンビルブラント因子またはフィブリノーゲン、特にビタミン K 依存性タンパク質、例えば因子 I I、因子 V I I、因子 I X、プロテイン C、プロテイン S またはプロテイン Z を含む。

40

このようなタンパク質は、好ましくは精製された形態あるいは複合体混合物で、単一の因子として存在し得る。特に好ましい態様では、生物学的物質はプロトロンビン複合体の少なくとも 1 つの因子を含み、特にプロトロンビン複合体含有フラクションまたは因子 V I I 含有物質であり、例えば、血漿をクリオ沈降させた後、その各上清 (クリオ上清) から出発する。

本発明の調製物は好ましくは F E I B 活性 (因子 V I I I 阻害剤バイパス活性) を有するものであり、すなわち因子 V I I I 阻害剤患者の処置に適当な調製物である。

細胞培養物から誘導された物は好ましくは、組換え的に生産された血液因子を含む物質で

50

あり、それらの血液因子の中には、内因性もしくは外因性の凝固因子、繊維素溶解因子、血栓崩壊因子、またはそれらの阻害剤、特にビタミンK依存性の血液因子がある。細胞として、組換えタンパク質の発現用に一般に用いられる細胞、好ましくは哺乳類細胞、例えばVero、CHOまたはBHK細胞を用いることができる。存在し得る病原体を不活化するため、直接、粗製の細胞抽出物由来か、あるいは前精製細胞フラクション由来であってもよい各タンパク質を本発明の方法に付する。

化学物質は、例えば界面活性剤（両親媒性物質、テンシド）であり、これは少なくとも1%、より好ましくは5%以上、最も好ましくは10%以上の量含まれるのが好ましいが、本発明にしたがい、殺ウイルス効果、殺菌効果または脱発熱原化（deparogenizing）効果を有することが既知である他の化学物質、またはほとんどの種々の化学物質の混合物を用いてもよい。

10

しかし、この選択は、生物学的物質の性質が実質的に有害な影響を受けないものに限定される。経済的な方法または手法のため、インキュベーション前の活性を基準にして50%以上、好ましくは少なくとも70%、特に85%以上のこの物質の生物学的活性を維持する化学物質が選択される。生物学的活性の維持は、この生物学的物質に含まれるタンパク質がその天然に与えられている機能または異なる機能を満たすことができることを意味する。次いで、例えば染色体試験または抗原決定により、この生物学的活性を決定し、タンパク質のタイプに応じて記載することができる。場合により、インキュベーション後に化学物質を分離する。

界面活性剤とは、非常に一般的な合成の有機の界面活性物質を意味する。

20

好ましくは、本発明の方法では非イオン性の界面活性剤を用いる。非イオン性テンシド、例えばポリエーテル、特にアルキルフェノールポリグリコールエーテルは、脂肪酸、脂肪酸アミド、脂肪アミン、脂肪アルコール、アミノキシド（aminoxides）、ポリアルコールの脂肪酸エステルおよび糖エステルのエトキシ化生成物である。

このようなテンシドはタンパク質に対して変性作用を有さず、好ましくはポリソルベートおよびトリトンの群から選択される。ポリソルベートとしては、例えばトウイーン^Rを用いる。

化学物質として界面活性剤を用いる場合、好ましい態様では、他の物質を加えずに、特に有毒な有機物質または溶媒、例えばTNBPを加えずに、界面活性剤を用いる。この方法では、汚染される危険性が最小にまで減少する。

30

本発明の方法では、生物学的物質を化学物質とインキュベートする。インキュベーションとは、存在する可能性がある病原体および発熱原を不活化するのに十分な時間、一定温度で、生物学的物質を化学物質の溶液、懸濁液または乳液と接触させることを意味する。例えば、混合物を単に決められた時間静置することによって接触を行ってもよい。

本発明では、エルオトロピック塩の存在下にインキュベーションを行う。以下、「エルオトロピック塩」は、固形または液状浸透タイプまたはゲルタイプの吸着剤から吸着された物質を溶解させ、ならびに/あるいはそれらを置換する性質を有する、化学物質との混合物中の塩または複合体組成物中の塩を意味する。好ましくは、エルオトロピック塩はクロマトグラフィー法で用いられる脱着物質である。吸着された物質は、エルオトロピック塩の存在下で十分に可溶であり、すなわち生物学的物質が沈降しない条件が選択されるのが好ましい。

40

塩または組成物のタイプおよび濃度は、一般に、用いられる吸着剤に依存して選択される。塩の溶出作用は例えば、溶媒の極性に依存し、すなわち例えば、エタノール-アセトン-メタノール-水の順で増加する。吸着剤は固相、特にイオン交換クロマトグラフィー用に適当な基質であり得る。またエルオトロピック塩を含む組成物中にさらに、添加剤、例えばさらなる塩を含ませることができる。好ましくは、組成物は、6.0から8.0の範囲のpH、好ましくは約7.0のpHを有する水性組成物である。

好ましい態様では、塩化ナトリウムをエルオトロピック塩として用い、さらに他のアルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩、その中でもCaCl₂を用いる。エルオトロピック塩として、いわゆるカオトロピック塩、例えば、尿素、ロダニド（rhodanides）またはグ

50

アニジウムを用いることもできる。塩の濃度は少なくとも

≥

200 mmol / L、好ましくは

≥

300 mmol / Lである。用いられる濃度の上限は、特にそれぞれの塩の溶解度に依存し、例えばNaClに関しては、約2 mol / Lである。カオトロピック物質、例えば尿素は8 mol / Lまでの濃度でさえ用いられることがある。

存在する可能性があるすべての病原体を不活化するのに十分な時間、好ましくは10分から10時間、最も好ましくは1時間から5時間、この生物学的物質を化学物質とインキュベートする。本発明の方法に必要な時間は、前アッセイにおけるモデルウイルス、例えばHIV、シンドビス、TBEまたは肝炎ウイルスを用いて決定することができる。

10

また、温度の選択は、用いられる時間に影響する。本発明の方法では、室温、例えば15から45、特に20から30の範囲の温度でインキュベーションを行うのが好ましい。

本発明の方法では、好ましくは生物学的物質を固形担体に吸着させ、精製し、精製された物質を溶出させた後すぐにインキュベーションを行う。溶出およびインキュベーションは連続して行ってもよいが、同時に行うこともできる。

さらなる好ましい態様では、生物学的物質をクロマトグラフィー精製し、遠心、ろ過または他の物理的方法によって溶出物をさらに処理した後、インキュベーションを行う。

固形担体はクロマトグラフィー用に適当な物質、特にイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーまたはアフィニティークロマトグラフィー用に適当な物質であるのが好ましい。例えばSephacel[®]、Superdex、Sephadex[®]、Spheredex[®]、Toyopearl[®]のような物質、またはヒドロキシルアパタイトのような無機物質を用いる。

20

イオン交換体として、アニオン交換物質、例えばDEAE-Sephacel[®]、DEAE-Sephadex[®]、DEAE-Sephacel[®]、CL6B、DEAE-Sephacel[®] Fast Flow、QAE-Sephadex[®]、Q-Sephacel[®] Fast Flow、Q-Sephacel[®] High Performance、DEAE-Tris-acryl、DEAE-Spheredex[®]、Q-Hyper-D (Sepractorから得られる)、DEAE-Toyopearl[®]、QAE-Toyopearl[®]、Fractogel[®] EMD-TMAEまたは他のFractogel物質を用いることができる。

疎水性クロマトグラフィー物質の例としては、例えばブチル - Sepharose[®]、オクチル - Sepharose[®]、フェニル - Sepharose[®]、Fractogel[®] TSK - ブチル、t - ブチル - HIC支持体またはTSKゲルブチルToyopearl[®]を記載すべきである。

30

複合体混合物由来の生物学的物質は担体に直接吸着され、精製されるが、不活化工程の前後に、この物質を精製するためのさらなる工程を行うこともでき、好ましくはさらなるクロマトグラフィー精製工程は本発明の範囲内である。

本発明の方法によって、病原体を不活化する。病原体とはまた、例えばウイルスの断片、特にまた、単離されたゲノムまたはその断片を意味する。

病原体は、例えばB型肝炎ウイルスのような脂質包膜病原体、または例えばA型肝炎ウイルスのような非脂質包膜病原体であり得る。

現在、高用量の試験ウイルス、例えば肝炎ウイルスのモデルウイルスとしてのHIウイルスまたはシンドビスウイルスと混合された生物学的物質のサンプルに対して本方法を用いた後に、ウイルス力価が検出下限より減少してサンプル中にウイルスがもはや検出できなければ、ウイルスの不活化方法は有効であると言える。

40

核酸の検出および定量は、例えばAT特許第401,062号に記載のPCR法または直接滴定法によって行うことができる。

不活化の尺度として、試験ウイルスを一回加えた後、出発ウイルス力価と最終ウイルス力価の比率の常用対数 (decadic logarithm) から計算されるいわゆる減少因子が知られている。さらに、欧州共同体の委員会の欧州ガイドラインECII/8115/89 - ENから、いわゆる総合減少因子が既知である。これは個々の連続する不活化方法の減少因子の合計から計算される。

またさらに、病原体を不活化あるいは潤滑させる独立した工程をそれぞれ行うのが好まし

50

い。このために先行技術から既知のすべての方法を用い、感染の危険性を最小にすることができる。

特に、さらなる不活化あるいは涸渇工程としてる過および/または熱処理を行う。

る過として、好ましくはナノフィルトレーションを行う。熱処理は、E P - 0 1 5 9 3 1 1 に記載のように、5 0 から 8 0 の温度で、固形生物学的物質、例えば制御された、例えば 5 から 8 % の範囲の水含量を有する凍結乾燥物に対して行うのが好ましい。

好ましい態様では、化学物質として界面活性剤を用いる二工程処理を提供する。ここでは、少なくとも 1 %、好ましくは少なくとも 5 %、最も好ましくは少なくとも 1 0 % 量の界面活性剤を第一工程で用いる。第二工程では、少なくとも 1 0 %、好ましくは少なくとも 1 2 %、最も好ましくは少なくとも 1 4 % 量のさらなる界面活性剤を用いる。用いられる界面活性剤は両工程で同じものにしてもよいが、異なる界面活性剤を用いることもできる。非常に一般的に、ウイルスの不活化工程の組み合わせによって、対応する調製物を投与した後のウイルス感染の危険性を大きく減少させ、排除することができる。

本発明ではまた、活性化された血液因子および活性化されていない血液因子の含量を基準にして、5 0 % 以下、好ましくは 4 0 % 以下、より好ましくは 3 0 % 以下、さらにより好ましくは 2 0 % 以下、さらにより好ましくは 1 0 % 以下、最も好ましくは 1 % 以下の割合の活性化された血液因子を有し、ならびに界面活性剤を含有する、自己動力的に活性化し得る血液因子を含むクロマトグラフィー精製された調製物を提供する。

特に調製物は、活性化された因子 V I I および活性化されていない因子 V I I の含量を基準にして 5 0 % 以下、好ましくは 1 0 % 以下、最も好ましくは 1 % 以下の因子 V I I a 活性を含むプロトロンビン複合体含有調製物である。本発明の調製物の界面活性剤含量は製薬的に許容される量、好ましくは 1 % から界面活性剤の検出限界量までの範囲である。

本発明に記載の「自己動力的に活性化し得る血液因子」とは、表面接触により、あるいは例えばクロマトグラフィー工程のような工程により自触媒的に活性化することができる血液因子を意味する。特にこのような血液因子は因子 V I I、因子 X I I、因子 X I およびプレカリクレインの群から選択される因子である。

さらに好ましい態様では、本調製物はセリンプロテアーゼ阻害剤、例えばトロンビン阻害剤、およびその補因子、例えばヘパリンを含まない。特定の態様では、クロマトグラフィー工程の間に、すでにこのような物質を含まないになっている。

したがって、本発明はまた、本発明の方法によって得られる対応する調製物に関する。また本発明の調製物中には、さらに添加剤、例えばアミノ酸のような安定化物質が含まれていてもよい。

以下の実施例は本発明を、これらに限定することなく、より詳細に説明する。

実施例 1：因子 V I I I の測定

Moritz B. et al. (Thromb. Haemost. 1997, Suppl:31) の方法にしたがい、F E I B A 中の因子 V I I I 抗原を測定した。この測定では、F E I B A 中、捕獲抗体として、因子 V I I 分子の軽鎖に対するモノクローナル抗体を、ならびに検出抗体として、因子 V I I I 分子の軽鎖に対するモノクローナル抗体であって、異なるエピトープに対するものを用い、他の血漿タンパク質を除いて、因子 V I I I を選択的に検出する。

実施例 2：リン脂質の測定

Folch J. et al. (J. Biol. Chem. 1957, 226:497-509) の方法にしたがい、F E I B A フラクシオンの凍結乾燥剤粉末から、クロロホルム、メタノールをメタノール 1 容量に対してクロロホルム 2 容量の割合で含む溶媒混合物を用いて、構造上結合したホスフェイト (phosphate) を抽出する。次いで完全なリン脂質部分を含む抽出物をテフロン容器に移し、窒素流下で有機溶媒を蒸発させた。緩衝液 (2 0 m M トリス塩酸、1 5 0 m M N a C l、p H 7 . 4) および Oxisolv 試薬 (Merck) を加えた後、テフロン容器を強く密封し、1 6 0 で 5 時間消化した。Ames B.N. (Methods in Enzymology 1996, 8:115-118) の方法にしたがい、消化処理によって遊離したホスフェイトをモリブデン酸複合体として定量的光度測定的に検出した。

実施例 3：因子 V I I I 結合アフィニティー担体の調製

組換えフォンビルプラント因子を産生するCHO細胞クローンをFEBS Lett.1994; 351:345-348に記載のように調製する。ヒトフリンのcDNAをコードするベクターをトランスフェクションする(van den Ouweland et al., Nucleic Acids Res. 1990; 18:664)ことによって、ヒトフリンを同時発現するセルラインを作成した。灌流反応容器中、マイクロ担体上で、このような適当な細胞クローンを大規模に発酵させた

(Blüml et al., in: Spier RE, Griffith JB,

Berthold W, eds. Animal Cell technology. Oxford, London: Butterworth-Heinemann 1994: 267-269)。

10

Thromb.Haemost.1995; 73:1160に記載の二工程クロマトグラフィー法として精製を行った。食塩水での溶出により脱着させたフラクションを回収し、

Sephadex G25 (Pharmacia)でのゲルろ過により、20 mM トリス塩酸、150 mM NaClを含むpH 7.5の緩衝液に再懸濁した。次いで、Amicon YM30膜(カットオフ: 30,000 D)を介してこの調製物を超濃縮

(ultraconcentration)し、タンパク質濃度3 mg/mLに濃縮した。この調製物中のフォンビルプラント因子の濃度は総計vWF抗原60 U/タンパク質mgに達した。

20 mM トリス塩酸、150 mM NaClを含むpH 7.5の緩衝液で、組換えフォンビルプラント因子の調製物を1.5 mg/mLにまで希釈した。アフィニティークロマトグラフィーに適当な前活性化ゲル(Actigel, ALD-Superflow, from Sterogene)を、20

mM トリス塩酸、150 mM NaClを含むpH 7.5の緩衝液で何度も前洗浄した。前洗浄ゲル1容量をタンパク質溶液1.1容量と混合して固定化し、次いで0.1 M リン酸緩衝液pH 7.0中の0.1 M シアノホウ水素化物(NaCNBH_3)溶液0.15容量

を加えた。振動によりゲルをこの緩衝液に懸濁し、振動を継続しながら、室温で16時間インキュベートした。次いで、焼結吸引フィルター上、10倍容量の20 mM トリス塩酸、150 mM NaClを含むpH 7.5の緩衝液および5倍容量の20 mM トリス塩酸、2 M NaClを含むpH 7.5の緩衝液でこのゲルを洗浄した。次いで、20 mM トリス塩酸、150 mM NaClを含むpH 7.5の緩衝液5容量でこれを再び平衡化し、

直径:ゲル床の高さの寸法が1:4であるクロマトグラフィーカラムにこのゲルを移した。フォンビルプラント因子溶液およびアフィニティークルのインキュベーション上清ならびに焼結吸引フィルターで分離された洗浄溶液の溶液中のタンパク質濃度を測定することにより、用いたタンパク質の90%以上のカップリング比が測定できた。

実施例4:アフィニティークルと接触させることによる因子VIIIIを含まないプロトロンビン複合体の調製(現在、発明者が本発明の最良の実施方法であると考えているもの)医薬調製物FEIBA $\blacktriangle$ R $\blacktriangledown$ S-TIM 4 IMMNO(1000ユニット)を蒸留水20 mLに再組成した。凍結乾燥粉末を完全に溶解させた時点で、この溶液は50ユニット/mLの活性物質濃度を含んでいた。この溶液10 mLを前述の固定化フォンビルプラント因子100 mgと接触させ、穏やかに振動させながら室温で1時間インキュベートした。次いで焼結吸引フィルターを介してこの固定化物を除去した。ろ液中に含まれるFEIBA溶液は、FEIBA 49ユニット/mLの活性を有していた。調製物中に含まれる因子VIIIIを

固定化フォルピンプラント因子と結合させることによって、この調製物中の因子VIIII抗原は検出下限以下になった。

実施例5:非特異的担体への再吸着による因子VIIIIを含まない活性化プロトロンビン複合体の調製

PharmaciaのDEAE-Sephadex^R A-50 15 mgを30 g/L NaClの水溶液と、室温で15分間、膨張するまでインキュベートした。次いで、遠心により、膨張上清からこのゲルを分離した。このゲルを緩衝液(9 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、7 g/L NaCl、pH 7.0)各1 mLで5回洗浄し、さらに緩衝液(7 g/L クエン酸 $\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、7 g/L NaCl)で2回洗浄した後、また再懸濁し、遠心した。

新しい凍結ヒトクエン酸添加血漿30 mLを0から+4 で溶かし、生じたクリオ沈降物

50

を + 2 で遠心して分離した。ここから得られた「クリオ上清」を、洗浄したDEAE-Sephadex^Rとインキュベートし、FEIBAを生成させ、プロトロンビン複合体の因子、因子VIIおよび不活性タンパク質とともにゲルに吸着させた。その後、緩衝液(9 g / L Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 7 g / L NaCl)で洗浄し、同時に吸着された不活性タンパク質をDEAEゲルから除去した。

150 mg / mL トウイーン^R - 80 および 30 mg / mL NaCl の溶液 1.5 mL を用い、緩衝液で湿らせたゲルタンパク質複合体を 26 で 1 時間懸濁した。高イオン強度の溶液で処理することにより、タンパク質をプロトロンビン複合体および因子VIIとともに脱着させた。次いで、水 6.5 mL を加えて懸濁液を希釈し、室温で 1 時間再吸着させ、プロトロンビン複合体フラクションを再び吸着させた。同時に、タンパク質フラクションに含まれる少量の因子VIIのみがゲルに再吸着した。次いで、界面活性剤を含まない 7 g / L NaCl の水溶液各 1 mL でゲル / タンパク質複合体を 5 回洗浄した。溶出のため、攪拌しながら、30 g / L NaCl 水溶液 0.7 mL でゲルを処理した。この溶出液を蒸留水に対して透析し、凍らせ、凍結乾燥した。凍結乾燥物の再組成後、AT 350, 726 にしたがってFEIBA活性を測定した。

さらに因子VII抗原含量を測定した。コントロールとして、AT 350, 726 に記載の一般に製造されるFEIBA調製物を用いた。記載の方法にしたがって回収された調製物は、因子VII含量がコントロールと比べて 1 / 10 であった。

界面活性剤と接触させることにより、存在する可能性がある病原体、特に脂質包膜ウイルスを不活化した。

実施例 6 : 非特異的担体への再吸着による、因子VIIを含まず、リン脂質を含まない活性化プロトロンビン複合体の調製

30 g / L NaCl の水溶液 1 mL とともに、室温で 15 分間、DEAE-Sephadex^R A-50 (Pharmacia) 15 mg を膨張するまでインキュベートした。次いで、遠心により膨張上清からゲルを分離した。この後、このゲルを緩衝液(9 g / L Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 7 g / L NaCl, pH 7.0) 各 1 mL で 5 回洗浄し、緩衝液(7 g / L クエン酸 Na₃ · 2 H₂O, 7 g / L NaCl) でさらに 2 回洗浄し、さらに再懸濁し、遠心した。

新しい凍結ヒトクエン酸添加血漿 30 mL を 0 から + 4 で溶かし、生じたクリオ沈降物を + 2 で遠心して分離した。ここから得られた「クリオ沈降物」を洗浄されたDEAE-Sephadex^Rとインキュベートし、FEIBAを生産し、プロトロンビン複合体の因子、因子VII、リン脂質および不活性タンパク質とともにゲルに吸着させた。その後、緩衝液(9 g / L Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 7 g / L NaCl)で洗浄し、同時に吸着された不活性タンパク質をDEAEゲルから除去した。

1 mg / mL トウイーン^R - 80 および 30 mg / mL NaCl の溶液 1.5 mL を用い、緩衝液で湿らせたゲルタンパク質複合体を室温で 1 時間懸濁し、タンパク質フラクションおよび非特異的に吸着された不純物を脱着させた。次いで、ろ過によりゲルを分離した。今度はトウイーン^R - 80 をさらに加えて、この溶液の界面活性剤濃度を 150 mg / mL にした後、これを 40 で 1 時間、攪拌しながらインキュベートした。次いで、水 6.5 mL を加えてこれを希釈し、新しく洗浄され調製されたDEAE-Sephadex^R A-50ゲルを再吸着させ、プロトロンビン複合体フラクションを再吸着させた。同時に、タンパク質フラクションに含まれる少量の因子VIIのみがゲルに結合した。次いで、界面活性剤を含まない 7 g / L NaCl 水溶液各 1 mL でこれを 5 回洗浄した。そのようにして、また両親媒性物質と接触させたことにより可溶化状態で存在する結合リン脂質を除去した。溶出のため、攪拌しながら、30 g / L NaCl 水溶液 0.7 mL でゲルを処理した。この溶出液を蒸留水に対して透析し、凍らせ、凍結乾燥した。凍結乾燥物の再組成後、AT - B 350, 726 にしたがってFEIBA活性を測定した。

さらに記載のように因子VII抗原含量およびリン脂質を測定した。コントロールとして、AT 350, 726 にしたがって回収された、一般的に製造されるFEIBA調製物を用いた。記載の方法にしたがって得られた調製物は、因子VII含量がコントロールと比べて減少しており、リン脂質を含んでいなかった。分析の結果を表 1 にまとめる。

表 1

FEIBA : FVIII / リン脂質含量

	FEIBA	FVIII:Ag	$\frac{\text{FVIII:Ag}}{\text{FEIBA}}$	リン脂質
	U/mL	U/mL	U/U	ホスファイド nM / FEIBA U
FEIBA (標準)	51	7.0	0.14	0.14
FEIBA (発明産物)	70	1.0	0.01	<0.02

フロントページの続き

(72)発明者 トゥレツェック、ペーター
オーストリア、アー—3 4 0 0 クロスターノイブルク、ヴァイトリング、ハウプトシュトラッセ5
9ゲ—番

審査官 川口 裕美子

(56)参考文献 特開平07-145075(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 38/36