

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-509593

(P2017-509593A)

(43) 公表日 平成29年4月6日 (2017. 4. 6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 1/22 (2006.01)	C O 7 K 1/22	4 C O 8 4
C O 7 K 14/755 (2006.01)	C O 7 K 14/755	4 H O 4 5
C O 7 K 1/18 (2006.01)	C O 7 K 1/18	
C O 7 K 1/20 (2006.01)	C O 7 K 1/20	
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 37/48	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-547543 (P2016-547543)	(71) 出願人	500376704 オクタファルマ・アーゲー
(86) (22) 出願日	平成27年1月20日 (2015. 1. 20)		スイス国、ラーヘン、CH-8853、ザイデンシュトラッセ 2
(85) 翻訳文提出日	平成28年7月20日 (2016. 7. 20)	(74) 代理人	100079049 弁理士 中島 淳
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/051028	(74) 代理人	100084995 弁理士 加藤 和詳
(87) 国際公開番号	W02015/107222	(72) 発明者	ヴィンゲ、 シュテファン
(87) 国際公開日	平成27年7月23日 (2015. 7. 23)		スウェーデン国 エス-11275 ストックホルム ノルデンフライヒツヴァーゲン 55 オクタファルマ アーペー内
(31) 優先権主張番号	14151769.8		
(32) 優先日	平成26年1月20日 (2014. 1. 20)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F V I I I : C / F V I I I : A g の改良された比を有する第 V I I I 因子を製造するための方法

(57) 【要約】

第 V I I I 因子製品中における F V I I I : C / F V I I I : A g の比が 0. 7 以上である第 V I I I 因子製品を、クロマトグラフィーを使用して製造するための方法であって、少なくとも 1 つのクロマトグラフィー工程が、

・親和性クロマトグラフィー樹脂上に固定化されている親和性リガンドにより、第 V I I I 因子に特異的に結合する親和性、を有する親和性クロマトグラフィー樹脂であって、前記親和性リガンドが、第 V I I I 因子分子に対する 13 k D の酵母由来 F a b 抗体断片である、親和性クロマトグラフィー樹脂、

・陰イオンクロマトグラフィー樹脂、

・サイズ排除樹脂、

を用いることにより実施される、前記方法。

98%以上の単量体含有量を有する、血友病を治療するため、およびインヒビターの形成を回避するための、前記方法により得られる第 V I I I 因子製品。

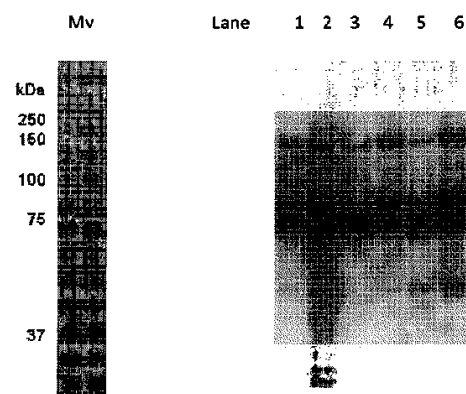


Fig.1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 V I I I 因子製品中における F V I I I : C / F V I I I : A g の比が 0.7 以上である第 V I I I 因子製品を、クロマトグラフィーを使用して製造するための方法であって、少なくとも 1 つのクロマトグラフィー工程が、親和性クロマトグラフィー樹脂上に固定化された親和性リガンドにより第 V I I I 因子に特異的に結合する親和性を有する親和性クロマトグラフィー樹脂を用いることにより実施され、前記親和性リガンドが、第 V I I I 因子分子に対する 13 k D の酵母由来 F a b 抗体断片である、方法。

【請求項 2】

0.7 以上である F V I I I : C / F V I I I : A g の比を増加させ、98% 以上という高い第 V I I I 因子単量体含有量および実質的に凝集していない第 V I I I 因子を提供する方法であって、少なくとも 1 つのクロマトグラフィー工程が、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂上で少なくとも 1 つのクロマトグラフィー工程を用いることにより実施される方法。

【請求項 3】

0.7 以上である F V I I I : C / F V I I I : A g の比を増加させ、99% 以上という高い第 V I I I 因子単量体含有量および実質的に凝集していない第 V I I I 因子を提供する方法であって、少なくとも 1 つのクロマトグラフィー工程が、サイズ排除クロマトグラフィー工程を用いることにより実施される方法。

【請求項 4】

第 V I I I 因子分子が軽鎖と重鎖の複合体であり、F V I I I : C / F V I I I : A g の改良された比が、第 V I I I 因子軽鎖、第 V I I I 因子重鎖、および／または前記複合体から解離した第 V I I I 因子軽鎖／第 V I I I 因子重鎖の除去に起因する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記クロマトグラフィー工程が、第 V I I I 因子が親和性樹脂と結合し、かつ、解離した軽鎖が第 V I I I 因子の溶出の前に洗い流される条件下で実施されるものであって、

0.1 ~ 0.5 mol / kg の塩化ナトリウムの濃度に相当する低塩条件下で前記第 V I I I 因子と前記親和性クロマトグラフィー樹脂との結合が生じ、

前記軽鎖の除去のために、0.3 ~ 4 mol / kg の塩化ナトリウムの範囲の増加させた塩濃度下で、前記親和性クロマトグラフィー樹脂を洗浄し、

任意に、0.5 ~ 4 mol / kg の塩化ナトリウムの範囲の塩濃度と 40 ~ 60 % のエチレングリコールとを組み合わせる用いることによって、第 V I I I 因子を別の画分中に溶出および収集しても良い、

請求項 1 または請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記親和性樹脂が、平均粒子サイズが 74 μ m の架橋アガロスマトリクスをベースとし、前記 13 k D の酵母由来 F a b 抗体断片親和性リガンドは、親水性スパーアームを介してマトリクスと結合してリガンドが第 V I I I 因子分子とより結合しやすくなり、前記親和性リガンドが、生物学的に活性である第 V I I I 因子分子の第 V I I I 因子軽鎖と結合する、請求項 1、請求項 4、または請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

親和性クロマトグラフィーの条件が、以下の条件のうち少なくとも 2 つを含む、請求項 1 および請求項 4 ~ 請求項 6 のうち少なくとも一項に記載の方法；

—生物学的に活性な第 V I I I 因子の樹脂ロードが、少なくとも 5000 IU / mL 樹脂である、好ましくは少なくとも 10,000 IU / mL 樹脂である、最も好ましくは 20,000 IU / mL 樹脂を超える、

—第 V I I I 因子ロード；pH 6.2 ~ 6.8 で、0.1 ~ 0.5 mol / kg の NaCl、0.01 ~ 0.05 mol / kg の CaCl₂、0.01 ~ 0.05 mol / kg の L-ヒスチジン、0.005 ~ 0.05 % (w / w) のポリソルベート 80、0.5 ~ 2

10

20

30

40

50

%のTriton X-100、0.1～1%のTNBP、
 ー洗浄；pH6.2～6.8で、0.5～4mol/kgのNaCl、0.01～0.05mol/kgのCaCl₂、0.01～0.05mol/kgのL-ヒスチジン、0.005～0.05% (w/w)のポリソルベート80、
 ー第VII因子の溶出；pH6.2～6.8で、0.5～4mol/kgのNaCl、40～60%のエチレングリコール、0.01～0.05mol/kgのCaCl₂、0.01～0.05mol/kgのL-ヒスチジン、0.005～0.05% (w/w)のポリソルベート80。

【請求項8】

前記親和性クロマトグラフィー樹脂が、架橋アガロースベースマトリクスである、請求項1および請求項4～請求項7のうち少なくとも一項に記載の方法。

【請求項9】

前記親和性リガンドが、FVIIの軽鎖部分と結合してFVIIの軽鎖部分を特異的に除去する、請求項1および請求項4～請求項8のうち少なくとも一項に記載の方法。

【請求項10】

陰イオン交換クロマトグラフィーを、第VII因子が陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂と結合し、かつ、生物学的活性型第VII因子の溶出の前または後いずれかにおいて、生物学的不活性型が陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂から除去される条件下で実施する方法であって、

第VII因子を結合させ、かつ、不活性型第VII因子を除去するために、0.01～0.15mol/kgの塩化ナトリウムの濃度に相当する低塩条件下で、第VII因子をロードし、

不活性型第VII因子を除去するために、0.15～0.3mol/kgの塩化ナトリウムの濃度に相当する中程度の塩条件下で、前記陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂を洗浄し、

0.3～1mol/kgの塩化ナトリウムの濃度に相当する高い塩条件を用いることによって、前記陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂から別の画分中にインタクトな単量体の第VII因子を溶出および収集する、

請求項2に記載の方法。

【請求項11】

陰イオン交換クロマトグラフィー工程によって、生物学的不活性型第VII因子を除去し、単量体製品画分は、以下のクロマトグラフィーの条件のうち少なくとも2つを含むことにより得られる、請求項2または請求項10に記載の方法：

ー生物学的に活性な第VII因子の樹脂ロードが、少なくとも10,000IU/mL樹脂である、好ましくは少なくとも15,000IU/mL樹脂である、最も好ましくは20,000IU/mL樹脂を超える；

ー第VII因子のローディング条件；pH6.0～7.5、0.05～0.15mol/kgのNaCl、0.01～0.05mol/kgのCaCl₂、0.01～0.05mol/kgのL-ヒスチジン、0.005～0.05% (w/w)のポリソルベート80；

ー洗浄条件；pH6.0～7.5で、0.15～0.3mol/kgのNaCl、0.01～0.05mol/kgのCaCl₂、0.01～0.05mol/kgのL-ヒスチジン、0.005～0.05% (w/w)のポリソルベート80；

ー第VII因子の溶出条件；pH6.0～7.5で、0.3～0.5mol/kgのNaCl、0.01～0.05mol/kgのCaCl₂、0.01～0.05mol/kgのL-ヒスチジン、0.005～0.05% (w/w)のポリソルベート80。

【請求項12】

前記陰イオン交換樹脂が、球径が45～165μmの架橋6%アガロースマトリクスと結合しているリガンドとして4級アミンイオンを有し、0.18～0.25mmol/mLの総イオン結合能力を有する強陰イオン交換体である、請求項2、請求項10、または

請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記サイズ排除クロマトグラフィー工程が、以下のクロマトグラフィー条件のうち少なくとも2つを含む、請求項 3 に記載の方法：

－カラム体積の 4～8 % のサンプルロード、

－60～90 cm のカラム高、

－少なくとも 10,000 IU/mL である、好ましくは少なくとも 15,000 IU/mL である、最も好ましくは 20,000 IU/mL を超える、サンプルロード中の生物学的に活性な第 V I I I 因子の濃度、

－pH 6.0～7.5 で、0.2～0.7 mol/kg の NaCl、0.01～0.05 mol/kg の CaCl₂、0.01～0.05 mol/kg のクエン酸ナトリウム、0.5～2 % (w/w) のスクロース、0.5～2 % (w/w) の L-アルギニン、0.1～1 % (w/w) のポロキサマー 188、である、不活性型第 V I I I 因子の最適な凝集のためのカラム平衡化バッファー

ここで、生物学的に活性な第 V I I I 因子は単量体型で収集され、一方、不活性型第 V I I I 因子は、サイズ排除クロマトグラフィー工程の凝集体ピーク画分および／または断片ピーク画分のいずれかに見出されるものである、

－第 V I I I 因子単量体の収集を、カラムの後で 30～40 mAU の吸光度ピークが記録されたときに始め、吸光度ピークが 1～40 mAU に戻ったときに止め、前記第 V I I I 因子単量体の収集がサンプル添加量の 2～3 倍に相当する。

【請求項 14】

サイズ排除クロマトグラフィー樹脂が、平均直径が 34 μm、最適分離範囲が 10,000～600,000 ダルトンの球状架橋アガロース／デキストラン媒体である、請求項 3 または請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

請求項 1～請求項 14 のうち少なくとも一項に記載の方法により得られる、血友病を治療しインヒビターの形成を回避するための第 V I I I 因子製品であって、少なくとも 6 ヶ月間、好ましくは少なくとも 12 ヶ月間、より好ましくは少なくとも 24 ヶ月間、最も好ましくは 36 ヶ月まで、凍結および／または凍結乾燥条件で安定である、製品。

【請求項 16】

最終工程後に、第 V I I I 因子の総量 (F V I I I : A g) に対する生物学的に活性な第 V I I I 因子 (F V I I I : C) の割合が 0.7 以上、好ましくは 0.8 以上、より好ましくは 0.9 以上、最も好ましくは 1 であり、前記第 V I I I 因子単量体含有量が、98 % 以上、好ましくは 99 % 以上、最も好ましくは 100 % であることと、凝集型第 V I I I 因子が実質的に検出できないこととを特徴とする、請求項 14 に記載の第 V I I I 因子。

【請求項 17】

生物学的活性を維持し、高い単量体第 V I I I 因子含有量および低い凝集型第 V I I I 因子含有量を特徴とする、請求項 15 または請求項 16 に記載の製品。

【請求項 18】

前記第 V I I I 因子の分子が、血漿由来、組み換え体由来、および／または欠失誘導体もしくは切断型の生物学的活性を有する第 V I I I 因子であり、特に B ドメインが欠失した F V I I I であることを特徴とする、請求項 15～請求項 17 のうち少なくとも一項に記載の製品。

【請求項 19】

請求項 15～請求項 18 のうち少なくとも一項に記載の製品であって、組み換え体由来および／または欠失誘導体である場合に、ヒト細胞で生産される、製品。

【請求項 20】

請求項 15～請求項 19 のうち少なくとも一項に記載の製品であって、治療歴のある血友病 A 患者または治療歴のない血友病 A 患者を前記製品で治療したときにおけるインヒビ

10

20

30

40

50

ターの量が、25%未満、好ましくは20%未満、より好ましくは10%未満、最も好ましくは0%であることを特徴とする、製品。

【請求項21】

低温凍結形態、特に -50°C ～ -80°C の低温凍結形態、または凍結乾燥形態である、請求項15～請求項20のうち少なくとも一項に記載の製品。

【請求項22】

少なくとも1つの凍結保護物質、少なくとも1つの増量剤、および／または緩衝剤が存在する、請求項21に記載の製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、第VII因子製品中でFVII:C/FVII:A gの改良された比を有する第VII因子製品を、クロマトグラフィーを使用して製造するための方法、および、本発明の方法により得られる98%以上の単量体含有量を有する製品を含む薬剤に関する。

【背景技術】

【0002】

未変性の第VII因子分子は、通常の循環の条件下で、軽鎖（完全長血漿由来型FVII、およびBドメイン欠失型FVII；80kDaの両方について）および重鎖（200kDaの完全長血漿由来型または組み換え体由来型第VII因子について、および90kDaのBドメイン欠失組み換え型第VII因子について）を有する複合体である。重鎖と軽鎖の会合の正確な条件は、詳細には分からないが、論文では、疎水性相互作用を伴って複合体を形成し、複合体と結合する金属イオン架橋の関与が推定されている。カルシウム、銅、亜鉛、マンガン等を含む様々な金属イオンが、相互作用に関与すると推定されている。⁽¹⁾ 近年開発されたBドメイン欠失組み換え型第VII因子製品に関して、分子が、3つの金属イオン；カルシウム、銅、および亜鉛を含むことが述べられている。⁽²⁾ 金属架橋がなく、第VII因子分子の軽鎖と重鎖だけでは、生物学的活性を有しないが、抗原活性は有している。いくつかの出版物^(3、4)において、インヒビター形成の、特に第VII因子軽鎖に対するインヒビター形成の生体内でのリスクがあることが発表されている。従って、患者に注射する第VII因子製品において、特に第VII因子軽鎖については、一本の軽鎖と重鎖はできるだけ少ない量で存在するべきであり、FVII:C/FVII:A gの活性の比は、1.0(1)⁽⁵⁾に近くあるべきである。

20

30

【0003】

一般的に、タンパク質の凝集化は、所望の製品の損失だけでなく、インヒビター形成の可能性の点からも、精製工程におけるリスク因子である⁽⁶⁾。特定の生化学的条件下で、組み換え型第VII因子は凝集する場合があります^(7、8)、これにより、生物学的活性が著しく減少することがある。従って、凝集型第VII因子を有する第VII因子製品は、不活性型第VII因子を含み、単量体含有量100%未満を有することがある。タンパク質医薬品の単量体含有量は、100%に近く、できるだけ少ない量の不活性型第VII因子（凝集体、断片等）を有すべきである。

40

【0004】

血漿から、または第VII因子（rFVII）を組み換えにより産生する培養物から第VII因子を精製するための多くの方法が記載されている。一例として、国際公開第2009/156430号は、第VII因子の精製のための一連のクロマトグラフィー工程を開示しており、13kダルトンのリガンドが第VII因子軽鎖と結合する、非動物由来Fabをベースとする親和性工程が含まれている。この出願で記載されているその他のクロマトグラフィー工程としては、陰イオンおよび陽イオンが混合された状態の樹脂、陽イオン交換、陰イオン交換、およびゲルろ過が挙げられる。不活性型の除去、または第VII因子の凝集体の含有量に関する情報は、この特許出願では全く提供されてい

50

ない。Purification and characterization of a new recombinant factor VIII⁽⁹⁾ という論文で、4つの工程の第V I I I因子のクロマトグラフィー精製方法が記載されており、第V I I I因子重鎖と結合するリガンドとしてのモノクローナル抗体を用いる親和性工程が含まれている。その他の3つの工程は、混合された形態のクロマトグラフィー樹脂、陰イオン交換樹脂、およびゲルろ過工程である。不活性型の除去、または第V I I I因子の凝集体の含有量に関する情報は、この論文では全く与えられていない。Development and validation of an affinity chromatography step using a peptide ligand for cGMP production of Factor V I I I⁽¹⁰⁾ という論文において、5つの工程のクロマトグラフィー方法が記載されており、2.7 kダルトンのリガンドが第V I I I因子軽鎖と結合する、ペプチドをベースとする親和性工程が含まれている。ペプチド親和性樹脂の洗浄の間に培養工程からの過剰な第V I I I因子軽鎖を除去することが、記載されている。その他の4つのクロマトグラフィー工程は、陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂、疎水性相互作用樹脂、およびゲルろ過工程である。ペプチド親和性樹脂の後の2つのクロマトグラフィー工程が、過剰な第V I I I因子軽鎖を除去するが、どの工程なのかについてさらに明確にはされていない。第V I I I因子軽鎖以外のその他の不活性型の除去、または第V I I I因子の凝集体の含有量に関する情報は、この論文では全く提供されていない。application for a novel affinity adsorbent for the capture and purification of re-combinant Factor V I I I compounds⁽¹¹⁾ という論文において、F a bをベースとする13 kダルトンのリガンド親和性樹脂が、第V I I I因子の精製のために記載されており、不活性型の除去、または第V I I I因子の凝集体の含有量に関する情報は、この論文では全く提供されていない。

10

20

【0005】

論文に記載されているように⁽⁵⁾、⁽¹²⁾、市販の組み換え型第V I I I因子製品は、不活性型第V I I I因子を含み、不活性型第V I I I因子は、第V I I I因子の総量（第V I I I因子：A g）に対する生物学的に活性な第V I I I因子（第V I I I因子：C）の比により測定され、免疫反応に関して患者に負の効果を与える可能性がある。

【0006】

生物学的に活性な第V I I I因子は、生体内の通常の条件下で、止血のための凝固カスケードの重要な部分である酵素反応を通して、第V I I I a因子へと活性化され得る、第V I I I因子活性を有する第V I I I因子として定義される。生物学的に活性な第V I I I因子は、例えば、F V I I I発色アッセイおよび／または1段階凝固アッセイといった、様々なインビトロの分析方法で測定することができる（F V I I I：C）。⁽¹³⁾ 発色アッセイは、第V I I I因子の生物学的活性を補助因子として測定する2段階の測光法である。第V I I I因子は、第X因子を第X a因子へと活性化し、第X a因子は、分光光度的に定量化することができる生成物へと酵素的に順次切断される。1段階の凝固アッセイは、リン脂質、接触活性化因子、およびカルシウムイオンの存在下で第V I I I因子欠損血漿の凝固時間を補正する、第V I I I因子を含むサンプルの能力に基づく。フィブリン凝塊が出現する時間を1工程で測定する。

30

【0007】

国際公開第A-2008/134310号は、組み換え型タンパク質のバルク溶液を凍結保存のために安定化するための方法を開示し、この方法は、少なくとも100 mMの1価の塩の濃度を有する、組み換え型タンパク質の部分的に精製された溶液を提供すること、および、凍結の際に溶液が-56℃以上のガラス転移温度を有するのに十分な量で炭水化物を前記溶液に加えることを含む。

40

【0008】

国際公開第2010/115866A1号は、ヒト第V I I I因子またはその生物学的活性部分と著しい同一性（相同性）を有する、少なくとも1つのアミノ酸配列を含む分子およびポリペプチド、関連分子（このようなポリペプチドをコードする核酸等）、このようなポリペプチドを含む組成物（医薬製剤等）、ならびに、このようなポリペプチドの製造方法および使用方法を開示している。

50

【0009】

国際公開第97/33178A1号は、第V I I I因子を含むタンパク質画分の適合性を検査するための方法を開示し、第V I I I因子を含むタンパク質画分のさらなる処理は、殺菌段階を含み、20～50 kDの範囲の断片に関して出発材料を検査することを含む。この範囲における第V I I I因子断片は、第V I I I因子で治療歴のある患者において、インヒビター形成を明らかに引き起こす。これらの断片で汚染されたバッチでさえも、親水性材料を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを適用することによって、極めて純粋なウイルスフリーの第V I I I因子を製造するために使用することができる。

【0010】

U S 4, 675, 385 Aは、連続的な高性能サイズ排除クロマトグラフィーを使用して、最初に低い塩濃度条件下で、2番目に高い塩濃度条件下で再構成した市販の第V I I I因子：C（複合体化第V I I I因子）濃縮物から、ヒト、ウシ、およびブタの凝血促進性タンパク質である第V I I I因子をラージスケールで精製するための高速かつ単純な方法を開示している。クロマトグラフィー分離を、約13～約35ミクロの粒子サイズ、約500～約2000オングストロームの孔径、1グラム当たり約1.0～約1.8 mLの孔容積を有する多孔ビーズを充填した高性能サイズ排除クロマトグラフィーカラムで実施する。緩衝水溶液を溶出剤として使用して、第1のクロマトグラフィー分離を緩衝水溶液で実施する。分子量の小さい成分（不純物）を、第V I I I因子および分子量の大きい成分（不純物）から分離する。第V I I I因子が約0.25～約0.45 Mのカルシウムイオン濃度を有する緩衝溶液中で解離された後に、第2のクロマトグラフィー分離を実施しても良い。第1のカラムと同様に、第2のクロマトグラフィーカラムに充填物を詰め、0.25～0.45 Mのカルシウムイオンを含む緩衝水溶液で溶出する。2.5×60 cmのカラムにおいて、4 gmsの市販の第V I I I因子の濃縮物は、2時間未満で精製され得る。方法は、スケールアップが可能である。

【0011】

E P 0 412 466 A2は、比活性と安定性が高い、殺菌された第V I I I因子濃縮物を調製するための方法を開示し、記載され、A l (O H)₃、陰イオン交換体、またはC a₃ (P O 4)₂を使用する、好ましくはこの群からの2つの異なる吸着剤を使用する、少なくとも2つの吸着作用によって、第V I I I因子を含む溶液から吸着された不純物を含む。

【0012】

F R 2 650 393 A1は、比活性を有する第V I I I因子濃縮物と高い収率を得ることを開示し、前記濃縮物は、非ヒト起源の外來性タンパク質を含まない。任意の方法により得られた第V I I I因子を、第1のバッファーで事前に平衡化された陰イオン交換ゲルを含むカラムに蓄積させる。第V I I I因子をカラムに添加した後、0.1未満の光学密度が得られるまで、ゲルを第2のバッファーで洗浄する。次に、第3のバッファーで、精製した第V I I I因子をゲルから遊離させる。クロマトグラフィー後、比活性は、30/1600 IU/mgである。

【0013】

Cheng, Elisabeth et al., discloses in Biotechnology Letters, v.32, n.9, p.1207-1214, 2010では、陰イオン交換クロマトグラフィーを使用し、次いで、ゲルろ過を使用して、ヒトF V I I Iを血漿から直接精製した。3つのQ-Sepharose樹脂を試験し、Q-Sepharose XL樹脂の使用では40%のF V I I I活性の回収、Q-Sepharose Fast Flowの使用では約80%のF V I I I活性の回収、Q-Sepharose Big Beadsの使用では70%のF V I I I活性の回収がもたらされた。ビタミンK依存性凝固因子が陰イオン交換カラムからF V I I Iと共に溶出された。第2の精製工程において、Sepharose 6FFを使用した場合、ビタミンK依存性因子が無くなり、70%のF V I I I活性が回収された。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明の課題は、特に組み換えにより製造された第V I I I因子に関して、第V I I I因子の製造方法において単独の軽鎖と重鎖の量を減少させる方法を提供すること、および、単量体含有量の高い製品を提供することである。本発明の他の課題は、単独の軽鎖と重鎖（断片）、および凝集型第V I I I因子が除去されていることができ、得られる実質的な単量体第V I I I因子溶液が、高い単量体第V I I I因子含有量を維持しながら、凍結および／または凍結乾燥状態で数年間保存され得る、組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0015】

第V I I I因子製品中において、F V I I I : C / F V I I I : A gの比が0.7以上であり高い単量体含有量を有する第V I I I因子製品を、クロマトグラフィーを使用して製造するための方法が、本発明の課題を解決することができることを本発明の発明者が発見したことは、驚くべきことである。本発明の方法は、親和性クロマトグラフィー樹脂上に固定化されている親和性リガンドにより、第V I I I因子に特異的に結合する親和性を有する親和性クロマトグラフィー樹脂を用いることにより、少なくとも1つのクロマトグラフィー工程を実施する作業であって、前記親和性リガンドが、第V I I I因子分子に対する13kDの酵母由来F a b抗体断片である作業を含む。

【0016】

前記親和性リガンドは、F V I I I分子の軽鎖部分と結合する。驚くべきことに、第V I I I因子の軽鎖と重鎖により形成されている複合体の未変性の第V I I I因子、およびF V I I Iの生物学的活性を全く有しない単独のF V I I I軽鎖、を含む混合物を含む溶液中において、生物学的凝固活性を全く有しないF V I I I軽鎖を、特定の洗浄条件を用いて前記親和性樹脂上で処理することによって、混合物から除去することができる。当業者であれば、かなりの量の未変性の第V I I I因子分子、すなわち重鎖と軽鎖の複合体も除去されることを予想するであろう。

【0017】

具体的には、前記リガンドは、親水性スパーサーアームを介して親和性クロマトグラフィー樹脂上に固定化されており、前記樹脂は、架橋アガロースベースマトリクスであり、前記親和性リガンドは、第V I I I因子分子に対する13kDの酵母由来F a b抗体断片であり、G E H e a l t h c a r eから商標名V I I I S e l e c tとして市販されている。

【0018】

あるいは、0.7以上のF V I I I : C / F V I I I : A gの比を提供するため、および高い第V I I I因子単量体含有量をもたらすための方法であって、少なくとも1つのクロマトグラフィー工程が、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂上で少なくとも1つのクロマトグラフィー工程を用いる手段により実施される前記方法によって、課題が達成される。

【0019】

本発明の別の選択肢において、0.7以上のF V I I I : C / F V I I I : A gの比と、高い第V I I I因子単量体含有量を与えるための方法が開示され、少なくとも1つのクロマトグラフィー工程は、特定のクロマトグラフィー条件とバッファー組成の下でサイズ排除クロマトグラフィー工程を用いる手段により実施される。

【0020】

本発明の別の選択肢において、F V I I I : C / F V I I I : A gに関して同じクロマトグラフィー工程除去を使用し、第V I I I因子製品の後の単量体含有量は、98%以上である。

【0021】

本発明のさらなる選択肢において、前のクロマトグラフィー工程から得られる高いF V I I I : C / F V I I I : A gの比と高いF V I I I : 単量体含有量は、少なくとも12ヶ月間、好ましくは少なくとも24ヶ月間、最も好ましくは少なくとも36ヶ月間、凍結

10

20

30

40

50

および／または凍結乾燥状態で、F V I I I : C / F V I I I : A g および／または高い第 V I I I 因子単量体含有量の特性が変化しないまま、患者に使用されるまで保存することができる。

【0022】

本発明の3つの方法のうち2つの方法を組み合わせた場合、少なくとも0.8のF V I I I : C / F V I I I : A g の比を達成することができ、3つ全てを組み合わせた場合、少なくとも0.9の比が可能となる。

【0023】

例えば、本発明の方法は、0.7以上のF V I I I : C / F V I I I : A g の比を有し、98%以上という高い第 V I I I 因子単量体含有量である第 V I I I 因子製品、および実質的な非凝集型第 V I I I 因子製品を、クロマトグラフィーを使用して製造する方法によって表される。

前記方法において、

工程(a)親和性クロマトグラフィー樹脂上に固定化されている親和性リガンドによる、第 V I I I 因子に特異的に結合する親和性を有する親和性クロマトグラフィー樹脂を用いることにより、少なくとも1つのクロマトグラフィー工程を実施する。本発明の方法で前記親和性リガンドは前記第 V I I I 因子分子に対する13kDの酵母由来F a b 抗体断片である。

工程(b)陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂上で少なくとも1つのクロマトグラフィー工程を実施する。工程の順序は、(a)の後に(b)、または(b)の後に(a)であっても良い。

【0024】

本発明によれば、0.7以上のF V I I I : C / F V I I I : A g の比を有し、98%以上という高い第 V I I I 因子単量体含有量である第 V I I I 因子製品、および実質的な非凝集型第 V I I I 因子製品を、クロマトグラフィーを使用して製造するための以下の方法を実施することも可能である。

前記方法において、

工程(a)親和性クロマトグラフィー樹脂上に固定化されている親和性リガンドによる、第 V I I I 因子に特異的に結合する親和性を有する親和性クロマトグラフィー樹脂を用いることにより、少なくとも1つのクロマトグラフィー工程を実施する。本発明の方法で前記親和性リガンドは、前記第 V I I I 因子分子に対する13kDの酵母由来F a b 抗体断片である。

工程(c)少なくとも1つのクロマトグラフィー工程を、サイズ排除クロマトグラフィー工程を用いることにより実施する。工程の順序は、(a)の後に(c)、または(c)の後に(a)であっても良い。

【0025】

本発明によれば、0.7以上のF V I I I : C / F V I I I : A g の比を有し、98%以上という高い第 V I I I 因子単量体含有量を与える第 V I I I 因子製品、および実質的な非凝集型第 V I I I 因子製品を、クロマトグラフィーを使用して製造するための以下の方法を実施することも可能である。

前記方法において、

工程(b)陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂上で少なくとも1つのクロマトグラフィー工程を実施する。

工程(c)少なくとも1つのクロマトグラフィー工程を、サイズ排除クロマトグラフィー工程を用いることにより実施する。工程の順序は、(b)の後に(c)、または(c)の後に(b)であっても良い。

【0026】

さらなる他の実施形態は、本発明の3つの方法の組み合わせである。そして、例えば、本発明の方法は、0.9以上のF V I I I : C / F V I I I : A g の比を有し、99%以上という高い第 V I I I 因子単量体含有量である第 V I I I 因子製品、および実質的な非

凝集型第V I I I因子製品を、クロマトグラフィーを使用して製造するための方法によって表される。

前記方法において、

工程（a）親和性クロマトグラフィー樹脂上に固定化されている親和性リガンドによる、第V I I I因子に特異的に結合する親和性を有する親和性クロマトグラフィー樹脂を用いることにより、少なくとも1つのクロマトグラフィー工程を実施する。本発明の方法で前記親和性リガンドは、前記第V I I I因子分子に対する13kDの酵母由来Fab抗体断片である。

工程（b）陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂上で少なくとも1つのクロマトグラフィー工程を実施する。

工程（c）少なくとも1つのクロマトグラフィー工程を、サイズ排除クロマトグラフィー工程を用いることにより実施する。工程の順序は、（a）、（b）、（c）；（a）、（c）、（b）；（c）、（b）、（a）；（c）、（a）、（b）；（b）、（c）、（a）；（b）、（a）、（c）であっても良い。

【0027】

本発明によれば、本発明の方法で使用される第V I I I因子分子は、軽鎖と重鎖の複合体であり、F V I I I : C / F V I I I : A gの改良された比は、第V I I I因子軽鎖、第V I I I因子重鎖、および／または複合体からの解離した第V I I I因子軽鎖／第V I I I因子重鎖が除去されていることに起因する。解離した第V I I I因子鎖は、変異、タンパク質分解性変性／物理的変性等、または精製方法の間の酵素的変性／物理的変性のいずれかにより、培養生成プロセスから生じて存在し得る。解離したF V I I I軽鎖および／またはF V I I I重鎖は、例えば、バッファー、タンパク質濃度等の環境に依存して、第V I I I因子断片、および／または第V I I I因子凝集体のいずれかを形成する。従って、単量体ではない、および／または未変性の形態の第V I I I因子よりも凝集体を形成しやすい可能性のある、全ての形態の第V I I I因子を除去することが、有益である。

【0028】

本発明の他の態様によれば、方法で使用される第V I I I因子分子は、第V I I I因子製品の半減期の延長について改良するために、例えば、v W F、P E G、H E S、および／または抗体のF_C断片等の他の物質と非共有結合的に結合していてもよく、および／または共有結合していてもよく、最終製品の生物学的活性が高い比と高い単量体含有量を有するという、本発明の同じ解決に到達する。

【0029】

本発明の特定の実施形態において、親和性クロマトグラフィー工程を、第V I I I因子と親和性樹脂の結合を与える条件、および、第V I I I因子を溶出する前に解離した軽鎖を洗い流すことによって除去される条件の下で実施する。第V I I I因子と親和性クロマトグラフィー樹脂の結合は、約0.1～約0.5mol/kgの塩化ナトリウムの濃度に相当する低塩条件下で生じる。次に、約0.3～約4mol/kgの範囲の塩化ナトリウムに相当する高められた塩濃度の下で、親和性クロマトグラフィー樹脂の洗浄を軽鎖の除去のために実施し、その後所望により、約0.5～約4mol/kgの範囲内の塩化ナトリウムおよび／またはMgCl₂に相当する塩濃度を約40～約60%のアルコール、好ましくは、エチレングリコールもしくはプロピレングリコール、またはそれらの混合物と組み合わせて用いることによって溶出と収集の工程を実施して、分離画分中に第V I I I因子を得ても良い。

【0030】

親和性樹脂は、第V I I I因子分子の他の部分ではなく軽鎖と結合するように設計されている。このことは、特定のサイズの親和性リガンドを使用することによって、可能となった。小さすぎる親和性リガンド、例えば化学合成した分子は、立体障害に起因して、場合によって、標的タンパク質への結合が難しいことが知られている。従って、本発明に必要とされる親和性リガンドのサイズは、10kダルトン以上の範囲内にある。このサイズのFab断片分子に想定される強い親和性のため⁽¹⁴⁾、および、リガンドがF V I I

10

20

30

40

50

I 軽鎖に対するものであることのため、F V I I I 重鎖を含む未変性の複合体が F V I I I 軽鎖と共に溶出される前に、F V I I I 軽鎖を洗い流すことができることは驚くべきことであった。特に、親和性樹脂は、約 $74\ \mu\text{m}$ の平均粒子サイズの架橋アガロスマトリクスをベースとし、約 $13\ \text{kD}$ 酵母由来 F_{ab} 抗体断片親和性リガンドを親水性スパーアーム通してマトリクスと結合させて、第 V I I I 因子分子との結合に有用なリガンドを作製する。親和性リガンドは、生物学的活性型第 V I I I 因子分子の第 V I I I 因子軽鎖と結合する。

【0031】

本発明の方法の他の実施形態において、親和性クロマトグラフィーの条件は、以下の条件のうち少なくとも2つを含む。

—生物学的活性型第 V I I I 因子の樹脂ロードが、少なくとも $5000\ \text{IU/mL}$ 樹脂である、好ましくは少なくとも $10,000\ \text{IU/mL}$ 樹脂である、最も好ましくは $20,000\ \text{IU/mL}$ 樹脂を超える

—第 V I I I 因子のロードの間のバッファー条件；pH $6.2\sim 6.8$ で、約 $0.1\sim 0.5\ \text{mol/kg}$ の NaCl 、約 $0.01\sim 0.05\ \text{mol/kg}$ の CaCl_2 、約 $0.01\sim 0.05\ \text{mol/kg}$ の L-ヒスチジン、約 $0.005\sim 0.05\%$ (w/w) のポリソルベート80、約 $0.5\sim 2\%$ の Triton X-100 、約 $0.1\sim 1\%$ の TNBP

—洗浄の間のバッファー条件；pH $6.2\sim 6.8$ で、約 $0.5\sim 4\ \text{mol/kg}$ の NaCl 、約 $0.01\sim 0.05\ \text{mol/kg}$ の CaCl_2 、約 $0.01\sim 0.05\ \text{mol/kg}$ の L-ヒスチジン、約 $0.005\sim 0.05\%$ (w/w) のポリソルベート80

—第 V I I I 因子の溶出の間のバッファー条件；pH $6.2\sim 6.8$ で、約 $0.5\sim 4\ \text{mol/kg}$ の NaCl 、約 $40\sim 60\%$ のエチレングリコール、約 $0.01\sim 0.05\ \text{mol/kg}$ の CaCl_2 、約 $0.01\sim 0.05\ \text{mol/kg}$ の L-ヒスチジン、約 $0.005\sim 0.05\%$ (w/w) のポリソルベート80

【0032】

本発明の方法の他の特定の実施形態において、第 V I I I 因子と陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂が結合する条件下で陰イオン交換クロマトグラフィーを実施し、生物学的活性型第 V I I I 因子の溶出の前後いずれかにおいて、生物学的不活性型を陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂から除去する。溶出画分中の第 V I I I 因子単量体含有量は、 98% 以上である。発明の方法によれば、第 V I I I 因子を結合させるために、 $0.01\sim 0.15\ \text{mol/kg}$ の塩化ナトリウムの濃度に相当する低塩条件下で第 V I I I 因子をロードし、不活性型第 V I I I 因子を除去し、不活性型第 V I I I 因子の除去のために、 $0.15\sim 0.3\ \text{mol/kg}$ の濃度の塩化ナトリウムに相当する中程度の塩条件の下で陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂を洗浄し、 $0.3\sim 1\ \text{mol/kg}$ の塩化ナトリウムの濃度に相当する高い塩条件を用いることによって、第 V I I I 因子を陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂から溶出し、分離画分中に収集する。

【0033】

さらに、不活性型第 V I I I 因子を、 $1\sim 2\ \text{mol/kg}$ の塩化ナトリウムの濃度に相当する高い塩条件を用いることによって、陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂から溶出し、別の画分中に収集する。

【0034】

本発明の陰イオン交換方法の特定の実施形態において、生物学的不活性型第 V I I I 因子を陰イオン交換クロマトグラフィー工程によって除去し、製品溶出画分中で $\geq 98\%$ の単量体含有量を得、以下のクロマトグラフィー条件のうち少なくとも2つを含む。

—生物学的活性型第 V I I I 因子の樹脂ロードが、少なくとも $10,000\ \text{IU/mL}$ 樹脂である、好ましくは少なくとも $15,000\ \text{IU/mL}$ 樹脂である、最も好ましくは $20,000\ \text{IU/mL}$ 樹脂を超える；

—第 V I I I 因子のロードの間のバッファー条件；pH $6.0\sim 7.5$ で、約 0.05

～約 0.15 mol/kg の NaCl、約 0.01～約 0.05 mol/kg の CaCl₂、約 0.01～約 0.05 mol/kg の L-ヒスチジン、約 0.005～約 0.05 % (w/w) のポリソルベート 80；

－洗浄の間のバッファー条件；pH 6.0～7.5 で、約 0.15～約 0.3 mol/kg の NaCl、約 0.01～約 0.05 mol/kg の CaCl₂、約 0.01～約 0.05 mol/kg の L-ヒスチジン、約 0.005～約 0.05 % (w/w) のポリソルベート 80；

－第 V I I I 因子の溶出の間のバッファー条件；pH 6.0～7.5 で、約 0.3～約 0.5 mol/kg の NaCl、約 0.01～約 0.05 mol/kg の CaCl₂、約 0.01～約 0.05 mol/kg の L-ヒスチジン、約 0.005～約 0.05 % (w/w) のポリソルベート 80。

10

【0035】

本発明の陰イオンクロマトグラフィー方法のさらなる実施形態において、陰イオン交換樹脂は、球径が約 45～約 165 μm の架橋 6 % アガロスマトリクスと結合しているリガンドとしての四級アンモニウムイオンを有し、約 0.18～約 0.25 mmol/mL の総イオン結合能力を有する強陰イオン交換体である。

【0036】

本発明の方法の他の特定の実施形態において、サイズ排除クロマトグラフィーは、以下のクロマトグラフィー条件のうち少なくとも 2 つを含む。

－カラム体積の約 4～約 8 % であるサンプルロード、

20

－約 60～約 90 cm のカラム高、

－少なくとも 10,000 IU/mL である、好ましくは少なくとも 15,000 IU/mL である、最も好ましくは 20,000 IU/mL を超える、サンプルロード中の生物学的に活性な第 V I I I 因子の濃度

－不活性型第 V I I I 因子の凝集化のためのカラム平衡化バッファー；pH 6.0～7.5 で、約 0.2～約 0.7 mol/kg の NaCl、約 0.01～約 0.05 mol/kg の CaCl₂、約 0.01～約 0.05 mol/kg のクエン酸ナトリウム、約 0.5～約 2 % (w/w) のスクロース、約 0.5～約 2 % (w/w) の L-アルギニン、約 0.1～約 1 % (w/w) のポロクサマー 188、

生物学的活性型第 V I I I 因子を、前記単量体型で収集し、一方、不活性型第 V I I I 因子は、サイズ排除クロマトグラフィー工程の凝集不活性型を含む画分（凝集型断片（不活性型）および凝集型単量体第 V I I I 因子（単量体のとき活性であるが、凝集型のとき部分的に不活性）の両方であり得る）、および／またはサイズ排除クロマトグラフィー工程の断片型第 V I I I 因子を含む画分のいずれかに見い出される、

30

－第 V I I I 因子単量体の収集を、カラムの出口で約 30～約 40 mAU の吸光度ピークが記録されたときに始め、吸光度ピークが約 1～約 40 mAU に戻ったときに止め、第 V I I I 因子単量体の収集は、サンプル添加量の 2～3 倍に相当する。

【0037】

本発明のサイズ排除クロマトグラフィーの特定の実施形態において、サイズ排除樹脂は、平均直径が 34 μm、最適分離範囲が 10,000～600,000 ダルトンの球状架橋アガロース／デキストラン媒体である。

40

【0038】

本発明の方法の他の特定の実施形態において、サイズ排除クロマトグラフィー溶出物は、少なくとも 12 ヶ月間、特に 36 ヶ月間安定であり、以下の条件のうち少なくとも 2 つを含む。

－バッファーの組成；pH 6.0～7.5 で、約 0.2～約 0.7 mol/kg の NaCl、約 0.01～約 0.05 mol/kg の CaCl₂、約 0.01～約 0.05 mol/kg のクエン酸ナトリウム、約 0.5～約 2 % (w/w) のスクロース、約 0.5～約 2 % (w/w) の L-アルギニン、約 0.1～約 1 % (w/w) のポロクサマー 188

50

— 60℃で保存された凍結溶液、
— 室温から $\leq -40^\circ\text{C}$ までの溶液の凍結を90分以下で達成する。
— 60℃以下での保存による凍結溶液を90分以下で18～25℃へ解凍する。
— 上記のバッファーと共に第V I I I因子の濃度を調製し、バイアル当り250IU、500IU、1000IU、2000IU、3000IU、4000IU、または5000IUの第V I I I因子でガラスバイアルに満たした後、解凍した溶液を凍結乾燥方法に付す。

— 上記による凍結乾燥製品において、第V I I I因子単量体含有量は、99%以上である。

— 上記による凍結乾燥製品は、再構成の後、少なくとも12ヶ月、好ましくは24ヶ月、最も好ましくは36ヶ月、第V I I I因子単量体に著しい変化なく保存することができ、患者に使用することができる。

— 再構成された上記の製品は、以下のバッファーの組成；pH 6.0～7.5で、約0.2～約0.7mol/kgのNaCl、約0.01～約0.05mol/kgのCaCl₂、約0.01～約0.05mol/kgのクエン酸ナトリウム、約0.5～約2% (w/w)のスクロース、約0.5～約2% (w/w)のL-アルギニン、約0.1～約1% (w/w)のポロキサマー188、を有する。

【0039】

本発明の対象は、血友病を治療するため、およびインヒビターの形成を回避するための、本発明の方法により得られる第V I I I因子製品でもあり、前記製品は、凍結および/または凍結乾燥条件で、少なくとも6ヶ月間、好ましくは少なくとも12ヶ月間、より好ましくは少なくとも24ヶ月間、最も好ましくは36ヶ月まで安定である。この第V I I I因子は、上記の3つの精製工程、1. 親和性工程、2. 陰イオン交換工程、3. サイズ排除クロマトグラフィー工程をこの順序で経る特定の方法により得られる。

【0040】

精製スキームのこの順序を与えることにより、得られたF V I I I製品の品質は、異なる精製スキームを使用した市販の組み換え型F V I I I製品⁽²²⁾と比べて、F V I I I C/A g比が高く、単量体含有量が高かった（凝集体と断片が少ないことに相当）。本発明の第V I I I因子製品は、表1から分かるように、第V I I I因子C/A gの比が高く、単量体が多く、断片含有量が少ないという優れた結果を示した。本発明の製品と市販のある組み換え型製品を生体内でさらに比較したところ、表2から分かるように、治療歴のない血友病A患者におけるインヒビター発生量の減少を認めることができた。表2の精製方法A⁽²²⁾を使用したr F V I I I製品は、F V I I I C/A g比を増加させ、かつ、単量体含有量が多く断片含有量が少ない製品を示す能力であって、治療歴のない血友病A患者における免疫学的発生量（the amount of immunological incidents）に明らかに影響を与えるという、本発明の精製方法と同様な高い能力を有しない。

【0041】

10

20

30

【表 1】

表 1

	FVIII/バイアル, IU	FVIII:C, IU/mL	FVIII:Ag, IU/mL	C/Ag	SEC-HPLC2, %		
					凝集体	単量体	断片
精製方法 A に よる rFVIII	250	95	132	0,72	0	76	24
精製方法 A に よる rFVIII	1000	441	573	0,77	0	76	24
精製方法 A に よる rFVIII	3000	638	925	0,69	0	76	24
精製方法 B に よる rFVIII	1000	242	263	0,92	0	99	1
精製方法 C に よる rFVIII	500	104	130	0,8	0	77	23
精製方法 C に よる rFVIII	1000	205	270	0,76	0	80	20
精製方法 C に よる rFVIII	3000	600	732	0,82	0	77	23
本発明の精製 方法による rFVIII	250	119	131	0,91	0	100	0
本発明の精製 方法による rFVIII	1000	494	531	0,93	0	100	0

10

20

【 0 0 4 2 】

【表 2】

表 2

	FVIII/バイアル, IU	FVIII:C, IU/mL	FVIII:Ag, IU/mL	C/Ag	SEC-HPLC2, %			治療歴のない患者の (PUPの)インヒビタ ー, % (n=患者の数)
					凝集体	単量体	断片	
精製方法Aによる rFVIII	250	95	132	0,72	0	76	24	35,2 (128)*
精製方法Aによる rFVIII	1000	441	573	0,77	0	76	24	
精製方法Aによる rFVIII	3000	638	925	0,69	0	76	24	
本発明の精製方法 によるrFVIII	250	119	131	0,91	0	100	0	11,6 (43)**
本発明の精製方法 によるrFVIII	1000	494	531	0,93	0	100	0	

【0043】

*は、Collinsの2014年の研究²¹で発表されている、**は、進行中の研究である

【0044】

本発明の他の対象は、EP2537862A1と比べて改良された本発明の製品性能である。これは、上記の3つの精製工程、1. 親和性工程、2. 陰イオン交換工程、3. サイズ排除クロマトグラフィー工程をこの順序で経る特定の方法により特別に達成される。また、求められる高い(>0.9)第VIII因子C/Ag比と単量体含有量(>99%)を患者において確保する、本発明のサイズ排除工程の特定の方法の条件を含む。最後のサイズ排除バッファー交換工程と製品の凍結乾燥により与えられる本発明の特定のバッファー条件を使用することにより第VIII因子を保存する場合に、-70℃で12ヶ月間保存後でも達成される。これは、保存期間に望ましくない第VIII因子C/Ag比と単量体含有量の減少を最小化すると考えられ、(保存された凍結乾燥製品の再構成後に)患者に注入される溶液中の凝集体/断片に起因する望まない免疫反応に関するリスクが、患者に与えられる製品では少ないことを保証する。さらに、ブラッドフォード分析法を使用してFVIII:C/タンパク質の濃度で測定された比活性は、EP2537862A1で開示されている値(8061IU/mg、n=1)と比べて、統計的に有意に高い(10000IU/mg、n=9)。比活性は、FVIII製品の純度の指標であり(異なる結果を与える異なるタンパク質測定方法が知られており、従って、値が比較可能であるためには、同じタンパク質方法が必要である)、タンパク質の不純物は、患者におけるインヒビター発生の1つのリスク因子であるため、EP2537862A1と比較して、本発明の製品の性能が優れていることが示されている。また、EP2537862A1で開示されているような本発明の図17に見られる等電点分離法によるタンパク質のフィンガープリント分析は、それぞれの製品の製品特性における差を示す。

【0045】

10

20

30

40

50

本発明の特定の実施形態において、第V I I I因子は、最後の工程後に、第V I I I因子の総量（F V I I I : A g）に対する生物学的活性型第V I I I因子（F V I I I : C）の割合が、0.7以上、好ましくは0.8以上、より好ましくは0.9以上、最も好ましくは1であり、第V I I I因子単量体含有量が、98%以上、好ましくは99%以上、最も好ましくは100%であることと、実質的に凝集型第V I I I因子が検出することができないこととを特徴とする。

【0046】

本発明の他の実施形態において、第V I I I因子は、その生物学的活性、高い単量体第V I I I因子含有量、および低い凝集／断片型第V I I I因子含有量を維持している。

【0047】

さらなる他の実施形態において、本明細書の一部として援用される²⁰に記載されているように、本発明の第V I I I因子は、生物学的活性を有する第V I I I因子の血漿由来型、組み換え体由来型、および／または欠失誘導体もしくは切断型、特にBドメイン欠失型F V I I Iであることを特徴とする。

【0048】

本発明のさらなる他の実施形態において、第V I I I因子は、組み換え体由来型、および／または欠失誘導体である場合、ヒト細胞で生産されることを特徴とする。

【0049】

本発明の特定の実施形態において、第V I I I因子は、製品で治療された治療歴のある血友病A患者または治療歴のない血友病A患者におけるインヒビターの量が、25%未満、好ましくは20%、より好ましくは10%未満、好ましくは好ましい0%であることを特徴とする。

【0050】

本発明の主題は、血友病を治療するため、およびインヒビターの形成を回避するための、本発明の方法により得られる第V I I I因子製品でもある。

【0051】

特に、本発明に係る製品では、治療歴のある血友病A患者または治療歴のない血友病A患者において、本発明の製品で治療後に、インヒビターの量が、約25%未満、好ましくは約20%未満、より好ましくは約10%未満、最も好ましくは約0%を示す。

【0052】

タンパク質を取り囲む非晶質マトリクスを形成することにより、凍結乾燥方法の間、および保存の間、タンパク質を保護する凍結保護物質を推奨する。

【0053】

増量剤が含まれても良く、増量剤は、凍結乾燥の間機械的支持を与えるケーキ形成体（c a k e f o r m e r）として機能し、製剤の乾燥重を増加させる。それ故に、増量剤は、凍結乾燥製品の均一な品質と外観を与えることに役立つ。

【0054】

さらに、タンパク質に適し、かつ、製品の治療用途に適する値にpHを維持するように、緩衝剤を加えることができる。凍結乾燥されたタンパク質に適する成分は、例えば、本明細書の一部として援用される国際公開第2010/026186 A号に開示されている。

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】F V I I I抗体を使用したウエスタンブロット。左から、分子量標準、レーン1；親和性工程の出発材料、F V I I I : A g 5.0 I U / m L、レーン2；親和性工程のフロースルー、F V I I I : A g 132 I U / m L、レーン3；親和性洗浄画分、F V I I I : A g 26 I U / m L、レーン4；親和性溶出物（出発材料Q）、F V I I I : A g 5.8 I U / m L、レーン5；陰イオン交換フロースルー＋平衡化（e q.）、F V I I I : A g 1.7 I U / m L、レーン6；陰イオン交換洗浄、F V I I I : A g 5.0 I U / m L。図1は、親和性工程と陰イオン交換体工程のフロースルーと洗浄画

10

20

30

40

50

分中の不活性型 F V I I I : C の除去を示す。親和性工程の洗浄画分は、ほぼ F V I I I 軽鎖のみを含む。

【図 2】F V I I I 抗体を使用したウエスタンブロット。左から、分子量標準、レーン 1 ; F V I I I 対照、F V I I I : C 5.0 I U / m L、レーン 2 ; 親和性溶出物、F V I I I : C 5 I U / m L、レーン 3 ; 希釈した親和性溶出物、F V I I I : C 5 I U / m L、レーン 4 ; 陰イオン交換溶出物、F V I I I : C 5 I U / m L、レーン 5 ; サイズ排除溶出物、F V I I I : C 5 I U / m L。図 2 は、親和性工程の後、陰イオン交換工程の後、およびサイズ排除工程の後で等しい F V I I I : C 濃度である F V I I I のウエスタンブロットパターンを示し、全て、F V I I I 対照と同じパターンを示している。

10

【図 3】実施例 3 の分取サイズ排除クロマトグラフィーカラムからのクロマトグラムであり、異なる樹脂ロードと第 V I I I 因子濃度を使用した 3 つの異なる実験に関して、単量体第 V I I I 因子からの凝集体と断片の分離を示す。実施例 3 の平衡化バッファー系とクロマトグラフィー条件は、凝集を促進し、従って、単量体単量体第 V I I I 因子（溶出物）からの凝集体の除去を促進する。クロマトグラフィーピークは、280 nm での吸光度で測定されるタンパク質を反映する。

【図 4】分析的サイズ排除クロマトグラフィーカラム（SEC-HPLC1）からのクロマトグラムであり、実施例 2 に従って調製したサンプル（溶出物）からのクロマトグラフィー特性を示し、凝集体、単量体、および断片の含有量をそれぞれパーセンテージで示す。このサンプルの単量体含有量は、>98%であり、凝集体含有量は、<0.5%であり、断片含有量は、<1.5%である。

20

【図 5】分析的サイズ排除クロマトグラフィーカラム（SEC-HPLC1）からのクロマトグラムであり、実施例 3 に従って調製したサンプル（溶出物）からのクロマトグラフィー特性を示し、凝集体、単量体、および断片の含有量をそれぞれパーセンテージで示す。このサンプルの単量体含有量は、概して>99%であり、凝集体含有量は、目に見えない量であり、断片含有量は、<1%である。

【図 6】実施例 4 の分取サイズ排除クロマトグラフィーカラムからのクロマトグラムであり、異なる樹脂ロードと第 V I I I 因子濃度を使用した 5 つの異なる実験に関して、単量体第 V I I I 因子からの凝集体と断片の分離を示す。実施例 4 の平衡化バッファー系とクロマトグラフィー条件は、凝集を促進し、従って、単量体第 V I I I 因子（溶出物）からの凝集体の除去を促進する。クロマトグラフィーピークは、280 nm での吸光度で測定されるタンパク質を反映する。

30

【図 7】分析的サイズ排除クロマトグラフィーカラム（SEC-HPLC1）からのクロマトグラムであり、実施例 4 に従って調製したサンプル（陰イオン交換溶出物）からのクロマトグラフィー特性を示し、凝集体、単量体、および断片の含有量をそれぞれパーセンテージで示す。このサンプルの単量体含有量は、>97%であり、凝集体含有量は、<0.7%であり、断片含有量は、<2.5%である。

【図 8】分析的サイズ排除クロマトグラフィーカラム（SEC-HPLC1）からのクロマトグラムであり、実施例 4 に従って調製したサンプル（サイズ排除溶出物）からのクロマトグラフィー特性を示し、凝集体、単量体、および断片の含有量をそれぞれパーセンテージで示す。このサンプルの単量体含有量は、>98%であり、凝集体含有量は、目に見えないサインがなく、断片含有量は、<2%である。

40

【図 9】分析的サイズ排除クロマトグラフィーカラム（SEC-HPLC1）からのクロマトグラムであり、実施例 4 に従って調製したサンプル（陰イオン交換溶出物）からのクロマトグラフィー特性を示し、凝集体、単量体、および断片の含有量をそれぞれパーセンテージで示す。このサンプルの単量体含有量は、>98%であり、凝集体含有量は、目に見えるサインがなく、断片含有量は、<2%である。

【図 10】分析的サイズ排除クロマトグラフィーカラム（SEC-HPLC1）からのクロマトグラムであり、実施例 4 に従って調製したサンプル（サイズ排除溶出物）からのクロマトグラフィー特性を示し、凝集体、単量体、および断片の含有量をそれぞれパーセン

50

ページで示す。このサンプルの単量体含有量は、 $>98\%$ であり、凝集体含有量は、目に見えるサインがなく、断片含有量は、 $<2\%$ である。

【図11】分析的サイズ排除クロマトグラフィーカラム（SEC-HPLC1）からのクロマトグラムであり、実施例4に従って調製したサンプル（陰イオン交換溶出）からのクロマトグラフィー特性を示し、凝集体、単量体、および断片の含有量をそれぞれパーセンテージで示す。このサンプルの単量体含有量は、 $>98\%$ であり、凝集体含有量は、目に見えるサインがなく、断片含有量は、 $<1.5\%$ である。

【図12】分析的サイズ排除クロマトグラフィーカラム（SEC-HPLC1）からのクロマトグラムであり、実施例4に従って調製したサンプル（サイズ排除溶出物）からのクロマトグラフィー特性を示し、凝集体、単量体、および断片の含有量をそれぞれパーセン

10

テージで示す。このサンプルの単量体含有量は、 $>99\%$ であり、凝集体含有量は、目に見えるサインがなく、断片含有量は、 $<1.5\%$ である。

【図14】分析的サイズ排除クロマトグラフィーカラム（SEC-HPLC1）からのクロマトグラムであり、実施例4に従って調製したサンプル（サイズ排除溶出物）からのクロマトグラフィー特性を示し、凝集体、単量体、および断片の含有量をそれぞれパーセン

20

テージで示す。このサンプルの単量体含有量は、 $>99\%$ であり、凝集体含有量は、目に見えるサインがなく、断片含有量は、 $<1\%$ である。

【図16】分析的サイズ排除クロマトグラフィーカラム（SEC-HPLC1）からのクロマトグラムであり、実施例4に従って調製したサンプル（サイズ排除溶出物）からのクロマトグラフィー特性を示し、凝集体、単量体、および断片の含有量をそれぞれパーセン

30

テージで示す。このサンプルの単量体含有量は、 $>98\%$ であり、凝集体含有量は、目に見えるサインがなく、断片含有量は、 $<1.5\%$ である。

【図17】サイズ排除クロマトグラフィーの後に本発明の実施例4に従ってサンプルを処理したサンプルの電荷とサイズの特性の分析的二次元電気泳動（2D-PAGE）フィンガープリント。

【図18】本発明の精製方法の間の第VII因子の純度の増加。

【図19】分析的サイズ排除クロマトグラフィーカラム（SEC-HPLC2）からのクロマトグラムであり、実施例7に従って調製した（本発明に従って精製および凍結乾燥した）サンプルからのクロマトグラフィー特性を示し、凝集体、単量体、および断片の含有量をそれぞれ凍結乾燥製品の再構成後（1000IU バイアル）のパーセンテージで示す。このサンプルの単量体含有量は、原理上100%であり（単量体ピークの左側のわずかなショルダーは、分子量標準の保持曲線（図23）に基づき、FVII単量体ピークに含まれる）、SEC-HPLC2クロマトグラムにおいて、およそ7~10分で溶出しており、凝集体と断片の含有量は認められない。

40

【図20】分析的サイズ排除クロマトグラフィーカラム（SEC-HPLC2）からのクロマトグラムであり、精製方法A²²と凍結乾燥により調製したサンプルからのクロマトグラフィー特性を示し、凝集体、単量体、および断片の含有量をそれぞれ凍結乾燥製品の再構成後（1000IU バイアル）のパーセンテージで示す。このサンプルの単量体含有量は、およそ76%であり、凝集体含有量は認められず、断片含有量はおよそ24%である。rFVII製品は、完全なBドメインを有し、分子量がおよそ300kDであり

50

、SEC-HPLC 2クロマトグラムにおいておよそ5～8分で単量体FVIIが溶出する完全長FVII製品である。断片ピークはおよそ8～13分の単量体ピークの後直ぐに計算が開始されている。

【図21】分析的サイズ排除クロマトグラフィーカラム（SEC-HPLC 2）からのクロマトグラムであり、精製方法B²²と凍結乾燥により調製したサンプルからのクロマトグラフィー特性を示し、凝集体、単量体、および断片の含有量をそれぞれ凍結乾燥製品の再構成後（1000IU バイアル）のパーセンテージで示す。このサンプルの単量体含有量は、およそ99%であり（単量体ピークの左側のわずかなショルダーは、分子量標準の保持曲線（図23）に基づき、FVII単量体ピークに含まれる）、凝集体含有量は認められず、断片含有量はおよそ1%である。rFVII製品は、分子量がおよそ170kDであり、SEC-HPLC 2クロマトグラムにおいておよそ7～10.5分で単量体FVIIの溶出を与えるBドメイン欠失型FVII製品である。断片ピークは、およそ10.5～13分の単量体ピークの後直ぐに計算が開始されている。

【図22】分析的サイズ排除クロマトグラフィーカラム（SEC-HPLC 2）からのクロマトグラムであり、精製方法C²²と凍結乾燥により調製したサンプルからのクロマトグラフィー特性を示し、凝集体、単量体、および断片の含有量をそれぞれ凍結乾燥製品の再構成後（1000IU バイアル）のパーセンテージで示す。このサンプルの単量体含有量は、およそ80%であり、凝集体含有量は認められず、断片含有量はおよそ20%である。rFVII製品は、完全なBドメインを有し、分子量がおよそ300kDであり、SEC-HPLC 2クロマトグラムにおいておよそ5～8分で単量体FVIIの溶出を与える完全長FVII製品である。断片ピークは、8～13分の単量体ピークの後直ぐに計算が開始されている。

【図23】分析的サイズ排除クロマトグラフィーカラム（SEC-HPLC 2）からのクロマトグラムであり、分子量標準サンプル（15～600kD、69385、Sigma-Aldrich Chemie社）からのクロマトグラフィー特性を示す。

【0056】

本発明に係る用語「生物学的不活性型第VII因子」は、化学的原因、生化学的原因、または酵素的原因によりその生物学の活性を失っている第VII因子の形態を意味する。生物学的不活性型第VII因子は、例えば、単独の第VII因子軽鎖もしくは重鎖、第VII因子の切断型もしくは第VII因子の活性型（しかし、凝固サイクルにおける活性化により定義されるために不安定である）（FVIIaなど）、および／または断片型第VII因子の凝集型もしくは他の形態であり得る。

【0057】

本明細書で使用されるmol/kgの定義は、1,000gの水に加えられたmol数であり、Molarの定義は、1,000mLになるまで水を加えられたmol数である。

【0058】

生物学の活性型第VII因子と生物学的不活性型第VII因子の両方のサンプル中の総量を、（FVII：Ag）の抗原をベースとするELISA分析法を用いて測定する。（生体内での）完全な生物学の活性を有するサンプル中の生物学的に活性な第VII因子（FVII：C）と第VII因子の抗原含有量（FVII：Ag）の比は、1.0に等しいべきである。比が1より小さい場合、サンプル中に不活性型第VII因子があることが示唆される。不活性型は、単独の第VII因子軽鎖および重鎖に解離した凝集型第VII因子および／または第VII因子分子のいずれかである可能性がある。

【0059】

FVII軽鎖（分子量がおよそ80kDの第VII因子のA3、C1、およびC2ドメイン）は、生物学的に活性な第VII因子分子中で、FVII重鎖（分子量が90～210kDのA1およびA2第VII因子ドメイン）との金属／疎水性複合体となっている。この複合体は、生体内で未変性の第VII因子分子であり、通常の条件下で

、第V I I I因子分子を変性から保護するフォン・ヴィルブランド因子(v W F)と結合して循環する。凝固系が活性化されるとき、未変性の第V I I I因子分子は、v W Fから放出され、活性化された血小板と結合し、タンパク質分解性の変換を受けて、未変性のF V I I I分子の活性な形態であり、凝固系の重要な要素であるF V I I I a(活性型第V I I I因子)となる。F V I I I a分子は、凝固カスケードにより直ぐに消費され、その後、様々なプロテアーゼインヒビターにより酵素的に不活性化される。⁽¹⁵⁾複合体が解離している場合⁽¹⁶⁾、軽鎖または重鎖は、生物学的活性が全く、またはほとんどなく、F V I I I : C / F V I I I : A gの比は、ゼロに近い。未変性の複合体が、タンパク質分解により不活性化されている場合、軽鎖と重鎖の両方の分子量は減少し、第V I I I因子の分解産物は、最初は生物学的活性を残しているが(例えばF V I I I a)、第V I I I因子の分解産物は不安定であり、生体内で比較的直ぐに不活性化される。⁽¹⁾第V I I I因子の分解産物は(タンパク質分解性の分解によるものと非タンパク質分解性の解離によるものの両方)は、サイズに基づいて生物学的活性型第V I I I因子分子と不活性型第V I I I因子分子を特異的に示す第V I I I因子のウエスタンブロット解析法を用いて検出することができる。未変性の第V I I I因子分子は、分子がBドメインを欠失しているか、またはしていないかによって、およそ170kダルトンまたは290kダルトンの分子量を有す。Bドメインは、第V I I I因子分子中で、生物学的活性な機能が全くなく、従って、生物学的活性型第V I I I因子分子は、Bドメインがある、またはBドメインがない(もしくはBドメインの一部がない)のどちらかであり得る。

10

【0060】

20

単量体第V I I I因子製品は、通常のバッファー条件の下で実施される分析的H P L Cサイズ排除クロマトグラフィー法により確定された同じ分子量の集団を有する生物学的に活性な第V I I I因子分子として本明細書で定義される。断片型第V I I I因子は、主に不活性であり、一方で、凝集型第V I I I因子は、減少した生物学的活性を有す。両方の形態は、生体内でインヒビター形成のリスクを理論的に増加させる。血友病Aの治療を目的とする第V I I I因子製品中で、可能な限り、両方の形態は少なくあるべきである。単量体第V I I I因子製品は、精製方法の最後で、可能な限り多くあるべきであり、また、第V I I I因子製品の製剤過程(凍結状態)の前で安定であるべきであり、実際の製剤過程(凍結乾燥またはバイアル中に溶液を満たすこと)の下で、再構成され患者に消費されるまで安定であるべきである。この期間は、しばしば、数ヶ月から1~3年までであり得る。第V I I I因子の凍結溶液中での安定性の一例は、U S 8,187,799 B2に与えられており、具体的なバッファー組成が主張されているが、しかしながら、この参考文献において、第V I I I因子凝集体/単量体含有量は、議論されていない。

30

【0061】

本発明の組み換え型第V I I I因子は、特に、Bドメインを完全または部分的に欠く欠失誘導体であり、そのため、最終精製製品中で5,000IU/mgをはるかに超え得る比活性を与える。このようなBドメインを完全または部分的に欠く欠失誘導体の例は、E P-A-1136553およびE P-A-1739179で開示され、ヒト細胞株から調製されている。現在開発されている組成物が、以下のセクションに記載されているように、このような第V I I I因子の欠失誘導体または同じように高純度のその他の第V I I I因子製品に適用するのに特に良く適しているということが、高く評価されている。

40

【発明を実施するための形態】

【0062】

本発明の詳細な説明

第V I I I因子の親和性クロマトグラフィー工程の詳細な説明

【0063】

平衡化バッファー条件(0.3mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02%(w/w)のポリソルベート80、pH6.4~6.6、伝導率は30~36mS/cm)の下で、溶剤、界面活性剤(solvent detergent chemical)(1%Triton X

50

ー100+0.3%トリ-*n*ブチルホスフェート)を用いて、または用いずに、第V I I I因子を第V I I I因子親和性クロマトグラフィーカラム(V I I I S e l e c t)と結合させる。溶剤、界面活性剤(s o l v e n t d e t e r g e n t c h e m i c a l)は、親和性工程の前に、(脂質に包まれた)ウイルスを不活性化する目的で第V I I I因子溶液に添加してもよい。第V I I I因子を安定化させる目的で加えることができる0.2mol/kgのソルビトールおよび0.045mol/kgのアルギニン等の第V I I I因子精製の上流からのその他の化学物質も、第V I I I因子ロード溶液中に存在し得る。通常、第V I I I因子ロードは、約5,000~約25,000IU/mL親和性樹脂であり、原則として、任意の純度(1~15,000IU第V I I I因子/mgタンパク質)の第V I I I因子溶液を親和性カラムに添加し得る。方法を、周囲温度、例えば室温で実施する。

10

【0064】

第V I I I因子を含む溶液をカラム上で処理した後、15カラム体積の平衡化バッファ(0.3mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02%(w/w)のポリソルベート80、pH6.4~6.6、伝導率は30~36mS/cm)でカラムをすすいで、不純物(製品関連と方法関連の両方)を除去する。次に、高めた塩濃度(1mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02%(w/w)のポリソルベート80、pH6.4~6.6、伝導率は83~89mS/cm)で5カラム体積を洗浄して、単独のF V I I I軽鎖を特異的に除去する。その後、4カラム体積のバッファを使用して、高めた塩濃度とエチレングリコール(1.5mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、50%(w/w)のエチレングリコール、0.02%(w/w)のポリソルベート80、pH6.4~6.6、伝導率は36~42mS/cm)でカラムから生物学的に活性な第V I I I因子を溶出する。

20

【0065】

その後、親和性樹脂と結合している残存タンパク質を、酸性洗浄(pH2)により除去し、樹脂の後、平衡化後、別の精製サイクルに備える。

【0066】

陰イオン交換クロマトグラフィー工程の詳細な説明

30

平衡化バッファ条件(0.1mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02%(w/w)のポリソルベート80、pH7.4~7.6、伝導率は12~16mS/cm)の下で、第V I I I因子を強陰イオン交換カラム(Q S e p h a r o s e F F)と結合させる。5%のエチレングリコール等の第V I I I因子精製の上流からのその他の化学物質も、第V I I I因子ロード溶液中に存在し得る。通常、第V I I I因子ロードは、10,000~100,000IU/mL親和性樹脂であり、出発材料の純度は、>5000IU第V I I I因子/mgタンパク質である。方法を、周囲温度、例えば室温で実施する。

【0067】

第V I I I因子を含む溶液をカラムで処理した後、15カラム体積の平衡化バッファ(0.1mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02%(w/w)のポリソルベート80、pH7.4~7.6、伝導率は12~16mS/cm)でカラムをすすいで、不純物(製品関連と方法関連の両方)を除去する。次に、高めた塩濃度(0.30mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02%(w/w)のポリソルベート80、pH7.4~7.6、伝導率は30~35mS/cm)で5カラム体積を洗浄して、不活性型第V I I I因子を除去する。その後、1カラム体積のバッファを使用して、高めた塩濃度(0.39mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02%(w/w)のポリソルベート80、pH5.9~6.1、伝導率は38~42mS/cm)で生物学

40

50

的に活性な単量体第V I I I因子をカラムから溶出する。

【0068】

その後、イオン相互作用により陰イオン交換樹脂と結合しているあらゆる残存タンパク質を、2 mol/kgのNaClへと高めた塩濃度により除去し、その後、高いpH(14)を使用して樹脂を殺菌し、平衡化後、別の精製サイクルのためにカラムを準備する。

【0069】

サイズ排除クロマトグラフィー工程の詳細な説明

ベッド高が70 cmのサイズ排除クロマトグラフィーカラム(Superdex 200 p. g.)に対して4~8%のカラム体積で第V I I I因子をロードし、30.7 g/kgのNaCl、0.5 g/kgのCaCl₂、2.0 g/kgのクエン酸Na、9.2 g/kgの塩酸L-アルギニン、9.2 g/kgのサッカロース、2.0 g/kgのポロキサマー188、pH6.9~7.1、47~51 mS/cmの伝導率で平衡化する。通常、出発材料中の第V I I I因子濃度は、>10,000 IU/mLであり、バッファの組成は、0.4 mol/kgのNaCl、0.02 mol/kgのCaCl₂、0.02 mol/kgのL-ヒスチジン、0.02% (w/w)のポリソルベート80、pH6.0~6.5、35~42 mS/cmの伝導率である。出発材料の純度は、>8000 IU第V I I I因子/mgタンパク質である。方法を室温；18~25℃で実施する。

【0070】

第V I I I因子を含む溶液をサイズ排除カラムに添加した後、カラムの出口で280 nmで測定される吸光度が40 mAUに上がるまで、カラムを平衡化バッファで処理し、吸光度が元(40~1 mAU)に戻るまで、単量体の生物学的に活性な第V I I I因子製品を収集する。生物学的に不活性な凝集型第V I I I因子を先に(<40 mAU)除去し、不活性型第V I I I因子断片を単量体の生物学的に活性な第V I I I因子のピークの後で(<40 mAU)除去する。サイズ排除工程の後の単量体の生物学的に活性な第V I I I因子の溶液は、通常、出発材料の体積の2~3倍である。

【0071】

本明細書に引用される全ての参考文献は、援用が本明細書に示される教示と矛盾しない最大限の範囲まで、本明細書の一部を構成するものとして援用される。出版物、特許出願、特許を含む、本明細書に引用される全ての参考文献は、あらゆる別に与えられた本明細書の他でなされた特定の文献の援用に関係なく、各参考文献が、本明細書の一部を構成するものとして援用されることを各々具体的に示され、その全体が本明細書に記載されるのと同じ範囲まで(法律で認められる最大の範囲まで)、ここにその全体を本明細書の一部を構成するものとして援用される。

【0072】

用語「a」、および「an」、および「the」、および類似の指示対象の本発明の記載に関連した使用は、本明細書に特に示されていない限り、または明らかに文脈上矛盾していない限り、単数および複数の両方を包含するものとして解釈されるべきである。特に指定のない限り、本明細書に与えられる全ての厳密な値は、概算値に対応する代表値(例えば、特定の因子または測定に関して与えられる全ての厳密で例示的な値は、対応する概算的測定値も与えると解釈されることができ、必要に応じて「約」により修正され得る)。

【0073】

「含む(comprising)」、「有する(having)」、「含む(including)」、または「含む(containing)」等の用語を使用する、要素に関連する本発明のあらゆる態様または実施形態の本明細書での記載は、特に指定のない限り、または明らかに文脈上矛盾していない限り、その特定の要素「から成る(consists of)」、「から本質的に成る(consists essentially of)」、または「実質的に含む(substantially comprises)」本発明の類似の態様または実施形態の支持を与えることが意図されている(例えば、特に指定のない限り、または明らかに文脈上矛盾していない限り、特定の要素を含むとして

本明細書に記載される組成物は、その要素から成る組成物の記載も含むとして理解されるべきである）。

【0074】

全ての見出しと小見出しは、便宜のためだけに本明細書で使用され、いかなる意味においても本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に与えられる、ありとあらゆる例、または例示的な言葉（例えば、「等（such as）」）の使用は、本明細書に特に主張されていない限り、本発明をより良く説明することだけが意図されており、本発明の範囲を限定はしない。列挙に何の言葉もないことは、本発明の実施に必須のあらゆる主張されていない要素を示しているとして解釈されるべきである。

【0075】

本明細書での特許文献の引用と援用は、便宜のためだけになされ、このような特許文献の有効性、特許性、および／または権利行使可能性のあらゆる見解を反映していない。準拠法に認められているように、本発明は、特許請求の範囲および／または本明細書に含まれる態様に詳述される対象の全ての変更と均等物を含む。

【実施例】

【0076】

本発明をさらに記載するが、以下の実施例により本発明を限定はしない。

【0077】

実施例 1：

樹脂に結合している酵母由来第 V I I I 因子親和性リガンドを用いる精製。

【0078】

以下の方法は、第 V I I I 因子：C 活性がない形態の第 V I I I 因子を、酵母由来因子親和性リガンドクロマトグラフィー工程（V I I I S e l e c t）で除去することについて説明している。

【0079】

カラムと樹脂

B P G 1 4 0 カラムに V I I I S e l e c t 樹脂を充填して、1.7 リットルのカラム体積となる 11 cm のベッド高にした。V I I I S e l e c t 樹脂は G E H e a l t h c a r e（カタログ番号 17-5450）から得た。

【0080】

出発材料：

純度が第 V I I I 因子 1614 IU/mg タンパク質である第 V I I I 因子含有材料、0.34 mol/kg の NaCl、0.035 mol/kg の CaCl₂、0.01 mol/kg の L-ヒスチジン、0.045 mol/kg の L-アルギニン、0.2 mol/kg のソルビトール、0.02% (w/w) のポリソルベート 80、1% (w/w) の T r i t o n X-100、0.3% の トリー-ブチルホスフェート（TNBP、w/w）、pH 6.5 を出発材料として使用した。本明細書の一部として援用される国際公開第 2009156430A1 号にさらに記載されている通り、出発材料を製造した。樹脂に対する F V I I I : C ロードは、15 529 IU/mL 樹脂であった。

【0081】

バッファー組成：

平衡化バッファー（T r i t o n X-100 および TNBP 含有）

0.3 mol/kg の NaCl、0.02 mol/kg の CaCl₂（2×H₂O）、0.02 mol/kg の L-ヒスチジン、1% w/w の T r i t o n X-100、0.3% w/w の TNBP、pH：6.5 ± 0.1、伝導率：+25℃で 31 ± 3 mS/cm

洗浄バッファー 1（T r i t o n X-100 および TNBP を含有しない平衡化バッファー）

0.3 mol/kg の NaCl、0.02 mol/kg の CaCl₂、0.02 mol/kg の L-ヒスチジン、0.02% (w/w) のポリソルベート 80、pH：6.5 ± 0.1、伝導率：+25℃で 31 ± 3 mS/cm

10

20

30

40

50

洗浄バッファー 2

1. 0 mol/kg の NaCl、0.02 mol/kg の CaCl₂、0.02 mol/kg の L-ヒスチジン、0.02% (w/w) のポリソルベート 80、pH: 6.5 ± 0.1、伝導率: +25℃で 85 ± 3 mS/cm。

溶出バッファー

1. 5 mol/kg の NaCl、0.02 mol/kg の CaCl₂、0.02 mol/kg の L-ヒスチジン、0.02% (w/w) のポリソルベート 80、50% (w/w) のエチレングリコール (EG)、pH: 6.5 ± 0.1、伝導率: +25℃で 39 ± 3 mS/cm。

【0082】

平衡化バッファー、洗浄バッファー、および溶出バッファーは、記載の pH、濃度、およびバッファー、塩、または界面活性剤の種類に限定されない。

【0083】

カラムを平衡化バッファーで平衡化し、次いで、出発材料をロードした。その後、表 1 に記載のように、樹脂に洗浄バッファー 1 と洗浄バッファー 2 を流し、その後、溶出バッファーを流した。それぞれの画分（出発材料のロード中のフロースルー + 洗浄 1、洗浄 2 および溶出）からサンプルを採取し、FVIII:C、FVIII:Ag、および FVIII ウェスタンブロットについて分析した。

【0084】

【表 3】

表 3、VIII Select の処理からの結果

サンプル	量 (kg)	FVIII:C (IU/ml) / (MIU)	総FVIII:C (%)	FVIII:Ag (IU/ml) / (MIU)	総FVIII:Ag (%)	比 (C/Ag)
出発材料 (ロード)	23.2	1140/26.4	100	1859/43.1	100	0.61
フロースルー + 洗浄 1	48.2	0.59/0.02	0.1	132/6.36	17	<0.01
洗浄 2	16.9	<0.5/<0.01	0.03	26.3/0.44	1.2	<0.02
溶出	6.0	3572/21.4	81	4122/24.7	57	0.87

【0085】

表 3 は、出発材料からの不活性型第 VIII 因子の除去を表している。FVIII:Ag として測定した得られる第 VIII 因子の総量と比較した、FVIII:C として測定した生物学的に活性な第 VIII 因子の比は、出発材料で 0.61 であった。フロースルーと洗浄画分でも C/Ag 比を測定したところ、とても低かった (<0.05)。溶出画分において、C/Ag 比は、出発材料での 0.61 より増加して、0.87 であった。このことは、VIII Select 親和性工程を経て不活性型第 VIII 因子が除去されたことを明確に示している。このことは、さらに、図 1 の第 VIII 因子のウェスタンブロット解析において、レーン 1 ~ 4 を見ても確かめられる。レーン 1 は、親和性カラムの前

の「出発材料」を示す。レーン2は、第V I I I因子の変性産物が「フロースルー+洗浄1画分」で除去されることを示す、第V I I I因子関連のたくさんのバンドを示す。レーン3は、「洗浄2画分」中に、一本の（解離された）第V I I I因子軽鎖（80 k D）と同じ分子量を有する、1つの特徴的で主要な第V I I I因子バンドがあることを示す。この第V I I I因子画分は、（表3に示すように）第V I I I因子：C活性が全く、またはほとんどないことも示す。レーン4は、親和性工程の溶出画分が、第V I I I因子軽鎖（80 k D）、第V I I I因子重鎖（90 k D）、および非切断型第V I I I因子分子（170 k D）を含むことを示す。

【0086】

結論 実施例1

表3と図1（レーン1～4）から分かるように、V I I I S e l e c t 工程は、フロースルーと洗浄画分中のF V I I I：C活性が減少および／または活性がない第V I I I因子分子を除去する。

【0087】

実施例2、陰イオン交換クロマトグラフィー工程（Q-S e p h a r o s e F F）

【0088】

以下の方法は、第V I I I因子：C活性のない形態の第V I I I因子を、陰イオン交換体樹脂（Q S e p h a r o s e F F）で除去し、第V I I I因子単量体が多い製品を得ることを説明する。

【0089】

カラムおよび樹脂

B P G 1 4 0 カラムにQ S e p h a r o s e F F樹脂を詰めて、1.23リットルのカラム体積となる8 cmのカラム高にした。Q S e p h a r o s e F F樹脂はG E H e a l t h c a r e（カタログ17-0510）から入手した。

【0090】

出発材料

純度が第V I I I因子9470 IU/mgタンパク質である第V I I I因子含有材料、0.1 mol/kgのNaCl、0.02 mol/kgのCaCl₂、0.02 mol/kgのL-ヒスチジン、0.02%（w/w）のポリソルベート80、pH 6.5を出発材料として使用した。実施例1にさらに記載されているように、出発材料を製造した（製品溶出画分）。樹脂へのF V I I I：Cロードは、15,383 IU/mL樹脂であった。

【0091】

バッファー組成：

平衡化バッファー

0.1 mol/kgのNaCl、0.02 mol/kgのCaCl₂（2×H₂O）、0.02 mol/kgのL-ヒスチジン、0.02%（w/w）のポリソルベート80、pH：7.5±0.1、伝導率：+25℃で15±1 mS/cm

洗浄バッファー

0.32 mol/kgのNaCl、0.02 mol/kgのCaCl₂、0.02 mol/kgのL-ヒスチジン、0.02%（w/w）のポリソルベート80、pH：7.5±0.1、伝導率：+25℃で32.5±2.5 mS/cm

溶出バッファー

0.39 mol/kgのNaCl、0.02 mol/kgのCaCl₂、0.02 mol/kgのL-ヒスチジン、0.02%（w/w）のポリソルベート80、pH：6.0±0.1、伝導率：+25℃で40±2 mS/cm。

【0092】

平衡化バッファー、洗浄バッファー、および溶出バッファーは、記載のpH、濃度、およびバッファー、塩、または界面活性剤の種類に限定されない。

【0093】

10

20

30

40

50

カラムを平衡化バッファーで平衡化し、次いで、出発材料をロードした。その後、表 3 に記載のように、樹脂に平衡化バッファーを再び流して、第 V I I I 因子を結合させ、その後、洗浄バッファーを加え、次いで、溶出バッファーを加えた。それぞれの画分（出発材料ロード中のフロースルー＋洗浄 1、洗浄 2、および溶出）からサンプルを取り、F V I I I : C、F V I I I : A g、S E C - H P L C 1、F V I I I ウエスタンブロット、N-グリカンフィンガープリントマッピング、およびトリプシンペプチドフィンガープリントマッピングについて分析した。

【 0 0 9 4 】

【表 4】

表 4、陰イオン交換法からの結果

サンプル	量 (kg)	FVIII:C (IU/ml) / (MIU)	総FVIII :C (%)	FVIII:Ag (IU/ml) / (MIU)	総FVIII:Ag (%)	比 (C/Ag)
出発材料 (ロード)	58.4	324/18.9	100	412/24.1	100	0.78
フロースルー ＋平衡化	71.8	1.7/0.11	0.6	15.4/1.1	4.6	0.11
洗浄	6.2	130/0.81	4.3	401/2.5	10	0.32
溶出	0.958	16410/15.7	83	18131/17.4	72	0.91

【 0 0 9 5 】

表 4 は、陰イオン交換工程の出発材料からの不活性型第 V I I I 因子の除去を表している。F V I I I : A g として測定した得られた第 V I I I 因子の総量と比較した、F V I I I : C として測定した生物学的に活性な第 V I I I 因子の比は、出発材料で 0.78 であった。フロースルーと洗浄画分でも C / A g 比を測定したところ、有意に低かった（＜ 0.35）。溶出画分において、C / A g 比は、出発材料での 0.78 より増加して、0.91 であった。このことは、陰イオン交換工程を経て不活性型第 V I I I 因子が除去されたことを明確に示している。このことは、さらに、図 1 のレーン 5 ～ 6 を見ても確かめられ、両レーンともに、第 V I I I 因子の変性産物がフロースルー＋平衡化画分と洗浄画分に除去されていることを示す。図 2 のレーン 4 は、第 V I I I 因子の主要画分（溶出物）の F V I I I ウエスタンブロット特性を示し、目に見える F V I I I の変性産物がないことを示す。S E C - H P L C 1 で分析した、溶出物中の高い（＞ 98 %）の単量体含有量が、図 4 に示されている。

【 0 0 9 6 】

結論 実施例 2

表 4 と図 1（レーン 5 ～ 6）から分かるように、陰イオン交換工程は、フロースルーと洗浄画分中に、減少した、および／または F V I I I : C 活性がない第 V I I I 因子分子を除去する。図 4 から分かるように、生物学的活性型製品画分（溶出物）は、単量体第 V I I I 因子を多く含む。

【 0 0 9 7 】

実施例 3, サイズ排除クロマトグラフィー

【0098】

以下の方法は、第V I I I因子：C活性のない形態の第V I I I因子を、サイズ排除クロマトグラフィーカラム（Superdex 200 p. g.）で除去することを説明する。

【0099】

カラムおよび樹脂

BPG100カラムにSuperdex 200 p. g. 樹脂を詰めて、5.4リットルのカラム体積となる69cmのベッド高にした。Superdex 200 p. g. 樹脂はGE Healthcare（カタログ番号17-1043）から得た。

【0100】

出発材料

純度が、第V I I I因子10200IU/mgタンパク質である第V I I I因子含有材料、0.4mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02%（w/w）のポリソルベート80、pH6.2を出発材料として使用した。実施例2に記載されている通り、出発材料を製造した（製品溶出画分）。樹脂に対するサンプルロードは、カラム体積の5.5%であった。

【0101】

バッファー組成：

平衡化バッファー

30.7g/kgのNaCl、0.5g/kgのCaCl₂、2.0g/kgのクエン酸ナトリウム、9.2g/kgのアルギニン、9.2g/kgのスクロース、0.02%（w/w）のポリソルベート80、pH：7.0±0.1、伝導率：+25℃で49±2mS/cm

【0102】

平衡化は、記載のpH、濃度、およびバッファー、塩、または界面活性剤の種類に限定されない。

【0103】

カラムを平衡化バッファーで平衡化し、次いで、出発材料をロードした。その後、樹脂に平衡化バッファーを再び流して、サイズ排除カラムで第V I I I因子溶液を分離した。カラムの出口で280nmでの吸光度が、0.035AUを超えたとき、溶出物の収集を始め、吸光度が0.05に減少したとき、溶出物の収集を止めた。サンプルをロードと溶出物から取り、FV I I I：C、FV I I I：Ag、SEC-HPLC1、およびFV I I I ウェスタンブロットについて分析した。

【0104】

【表5】

表5, サイズ排除法からの結果

サンプル	量 (mL)	FVIII:C (IU/ml) / (MIU)	総FVIII :C (%)	FVIII:Ag (IU/ml) / (MIU)	総FVIII:Ag (%)	比 (C/Ag)
出発材料 (ロード)	489	14633/7.2	100	17582/8.6	100	0.83
溶出	1190	6399/7.6	106%	6780/8.1	94	0.94

【0105】

表5は、出発材料から不活性型第V I I I因子がサイズ排除工程で除去されたことを表している。F V I I I : A gとして測定した得られた第V I I I因子の総量と比較したF V I I I : Cとして測定した生物学的活性型第V I I I因子の比は、出発材料で0.83であり、溶出画分で0.94であった。このことは、凝集化および／または断片化のどちらかに起因する不活性型第V I I I因子がサイズ排除カラムで除去されたことを示す。図2のレーン5は、溶出画分の第V I I I因子のバンドパターン特性が対照と比較して等しいことを示す。図5は、通常の条件下のS E C - H P L C 1分析を使用して、溶出物では第V I I I因子単量体が多く(>99%)、凝集体含有量が少ない(<1%)ことを示している。図3は、生成(p r o d u c t i o n)サイズ排除クロマトグラムの生成物が表しているように、単量体第V I I I因子製品から凝集体と断片が実際に除去されたことを示す。

10

【0106】

結論 実施例3

サイズ排除クロマトグラフィー工程は、異なるサイズの分子の分離によって、減少した、および／またはF V I I I : C活性がない第V I I I因子分子を除去する。図5と表5から分かるように、クロマトグラフィー環境と方法のパラメーターは、処理中にこれらの凝集と除去を促進し、高い生物学的活性(C / A g > 0.9)を有する単量体の多い(>99%)第V I I I因子製品が得られる。

20

【0107】

実施例4, 親和性クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、およびサイズ排除クロマトグラフィーの逐次使用

【0108】

以下の方法は、逐次行われる3つの異なるクロマトグラフィー技術からなる精製シーケンスを実施して、第V I I I因子:C活性のない形態の第V I I I因子を除去することを説明する。

1. 親和性クロマトグラフィー(V I I I S e l e c t)
2. 陰イオン交換クロマトグラフィー(Q S e p h a r o s e F F)
3. サイズ排除クロマトグラフィー(S u p e r d e x 200 p. g.)

30

【0109】

カラムおよび樹脂

1. 親和性クロマトグラフィー(V I I I S e l e c t)

B P G 140カラムにV I I I S e l e c t樹脂を詰めて、1.5リットルのカラム体積となる10cmのベッド高とした。V I I I S e l e c t樹脂はG E H e a l t h c a r e (カタログ番号17-5450)から入手した。

【0110】

2. 陰イオン交換クロマトグラフィー(Q S e p h a r o s e F F)

B P G 100カラムにQ S e p h a r o s e F F樹脂を詰めて、0.55リットルのカラム体積となる7cmのカラム高にした。Q S e p h a r o s e F F樹脂はG E H e a l t h c a r e (カタログ17-0510)から入手した。

40

【0111】

3. サイズ排除クロマトグラフィー(S u p e r d e x 200 p. g.)

B P G 100カラムにS u p e r d e x 200 p. g.樹脂を詰めて、5.4リットルのカラム体積となる69cmのベッド高にした。S u p e r d e x 200 p. g.樹脂はG E H e a l t h c a r e (カタログ番号17-1043)から入手した。

【0112】

親和性工程の出発材料、バッファー組成:

0.34mol/kgのNaCl、0.035mol/kgのCaCl₂、0.01mol/kgのL-ヒスチジン、0.045mol/kgのL-アルギニン、0.2mol

50

／kgのソルビトール、0.02% (w/w) のポリソルベート80、1% (w/w) の Triton X-100、0.3%のトリ-n-ブチルホスフェート (TNBP、w/w)、pH6.5を出発材料として使用した。本明細書の一部として援用される国際公開第2009/156430A1号にさらに記載されているように、出発材料を製造した。

【0113】

陰イオン交換工程の出発材料、バッファー組成：

0.15mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02% (w/w) のポリソルベート80、pH7.5を出発材料として使用した。

【0114】

サイズ排除工程の出発材料、バッファー組成：

0.39mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02% (w/w) のポリソルベート80、pH6.2を出発材料として使用した。

【0115】

親和性クロマトグラフィーのバッファー組成：

平衡化バッファー (Triton X-100およびTNBP含有)

0.3mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂ (2×H₂O)、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、1%w/wのTriton X-100、0.3%w/wのTNBP、pH: 6.5±0.1、伝導率: +25℃で31±3mS/cm

洗浄バッファー1 (Triton X-100およびTNBPを含有しない平衡化バッファー)

0.3mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02% (w/w) のポリソルベート80、pH: 6.5±0.1、伝導率: +25℃で31±3mS/cm

洗浄バッファー2

1.0mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02% (w/w) のポリソルベート80、pH: 6.5±0.1、伝導率: +25℃で85±3mS/cm。

溶出バッファー

1.5mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02% (w/w) のポリソルベート80、50% (w/w) のエチレングリコール (EG)、pH: 6.5±0.1、伝導率: +25℃で39±3mS/cm。

【0116】

平衡化バッファー、洗浄バッファー、および溶出バッファーは、記載のpH、濃度、およびバッファー、塩、または界面活性剤の種類に限定されない。

【0117】

陰イオン交換クロマトグラフィーのバッファー組成：

平衡化バッファー

0.1mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂ (2×H₂O)、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02% (w/w) のポリソルベート80、pH: 7.5±0.1、伝導率: +25℃で15±1mS/cm

洗浄バッファー

0.32mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02% (w/w) のポリソルベート80、pH: 7.5±0.1、伝導率: +25℃で32.5±2.5mS/cm

溶出バッファー

0.39mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02% (w/w) のポリソルベート80、pH: 6.0±

10

20

30

40

50

0. 1、伝導率：+ 25℃で $40 \pm 2 \text{ mS/cm}$ 。

【0118】

平衡化バッファー、洗浄バッファー、および溶出バッファーは、記載の pH、濃度、およびバッファー、塩、または界面活性剤の種類に限定されない。

【0119】

サイズ排除クロマトグラフィーのバッファー組成：

平衡化バッファー

30.7 g/kg の NaCl、0.5 g/kg の CaCl_2 、2.0 g/kg のクエン酸ナトリウム、9.2 g/kg のアルギニン、9.2 g/kg のスクロース、0.02% (w/w) のポリソルベート 80、pH：7.0 ± 0.1、伝導率：+ 25℃で $49 \pm 2 \text{ mS/cm}$

10

【0120】

平衡化は、記載の pH、濃度、およびバッファー、塩、または界面活性剤の種類に限定されない。

【0121】

それぞれのカラム（親和性クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー）を上記で定義した平衡化バッファーで平衡化した。

【0122】

最初に、出発材料をロードすることにより、上記で定義し表 6 にある通りに親和性クロマトグラフィー樹脂を処理し、次いで、上記で定義した洗浄バッファー 1 と洗浄バッファー 2 でカラムを洗浄した。その後、生物学的に活性な第 V I I I 因子製品を溶出バッファーによって溶出した。サンプリング（F V I I I : C、F V I I I : A g）後、溶出物を以下の陰イオン交換クロマトグラフィー工程の出発材料とした。

20

【0123】

親和性クロマトグラフィー工程からの溶出物を 10 倍希釈して、上記に定義した出発材料の条件を達成した。希釈した出発材料を陰イオン交換カラムで処理し、次いで、上記で定義した洗浄 1 と洗浄 2 で処理した。その後、生物学的に活性な第 V I I I 因子製品を溶出バッファーによって溶出した。サンプリング（F V I I I : C、F V I I I : A g）後、溶出物を、次のサイズ排除クロマトグラフィー工程の出発材料とした。

【0124】

上記で定義し表 6 にある通りに、陰イオン交換工程からの溶出物を、凍結している場合には解凍し、凍結していない場合には、直接サイズ排除クロマトグラフィー工程で処理した。カラムに製品を添加後、単量体第 V I I I 因子画分が溶出するまで、平衡化バッファーをカラムで処理した。280 nm で測定した吸光度が、0.04 AU を超えたときに、単量体第 V I I I 因子画分を始めた。そして、280 nm で測定した吸光度が、0.01 AU に戻ったときに、第 V I I I 因子単量体画分の収集を止めた。溶出物をサンプリングし、F V I I I : C、F V I I I : A g、F V I I I ウェスタンブロット、SEC_HPLC、およびアミノ酸組成について分析した。

30

【0125】

上記の手順を特定の条件（表 6）の下で 5 つの異なるバッチで繰り返して、再現性を検討した。その結果は、表 7 に示される。

40

【0126】

【表 6】

表 6, 5つの異なるバッチのカラムのローディング特性

<u>バッチ</u>	<u>親和性</u>		<u>陰イオン交換</u>		<u>サイズ排除</u>	
	<u>FVIII:C</u> <u>IU/mL</u>	<u>FVIII:C IU/mL</u> <u>樹脂</u>	<u>FVIII:C</u> <u>IU/mL</u>	<u>FVIII:C</u> <u>IU/mL</u> <u>樹脂</u>	<u>FVIII:C</u> <u>IU/mL</u>	<u>カラム</u> <u>ロード</u> <u>(%)</u>
<u>バッチ1</u>	<u>993</u>	<u>7987</u>	<u>281</u>	<u>13016</u>	<u>12187</u>	<u>8</u>
<u>バッチ2</u>	<u>1165</u>	<u>9003</u>	<u>315</u>	<u>14671</u>	<u>14601</u>	<u>5/4*</u>
<u>バッチ3</u>	<u>652</u>	<u>9355</u>	<u>360</u>	<u>14735</u>	<u>14559</u>	<u>5/5*</u>
<u>バッチ4</u>	<u>775</u>	<u>11114</u>	<u>342</u>	<u>17631</u>	<u>15067</u>	<u>5/5*</u>
<u>バッチ5</u>	<u>628</u>	<u>8423</u>	<u>317</u>	<u>14405</u>	<u>16058</u>	<u>7</u>

10

20

【0127】

＊サイズ排除カラムを、規定された最大のカラムロードである8%を超えないように、2サイクルで実施し、その後、得た2つの溶出物を1つのプールへと混合し、そこから分析用のサンプルを取り出した。

【0128】

【表 7】

バッチ	VIIISelect出発物			VIIISelect溶出物			陰イオン交換溶出物			サイズ排除溶出物		
	FVIII:C (IU/mL)	FVIII:Ag (IU/mL)	比 C/Ag	FVIII:C (IU/mL)	FVIII:Ag (IU/mL)	比 C/Ag	FVIII:C (IU/mL)	FVIII:Ag (IU/mL)	比 C/Ag	FVIII:C (IU/mL)	FVIII:Ag (IU/mL)	比 C/Ag
1	1005	1455	0,69	3087	3841	0,80	13016	15617	0,83	6923	7242	0,96
2	632	924	0,68	3170	4202	0,75	14671	17533	0,84	5202	5450	0,95
3	755	1027	0,74	3442	4513	0,76	14735	16276	0,91	5602	5939	0,94
4	966	1433	0,67	3887	4424	0,88	17631	20076	0,88	7126	6519	1,09
5	755	1020	0,74	2796	3547	0,79	14405	18406	0,78	7144	8848	0,81
平均	823	1172	0,70	3276	4105	0,80	14892	17582	0,85	6399	6800	0,95
SD			0,03			0,05			0,05			0,10

表 7， 逐次的な精製方法からの F V I I I C / A g の結果

表 7 は、5 つの異なるバッチから、方法の第 1 の精製工程（親和性クロマトグラフィー）、次いで、方法の第 2 の精製工程（陰イオン交換クロマトグラフィー）、最後に、方法の最後の精製工程（サイズ排除クロマトグラフィー）を経て、不活性型第 V I I I 因子が出発材料から除去されたことを示す。

【0130】

図 6 は、サイズ排除クロマトグラフィー工程で実施した（表 6 ～ 7 に記載の）5 つの製造バッチのクロマトグラフィーオーバーレイを示す。サイズ排除溶出物画分の収集の開始と終了は、図に示されている。

【0131】

F V I I I : A g として測定した利用可能な第 V I I I 因子の総量と比較した F V I I I : C として測定した生物学的に活性な第 V I I I 因子の比は、親和性工程の前の出発材料で平均値が 0.70 であった。F V I I I : C / A g 比は、その後親和性工程の後では増加して平均値が 0.80 となり、陰イオン交換の後ではさらに増加して平均値が 0.85 となる。そして、最終的には、最後のサイズ排除精製工程の後では、最適な F V I I I : C / A g 比である 1.0 に近い 0.95 に至る。このことは、さらに表 7 に見ることができ、表 7 には、実施された全 5 つのバッチについて、それぞれの工程での全ての F V I I I : C および F V I I I : A g の濃度、ならびに F V I I I : C / F V I I I : A g の比が示されている。

【0132】

図 7、9、11、13、および 15 は、表 6 ～ 7 に定義されているバッチ 1 ～ 5 の陰イオン交換溶出物の S E C - H P L C 1 分析後の結果を示す。全ての陰イオン交換溶出物サンプルの S E C - H P L C 1 の結果は、全く凝集体がない（4 バッチ）か非常に低い（< 1 %）凝集体の量（5 つのバッチで、平均値は 0.1 %）、> 97 % の F V I I I 単量体含有量（5 つのバッチで、平均値は 98.5 %）、および < 2 % の断片含有量（5 つのバッチで、平均値は 1.4 %）を示す。親和性工程、次いで陰イオン交換工程を実施後の陰イオン交換溶出物は、第 V I I I 因子単量体の高い含有量、および潜在的免疫原性の凝集／断片型 F V I I I 部分の低い含有量を示す。

【0133】

図 8、10、12、14、および 16 は、表 6 ～ 7 に定義されているバッチ 1 ～ 5 のサイズ排除溶出物の S E C - H P L C 1 分析後の結果を示す。全てのサイズ排除溶出物サンプルの S E C - H P L C 1 の結果は、目視できないか検出不可能な量の凝集体、> 98 % の F V I I I 単量体含有量（5 つのバッチで、平均値は 98.6 %）、および < 2 % の断片含有量（5 つのバッチで、平均値は 1.4 %）を示す。親和性工程、次いで陰イオン交換工程およびサイズ排除工程を実施後のサイズ排除溶出物は、第 V I I I 因子単量体の高い含有量、凝集体の検出不可能または目視できない徴候、F V I I I 断片の低い含有量を示す。

【0134】

結論 実施例 4

実施例 4 に係るシーケンス 1 ～ 3 を実施した全 3 つのクロマトグラフィー工程は、本発明に係る不活性型第 V I I I 因子分子の除去を提供する。このことは、異なる工程を介して除去された不活性型第 V I I I 因子分子は、その生物物理学的特性が異なること、および、工程を互いに順次組み合わせて実施して、最も低い程度の不活性型第 V I I I 因子含有量と最も高い程度の第 V I I I 因子単量体含有量を有する最終的な第 V I I I 因子精製製品を与えることが、患者における免疫原性反応の最も低いリスクを提供することを示す。

【0135】

実施例 5、サイズ排除クロマトグラフィーのパラメーター（カラム高、F V I I I : C 濃度、ロード）

【0136】

以下の実施例は、生物学的活性（F V I I I : C / A g）にとって重要なサイズ排除パ

10

20

30

40

50

ラメーター（F V I I I : C 濃度とカラムロード）を説明する。

【0137】

カラムおよび樹脂

B P G 2 0 0 カラムに S u p e r d e x 2 0 0 p . g . 樹脂を詰めて、19.5 リットルのカラム体積となる62cmのベッド高にした。S u p e r d e x 2 0 0 p . g . 樹脂は G E H e a l t h c a r e （カタログ番号17-1043）から得た。

【0138】

出発材料

以下の組成、0.4mol/kgのNaCl、0.02mol/kgのCaCl₂、0.02mol/kgのL-ヒスチジン、0.02%（w/w）のポリソルベート80、pH6.2、を有する第V I I I 因子を含む材料を出発材料として使用した。出発材料は実施例2に記載のように製造した（製品溶出画分）。

10

【0139】

バッファー組成：

平衡化バッファー

30.7g/kgのNaCl、0.5g/kgのCaCl₂、2.0g/kgのクエン酸ナトリウム、9.2g/kgのアルギニン、9.2g/kgのスクロース、0.02%（w/w）のポリソルベート80、pH：7.0±0.1、伝導率：+25℃で49±2mS/cm

【0140】

平衡化は、記載のpH、濃度、およびバッファー、塩、または界面活性剤の種類に限定されない。

20

【0141】

7つの異なるバッチ（A～G）を以下の表8に従って実施した。カラムを平衡化バッファーで平衡化し、次いで、出発材料を規定されているようにロードした。その後、樹脂に平衡化バッファーを流して、第V I I I 因子溶液をサイズ排除カラムで分離した。カラムの出口で280nmでの吸光度が0.035AUを超えたときに溶出物の収集を始め、吸光度が0.005AUに減少したときに溶出物の収集を止めた。サンプルを出発材料と溶出物から採取し、F V I I I : C、F V I I I : A g、およびS E C - H P L C 1について分析した。

30

【0142】

【表 8】

表 8, 実験条件と得られた生物学的に活性な F V I I I : C / A g

バッチ	FVIII:C ロード濃度, IU/mL	カラム ロード, %	出発材料の 生物学的活性, FVIII:C/Ag	溶出物の 生物学的活性, FVIII:C/Ag
A	17101	5.5	na	0.90
B	16685	5.3	0.83	0.81
C	18046	5.0	0.95	0.99
D	21445	5.2	0.97	1.01
E	15925	4.3	0.86	0.81
F	14844	1.9	0.92	0.79
G	9149	3.9	0.91	0.82

10

20

【0143】

表 8 は、サイズ排除工程による出発材料からの不活性型第 V I I I 因子の除去が、様々なパラメーターに依存していることを示す。バッチ E (15925 IU/mL、4.3%)、F (14844 IU/mL、1.9%)、および G (9149 IU/mL、3.9%) のように、カラムへの比較的低いロードと比較的低い第 V I I I 因子 : C 濃度との組み合わせは、F V I I I : C / F V I I I : A g の比で測定される生物学的活性に関して、バッチ A ~ D (A - 0.90、B - 0.81、C - 0.99、および D - 1.01) と比較して、それぞれの溶出物において (E - 0.81、F - 0.79、G - 0.82) ネガティブであるように見える。

30

【0144】

結論 実施例 5

F V I I I : C 濃度とカラムロードとの組み合わせは、生物学的活性に関するサイズ排除工程のアウトカムにとって重要なパラメーターである。ベッド高 69 cm をどちらも用いる実施例 3 と実施例 4 に記載のデータを基にすると、わずかに低いベッド高 (62 cm) を用いる実施例 5 に記載の結果も、おそらく 2 つの他の重要な要素 (F V I I I : C 濃度およびカラムロード) と組み合わせ、サイズ排除工程のアウトカムに影響を与えると考えられる。サイズ排除工程は、高い第 V I I I 因子 : C 濃度、高いカラムベッド高、および $\geq 4\%$ のカラムロードがあると良く機能することが示されている。

40

【0145】

実施例 6, 生物学的に活性な単量体第 V I I I 因子の凍結状態での安定性。

【0146】

以下の実施例は、実施例 4 により処理された生物学的に活性な単量体第 V I I I 因子溶液の凍結状態での安定性を説明する。

【0147】

出発材料 : 第 V I I I 因子単量体含有量が $> 99\%$ 、凝集体含有量が $< 1\%$ 、第 V I I I 因子の総量に対する生物学的活性型第 V I I I 因子の比 (F V I I I : C / F V I I I : A g) で測定された不活性型第 V I I I 因子量が > 0.9 である実施例 4 により生産さ

50

れた第ⅤⅠⅠⅠ因子溶液

【0148】

第ⅤⅠⅠⅠ因子のバッファー環境：

30.7 g/kgのNaCl、0.5 g/kgのCaCl₂、2.0 g/kgのクエン酸ナトリウム、9.2 g/kgのアルギニン、9.2 g/kgのスクロース、0.02% (w/w)のポリソルベート80、pH：7.0±0.1、伝導率：+25℃で49±2 mS/cm

【0149】

凍結と保存の条件：

第ⅤⅠⅠⅠ因子溶液を低密度ポリエチレンのプラスチック容器に満たし、高速凍結方法により最長60分間で-40℃へ凍結する。その後、凍結溶液を-60℃～-80℃の温度で36ヶ月間保存する。0、6、9、12、18、24、および36ヶ月の保存後サンプルを採取し、生物学的活性、および単量体、凝集、断片の含有量について分析する。

【0150】

【表9】

表9、-60℃～-80℃の温度で凍結保存した第ⅤⅠⅠⅠ因子溶液の安定性

分析	0ヶ月	6ヶ月	9ヶ月	12ヶ月	18ヶ月	24ヶ月	36ヶ月
生物学的活性 (FVIII:C, IU/mL)	5196	5150	5962	5132	5989	5220	5317
第ⅤⅠⅠⅠ因子							
単量体	>94%	>94%	>94%	>94%	>94%	>94%	>94%
凝集体	<3%	<3%	<3%	<3%	<3%	<3%	<3%
断片	<3%	<3%	<3%	<3%	<3%	<3%	<3%
(SEC-HPLC1)							

【0151】

表9から分かるように、第ⅤⅠⅠⅠ因子溶液は、生物学的活性と第ⅤⅠⅠⅠ因子単量体含有量（凝集体および断片形成）に関して、-60℃～-80℃の温度での少なくとも36ヶ月間の保存で完全に安定である。

【0152】

実施例7、生物学的に活性な単量体第ⅤⅠⅠⅠ因子の凍結乾燥製品中での安定性。

【0153】

以下の実施例は、実施例4と実施例6により処理され、その後凍結乾燥された生物学的活性型単量体第ⅤⅠⅠⅠ因子溶液の安定性を説明する。

【0154】

出発材料：第ⅤⅠⅠⅠ因子単量体含有量が>99%、凝集体含有量が<1%、第ⅤⅠⅠⅠ因子の総量に対する生物学的活性型第ⅤⅠⅠⅠ因子の比（FⅤⅠⅠⅠ：C/FⅤⅠⅠⅠ：Ag）で測定された不活性型第ⅤⅠⅠⅠ因子量が>0.9である、実施例4と実施例6により生産されて凍結された第ⅤⅠⅠⅠ因子溶液。

【0155】

凍結乾燥後の1バイアルの第ⅤⅠⅠⅠ因子の内容物：

スクロース 13.5 mg
塩酸アルギニン 13.5 mg
ポリクサマー188 3 mg
塩化ナトリウム 45 mg

塩化カルシウム二水和物 0.75 mg
クエン酸ナトリウム二水和物 3 mg
生物学的活性型第 V I I I 因子 250 IU

【0156】

凍結乾燥手順：

2. 5 mL の第 V I I I 因子の出発材料を、第 V I I I 因子の総量が 250 IU になるように、8 mL の成型ガラスバイアル（タイプ I）に入れた。表 10 に記載されているように、バイアルを凍結乾燥法に付した。

【0157】

【表 10】

10

表 10，凍結乾燥法

1. 凍結	30 分間、室温～－5℃の勾配 30 分間、－5℃で保持 1 時間、－5℃～－55℃の勾配 2 時間、－55℃で保持
2. アニール	1 時間 15 分、－55℃～－25℃の勾配 4 時間、－25℃で保持 1 時間 15 分、－25℃～－40℃の勾配 2 時間、－40℃で保持
3. 一次乾燥	0.065 m b a r へ減圧 30 分間、－40℃～－30℃の勾配 42 時間、－30℃で保持
4. 二次乾燥	0.02 m b a r へ減圧 4 時間、－30℃～＋25℃の勾配 6 時間、＋25℃で保持

20

30

【0158】

凍結乾燥法の後、バイアルをプロモブチルストッパーで封じ、アルミニウムキャップを被せた。バイアルを＋5℃で24ヶ月間保存した。0、6、9、12、18、および24ヶ月の保存後、注入用に2.5 mL の水で凍結乾燥製品を再構成することにより、サンプルを採取し、その後、生物学的活性、および単量体含有量、凝集体含有量、断片含有量に関して分析した。表 11 を参照されたい。

【0159】

40

【表 1 1】

表 1 1, 凍結乾燥し + 5 °C で保存した第 V I I I 因子溶液の安定性

分析	0 ヶ月	6 ヶ月	9 ヶ月	12 ヶ月	18 ヶ月	24 ヶ月
生物学的活性 (FVIII:C)	267 IU	280 IU	280 IU	281 IU	287 IU	282 IU
第 VIII 因子 単量体	>94%	>94%	>94%	>94%	>94%	>94%
凝集体	<3%	<3%	<3%	<3%	<3%	<3%
断片 (SEC-HPLC1)	<3%	<3%	<3%	<3%	<3%	<3%

10

表 1 1, 凍結乾燥し + 5 °C で保存した第 V I I I 因子溶液の安定性

【0 1 6 0】

表 1 1 から分かるように、凍結乾燥した第 V I I I 因子製品は、温度 5 °C での少なくとも 2 4 ヶ月間の保存で、生物学的活性および第 V I I I 因子単量体含有量（凝集体および断片形成）に関して、完全に安定である。

20

【0 1 6 1】

実施例 8, 本発明に係る最終的な凍結乾燥製品中の F V I I I C / A g の比、ならびに凝集体、単量体、および断片の測定と、本発明に係る最終的な凍結乾燥製品と異なる精製方法を使用した組み換え型製品との比較。

【0 1 6 2】

以下の実施例は、本発明に係る製品の優れた特性を説明し、本発明に係る製品を、異なる精製方法を使用した他の市販の組み換え型製品と比較する。

【0 1 6 3】

出発材料：本発明の実施例 7 に従って製造した凍結乾燥第 V I I I 因子製品を再構成し、3 つの異なる精製方法（A ~ C）により精製し異なる製剤バッファーで安定化した 3 つの異なる r F V I I I の競合製品と比較した。少なくとも 1 バイアル強度（2 5 0 I U、1 0 0 0 I U、または 3 0 0 0 I U）を、安定剤 / F V I I I に関して、異なる製剤組成間の良い比較のために分析した。全てのサンプルを、通常のランニング条件の下での S E C - H P L C 2 分析方法により、F V I I I C / A g に関して、ならびに凝集体、単量体、および断片に関して分析した。

30

【0 1 6 4】

【表 1 2】

表 1

	FVIII/ バイアル, IU	FVIII:C, IU/mL	FVIII:Ag, IU/mL	C/Ag	SEC-HPLC2, %		
					凝集体	単量体	断片
精製方法 A に よる rFVIII	250	95	132	0,72	0	76	24
精製方法 A に よる rFVIII	1000	441	573	0,77	0	76	24
精製方法 A に よる rFVIII	3000	638	925	0,69	0	76	24
精製方法 B に よる rFVIII	1000	242	263	0,92	0	99	1
精製方法 C に よる rFVIII	500	104	130	0,8	0	77	23
精製方法 C に よる rFVIII	1000	205	270	0,76	0	80	20
精製方法 C に よる rFVIII	3000	600	732	0,82	0	77	23
本発明の精製 方法による rFVIII	250	119	131	0,91	0	100	0
本発明の精製 方法による rFVIII	1000	494	531	0,93	0	100	0

10

20

30

【0165】

結論 実施例 8：

表 1 は、本発明に従って製造した組み換え型 F V I I I は、精製し凍結乾燥した製品において、単量体含有量が 100% であり、F V I I I C / A g の比が > 0.9 であり、優れた品質を示している。このことは、異なる条件下で精製し安定化した競合製品全てと比べて、最終製品中に生物学的活性がない第 V I I I 因子が全くないかほんのわずかな量であることを意味する。

【0166】

実施例 9、本発明に従って精製し、製剤化し、凍結乾燥し、保存した r F V I I I 製品の治療歴のない血友病 A 患者におけるインヒビター形成の比較、および、1つの競合の組み換え型 F V I I I 製品²¹に関する発表データとの比較。ならびに、F V I I I C / A g 比、および凝集体と単量体と断片の 2つの製品間での比較。

40

【0167】

以下の実施例は、本発明に係る製品の優れた特性を説明し、本発明に係る製品を市場で入手可能な市販の組み換え型 F V I I I 製品の 1つと比較する。

【0168】

出発材料：本発明の実施例 7に従って製造した凍結乾燥第 V I I I 因子製品を、実施例 8に記載の方法 Aにより精製した市販の 1つの競合の r F V I I I 製品と比較した。治療歴のない血友病 A 患者に対して標準的な臨床プロトコル²¹に従い、2つの製品を患者に対して投与し、インヒビター形成の発生を追跡した。それぞれの製品でのインヒビターを発

50

生した患者の数、ならびに、第 V I I I 因子 C / A g 比、および凝集体 / 単量体 / 断片の特性は、表 2 に示される。

【 0 1 6 9 】

【表 1 3】

表 2

	FVIII/バイアル, IU	FVIII:C, IU/mL	FVIII:Ag, IU/mL	C/Ag	SEC-HPLC2, %			治療歴のない患者の (PUP の) インヒビター, % (n=全治療患者 の数)
					凝集体	単量体	断片	
精製方法 A に よる rFVIII	250	95	132	0,72	0	76	24	35,2 (128)*
精製方法 A に よる rFVIII	1000	441	573	0,77	0	76	24	
精製方法 A に よる rFVIII	3000	638	925	0,69	0	76	24	
本発明による rFVIII	250	119	131	0,91	0	100	0	11,6 (43)**
本発明による rFVIII	1000	494	531	0,93	0	100	0	

【 0 1 7 0 】

*は、Collins の 2014 年の研究^{2 1}で発表されている、**は、進行中の研究の未公表データである

【 0 1 7 1 】

結論 実施例 9 :

表は、1つの市販の rFV I I I 製品と比べて、本発明の製品を使用した治療歴のない血友病 A 患者で検出されたインヒビターの量が著しく低かったことを示している。また、表 10 は、各製品の異なるバイアル強度の 2 つ (250 IU および 1000 IU)、3 つ (250 IU、1000 IU、および 3000 IU) の例の第 V I I I 因子 C / A g 比と凝集体 / 単量体 / 断片の特性を示している。製品中の生物学的不活性型 F V I I I の量が低いことが、患者で形成されるインヒビターの量を減少させることを仮定し得るであろう。従って、免疫反応に関する患者のリスクを最小限にするために、組み換え型 F V I I I 製品の精製、安定化、凍結乾燥、および保存の重要性が関係している。

【 0 1 7 2 】

実施例 10, 本発明に従って精製した組み換え型 F V I I I 製品の比活性 (純度)。

【 0 1 7 3 】

以下の実施例は、本発明に従って精製した組み換え型 F V I I I 製品が高純度であることを説明する。

【 0 1 7 4 】

出発材料: 実施例 4 と実施例 6 に従って製造した第 V I I I 因子単量体含有量が > 99 %、凝集体含有量が < 1 %、第 V I I I 因子の総量に対する生物学的活性型第 V I I I 因子

の比 (F V I I I : C / F V I I I : A g) として測定された不活性型第 V I I I 因子の量が > 0. 9 の凍結した V I I I 因子溶液を、F V I I I : C と全タンパク質含有量をブラッドフォードに従って分析した。

【0175】

結論 実施例 10 :

図 18 は、製造規模において、本発明に従って精製した 9 バッチ (3 つの最終工程 ; 親和性溶出物、陰イオン交換溶出物、および製剤原料 (= サイズ排除クロマトグラフィー溶出物)) で、F V I I I : C / m g タンパク質 (ブラッドフォードで測定) により測定した純度が増加し、最終的に 10000 I U / m g タンパク質の範囲内の純度となり、実質的に純粋な r F V I I I であることを示す。

10

【0176】

分析の説明

第 V I I I 因子の生物学的活性 (F V I I I : C) を、第 V I I I 因子の生物学的活性を補助因子として測定する 2 段階の測光法に基づく発色アッセイ (C O A T E S T S P F V I I I キット、82 4086 63、Chromogenix / Instrumentation Laboratory (米国)) ⁽¹⁷⁾ で測定した。

【0177】

第 V I I I 因子抗原含有量 (F V I I I : A g) を、E L I S A キット (A S S E R A C H R O M (登録商標) V I I I : A g、第 V I I I 因子の酵素免疫測定、キット、D i a g n o s t i c a S t a g o (フランス)) を用いて、さらに記載されているように ⁽¹⁸⁾、サンプルの希釈のために提供されたキットバッファーを、T r i s - N a C l バッファー + 1 % ウシ血清アルブミンで置き換えて測定した。

20

【0178】

第 V I I I 因子の単量体、凝集体、および断片を、2 つの異なるサイズを排除するサイズ排除クロマトグラフィー (S E C - H P L C) 分析用カラム (S E C - H P L C 1 は、G E H e a l t h c a r e の S u p e r d e x 200, 10 / 300 G L、S E C - H P L C 2 は、A g i l e n t T e c h n o l o g i e s の B i o S E C - 3) を使用して測定した。

【0179】

S E C - H P L C 1 法 (S u p e r d e x 200) を、通常のパッファー条件 (25 mM の H E P E S、0. 5 M の N a C l、0. 3 M のアルギニン、50 mM の C a C l₂、0. 02 % のポリソルベート 80、pH 7. 5) の下で実施した。サンプルロードは、サイズ排除カラムのおよそ 1 % であり、第 V I I I 因子 : C 濃度は、およそ 1000 I U / m L である。単量体が主要な F V I I I クロマトグラムピークとして決定され、凝集体が F V I I I 単量体のピークの前に溶出しているピークとして決定され、断片を F V I I I 単量体のピークの後に溶出しているクロマトグラムピークと決定された。

30

【0180】

S E C - H P L C 2 法 (B i S E C - 3) 組み換え体で発現させた F V I I I のサンプルを、F V I I I の凝集体、単量体、および断片の組成に関して、サイズ排除クロマトグラフィー (A g i l e n t T e c h n o l o g i e s の B i o S E C - 3, 30 × 4. 6 mm S E C カラム) を用いて、未変性のパッファー条件 (25 mM の T r i s - H C l、50 mM の C a C l₂、500 mM の N a C l ; pH 7. 0) の下で、0. 4 m L / 分の流速で、S h i m a d z u H P L C 系で、分析した。サンプルロードは、測定した F V I I I 活性 (F V I I I : C) の値によると、およそ 0. 2 ~ 0. 4 μ g であった。単量体が主要な F V I I I クロマトグラムピークとして決定され、凝集体が F V I I I 単量体のピークの前に溶出しているピークとして決定され、断片が F V I I I 単量体のピークの後に溶出しているクロマトグラムピークと決定された。また、分析した r F V I I I サンプルの滞留時間を、分子量サンプル (15 ~ 600 k D、69385、S i g m a - A l d r i c h C h e m i e 社) の滞留時間と比較した。

40

【0181】

50

サイズに基づいた第V I I I因子の変性製品を、F V I I I ウェスタンブロットを用いて測定する。第V I I I因子製剤中のF V I I I分子量分布タンパク質およびペプチドを、ドデシル硫酸ナトリウム（S D S）ポリアクリルアミドゲル電気泳動（P A G E）により還元条件下で、分子量に従って分離する。その後、タンパク質をゲルマトリクスからニトロセルロース膜に電気泳動的に移し、その後、ブロッキング剤と共にインキュベートする。次に、ヒト第V I I I因子分子全体に対する市販のポリクローナルヒツジ抗体を加え、その後、二次酵素標識抗体をプローブとして加える。第3の工程として、化学発光基質を加え、酵素と結合したときに、副産物として光が生成する。冷却電荷結合素子カメラを用いてリアルタイム・イメージとして光の出力を捉える。シグナル強度は、ブロッティング膜上の抗原（F V I I I）の存在量と相関する。

10

【0182】

第V I I I因子タンパク質鎖の電気泳動のバンドパターンを検討するために、銀染色を用いる二次元電気泳動を実施した。第1の次元の操作としてp H 3～10の直線p H勾配を使用して等電点電気泳動を実施した。第2の次元のS D S－P A G Eをトリス－アセテート（3～8%）ゲルを用いて実施した。第2の次元の操作後、ゲルを銀染色で染色した。

【0183】

アミノ酸組成分析を、タンパク質の酸加水分解を伴うアミノ酸組成分析により実施した。タンパク質を、110℃で24時間、6M H C l中で加水分解した。その後、スルホン化ポリスチレン樹脂を用いる陽イオン交換クロマトグラフィーによりアミノ酸を分離し、溶離液中で連続的に検出する。検出は、プロリンを440nmで、他の全てのアミノ酸を570nmで同時に測定する二元光度計を使用するポストカラムニンヒドリン誘導体化に基づく。この方法は、システインまたはトリプトファンを適切に測定しないので、これらの残基からは何の値も測定できない。バッファー製剤中に存在するリシンとアルギニンの妨害があるため、リシンとアルギニンの値もまた除外された。

20

【0184】

N－グリカンフィンガープリント法を、パルスアンペロメトリック電気化学検出法（H P A E C－P A D）を用いる高速陽イオン交換クロマトグラフィーによって実施して、N結合グリカン測定した。^{（19）}N結合グリカン鎖を、酵素的切断（P r o z y m eからのN－G l y c a n a s e P l u s, 製品番号G K E－5010B）によりタンパク質から外し、続いて、高いp H（p H 13）で、次いでイオン強度が増加しp Hが減少する勾配で、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムと結合させた。クロマトグラフィーシステム中の様々なグリカン鎖の分離を、電荷、サイズ、および構造における違いにより達成する。陽イオン交換カラムは、D i o n e xからのC a r b o P a c（登録商標）P A 200クロマトグラフィーカラム（250mm×3mm I D、粒径5.5μm、製品番号062896）とD i o n e xからのC a r b o P a c（登録商標）P A 200 g u a r d c o l u m n（50×3mm I D、製品番号062895）であった。使用した検出系は、3mmのゴールドメンブレン（I C S－3000 A u W o r k i n g E l e c t r o d e、3mm、製品番号063723）を用いるI C S－3000 C D電気化学検出器であり、C h r o m e l e o nというソフトウェアにより制御した。

30

40

【0185】

様々なクロマトグラフィーピークに対応するサンプルを、1分の滞留時間に対応する各画分と共に、画分中に収集した。グリカン、多孔性黒鉛炭素カラムで脱塩し、その後、各画分を濃縮した。P G Cカラムを用いたキャピラリーL C系上でクロマトグラフィー分離を実施し、飛行時間型質量分析とオンラインでグリカンを経電ロスプレーした。F u n c t i o n a l G l y c o m i c s [www.functionalglycomics.org]からのデータベースを、質量を入力し候補を検索することによって使用した。質量精度が高い（約30ppm）ので、それぞれのグリカンの同定を正確であると判断した。

【0186】

2つの主要な工程を含むトリプシンペプチドフィンガープリントマッピングを実施した

50

。第1の工程において、トリプシンを使用して、分析対象のタンパク質をポリペプチドへと消化し、第2の工程において、ポリペプチドを分離してHPLC技術を使用して記録する。この方法により、特異的なパターン（「フィンガープリント」）が生成する。UV検出と比べてより単純化したマップが得られるペプチドの蛍光（主にトリプトファン）によりペプチドを検出する。記録された経時的な蛍光パターンは、分析されたサンプルのペプチドマップを表す。

【0187】

タンパク質濃度は、ブラッドフォードアッセイ^{2 3}を使用して測定した。

【0188】

VIIISelectは、組み換え型Bドメイン欠失第VII因子の精製用に設計された親和性クロマトグラフィー媒体（樹脂）である。

10

【0189】

データファイル28-9662-37 ABによると、GE healthcareのVIIISelectの主な特徴として、以下が挙げられる。

・収率が高く、比活性が保持される、組み換え型Bドメイン欠失第VII因子の効率的な精製

- ・高い選択性
- ・優れた拡張性
- ・動物によらない（Animal-free）製造

【0190】

組み換え型血液凝固因子の効率的な精製方法は、血友病患者を治療するために必要である。VIIISelectは、血友病Aの治療のために使用される主要な組み換え型血液因子である、組み換え型Bドメイン欠失第VII因子の精製のために設計された親和性クロマトグラフィー媒体である。第VII因子分子の微妙な性質のために、下流の方法における工程の数を制限することが重要である。VIIISelectを使用して得られる高い選択性と収率は、一工程で良好な純度が得られる確固たる効率的な精製方法を可能にする。他の特性として、動物によらない（Animal-free）生成トリガンドの漏れが少ないことが挙げられ、この特性のため、この媒体は、組み換え型Bドメイン欠失第VII因子の大規模な製造に非常に適している。VIIISelectは、GE Healthcareの特注設計媒体プログラム（Custom Designed Media program）の一部である。

20

30

【0191】

媒体特性

VIIISelectは、大きなサンプル体積の高速な処理を可能にする、高度に架橋されたアガロースベースマトリクスをベースとする。13kDの組み換えタンパク質であるリガンドは、組み換え型ドメイン欠失第VII因子との結合にリガンドを利用しやすくする親水性スパーアームを介して多孔性ベースマトリクスと結合している（図1）。表1は、VIIISelectの主要な特性を要約している。

【0192】

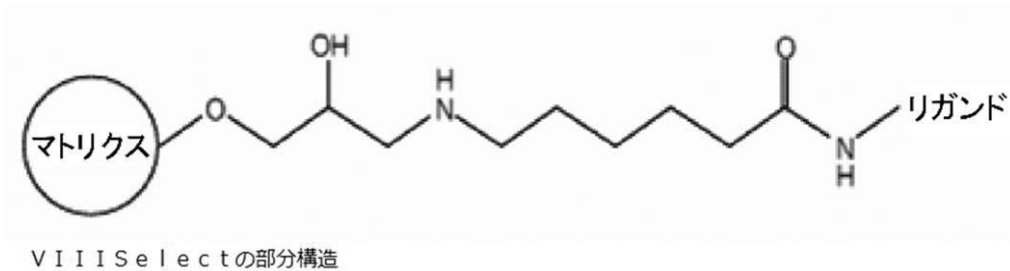
機能原理

親和性クロマトグラフィーは、適当な結合条件の下で特異的な分子または分子の基を吸着し、適当な溶出条件の下でそれらを放出する、固定化されたりリガンドを利用する。これらの条件は、標的分子、原料組成、およびクロマトグラフィー媒体に依存し、製品の回収が最も多くなる標的分子と結合する条件を確立するために、これらの条件を、その他のクロマトグラフィーパラメーター（例えば、サンプルロード、流速、ベッド高、

40

【0193】

【化 1】



【0194】

再生、および定置洗浄（c l e a n i n g - i n - p l a c e）と共に検討しなければならない。

【0195】

組み換え型第 V I I I 因子を、精製した細胞溶解物または上清から V I I I S e l e c t カラムに直接加えることができる。

【0196】

【表 14】

表 1. V I I I S e l e c t の主要な特性

マトリクス	高度に架橋されたアガロース
平均粒径	7 5 μ m
リガンド	出芽酵母（S . c e r e v i s i a e）で製造された組み換えタンパク質（Mr _r 1 3 0 0 0）
容量	通常 2 0 0 0 0 I U / m L ゲル
推奨流速	3 0 c m のベッド高で 3 0 0 c m / 時まで
最大背圧	0 . 3 M P a 、 3 バール
p H の安定性	
長期間	3 ～ 1 0
短期間	2 ～ 1 2

【0197】

バッファーは、活性な立体構造の第 V I I I 因子の形成を促進するために、C a ²⁺ イオンを必ず含むべきである。表面に誘起された変性／吸収を抑制するために、界面活性剤の存在が要求される。第 V I I I 因子の比活性を維持するために、結合用、洗浄用、および溶出用の中性の p H バッファーとヒスチジンを必ず使用するべきである。V I I I S e l e c t に添加される物質の性質に依存して、通常、各サイクル後に再生が必要であり、次いで、平衡化／ローディングバッファーで再平衡化が行われる。

【0198】

安定性

リガンドは、高度に架橋されたベースマトリクスに安定なアミド結合を介して結合して

いる。図 2 はを V I I I S e l e c t が室温で様々な p H の値で一週間保存した検討を示す。図は、p H 3 ～ 1 0 で安定性が高いことを示す。G E は、p H 3 ～ 1 0 での長期間の保存、p H 2 ～ 1 2 での短期間の保存を推奨している。

【 0 1 9 9 】

保存

推奨される保存条件は、4℃～8℃で20%エタノールである。V I I I S e l e c t は、20%エタノール溶液中で予め膨潤されて供給される。

【 0 2 0 0 】

定置洗浄 (C l e a n i n g - i n - p l a c e)

V I I I S e l e c t の洗浄プロトコルは、0.1Mのクエン酸、または0.5Mのリン酸から成っても良い。しかしながら、p H < 2 への暴露の延長は、アガロースベースマトリクスが分解することから、回避するべきである。水酸化ナトリウム (0.01M) は、単独で、または安定剤としての硫酸ナトリウム／塩化ナトリウムと組み合わせて使用することができる。

【 0 2 0 1 】

参考文献

1. Wang et al., Coagulation Factor VIII; structure and stability, International Journal of pharmaceuticals 259 (2003) 1-15.
2. Svensson et al., Evaluation of the metal binding site in a recombinant coagulation factor VIII identifies two sites with unique metal binding sites, Biological Chemistry, DOI:10.1515/hsz-2012-0298
3. Peerlinck et al., Factor VIII inhibitors in previous treated Haemophilia A patientse with a double virus inactivated plasma derived Factor VIII concentrate, Thrombosis and Haemostasis 77 (1) 80-86 (1997).
4. Fang et al., The protein structure and effect of Factor VIII, Thrombosis Research (2007) 119, 1-13.
5. Lin et al., Relationship between Factor VIII:Ag and Factor VIII in recombinant and plasma derived Factor VIII concentrate, Haemophilia (2004), 10, 459-469.
6. Mire-Sluis et al., Analysis and immunogenic potential of aggregates and particles, Bioprocess International 9(11) December 2011 38-43.
7. Grillo et al., Conformational origin of the aggregation of recombinant human Factor VIII, Biochemistry 2001, 40, 586-595.
8. Wang et al., Correlation with rFVIII inactivation with aggregation in solution, Pharmaceutical Research, Vol.20, No.4, April 2003.
9. Thim et al., Purification and characterization of new recombinant Factor VIII (N8), Haemophilia (2010), 16, 349-359.
10. Kelley et al., Development and validation of ab affinity chromatography step using a peptide ligand for cGMP production of Factor VIII, Biotechnology and Bioengineering, Vol.87, No.3, August 5, 2004.
11. McCue et al., Application of a novel affinity adsorbent for the capture and purification of recombinant Factor VIII compounds, Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 7824-7830.
12. Kusch et al., Factor VIII assay mimicking in vivo coagulation conditions, Haemophilia (2013), 1-7.
13. Sommer et al., Comparative field study evaluating activity of recombinant FVII Fc fusion protein in plasma samples at clinical haemostatis laboratories, Haemophilia (2013) 1-7.
14. Muyldermans, Single domain camel antibodies: current status, Reviews in Molecular Biotechnology 74, (2001), 277-302.
15. Fay, Factor VIII: Function and structure, International Journal of Hematology 50

y 83 (2006) 103-108.

16. Metal ion-independent association of Factor VIII subunits and the roles of calcium and copper ions for cofactor activity and inter-sub-unit affinity, Biochemistry 2001, 40, 10293- 10300.

17. Rosen, Assay of Factor VIII:C with a chromogenic substrate, Scand J Haematol -Suppl 40, Vol.33, 1984, 139-145.

18. Girma et al., Assay of Factor VIII antigen (FVIII:CAg) in 294 Haemophilia A patients by a new commercial ELISA using monoclonal antibodies, (Haemophilia 1998), 4, 98-103.

19. Cataldi et al., Carbohydrate analysis by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: the potential is still growing, Fresenius J Anal Chem 2000;368:739-58.

20. Casademunt et al., The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics. Eur J Haematol. 2012;89(2):165-76.

21. Collins et al., Factor VIII brand and the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated UK children with severe haemophilia A, 2000-2011, Blood journal.org, DOI 10.1182/blood-2014-07-580498

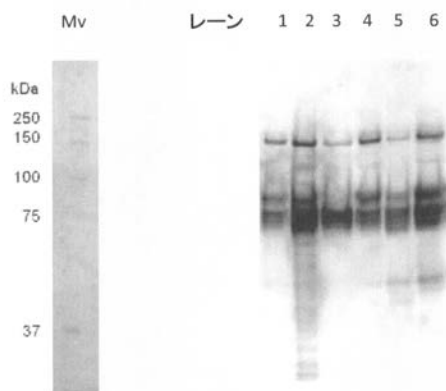
22. Boedeker, Production processes of licensed recombinant factor VIII preparations, Seminars in thrombosis and hemostasis volume 27, number 4, 2001.

23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.

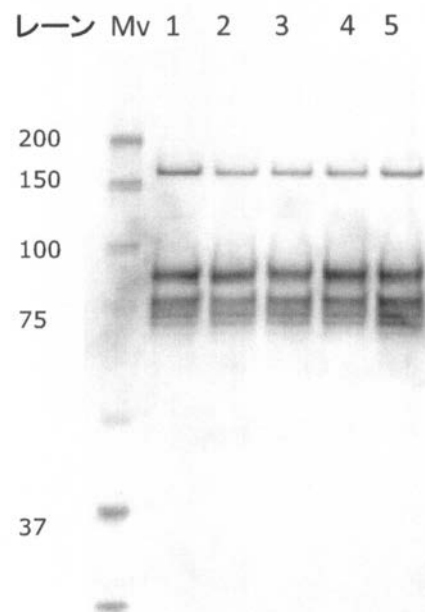
10

20

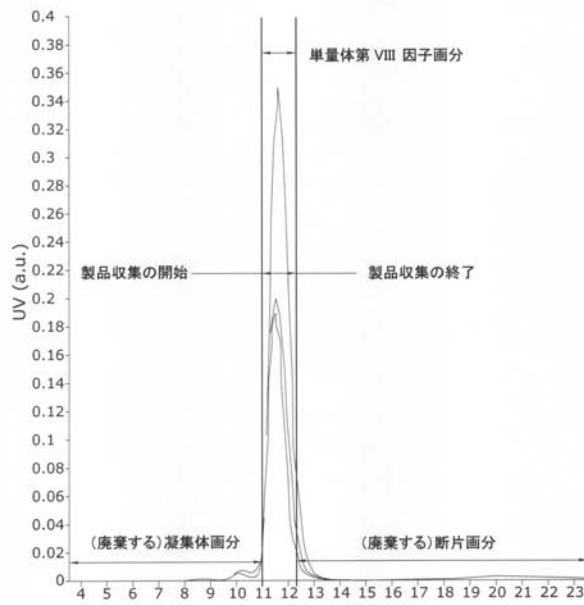
【図 1】



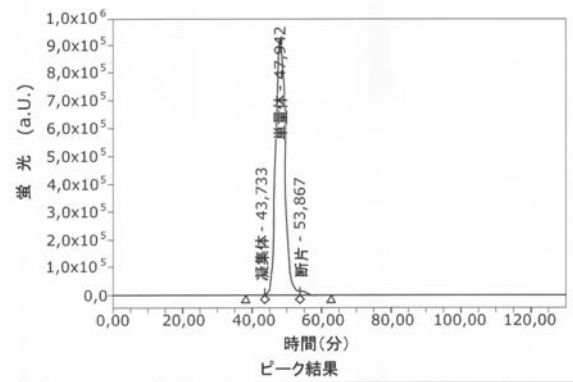
【図 2】



【図 3】



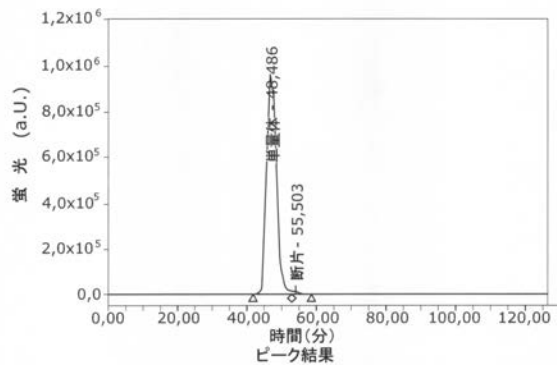
【図 4】



ピーク結果

	名称	滞留時間	面積	高さ	% 面積
1	Aggregates	43,733	6227383671	35382918	0,37
2	Monomer	47,942	1645961644105	8946052109	98,38
3	Fragments	53,867	20849064219	131492051	1,25

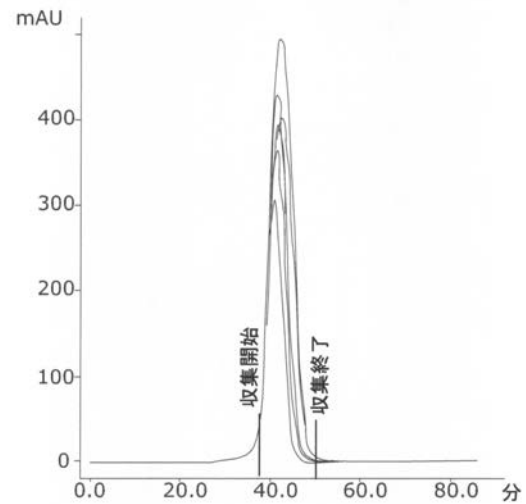
【図 5】



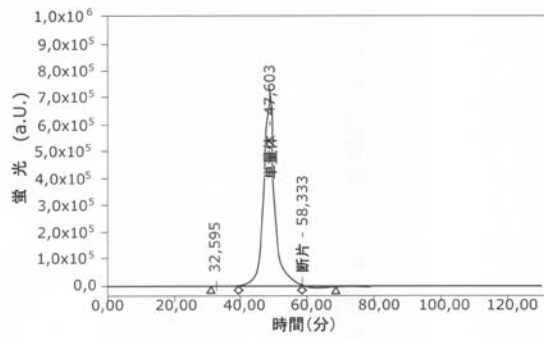
ピーク結果

	名称	滞留時間	面積	高さ	% 面積
1	Aggregates	43,000			
2	Monomer	48,486	1731766628142	9310597689	99,13
3	Fragments	55,503	15214565882	93748054	0,87

【図 6】



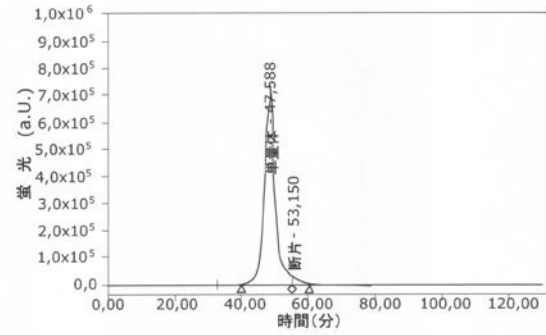
【図 7】



ピーク結果

	名称	滞留時間	面積	高さ	% 面積
1		32,595	12485306608	55110837	0,68
2	Aggregates	43,000			
3	Monomer	47,603	1787884705383	7152198232	97,21
4	Fragments	58,333	38908497096	171225327	2,12

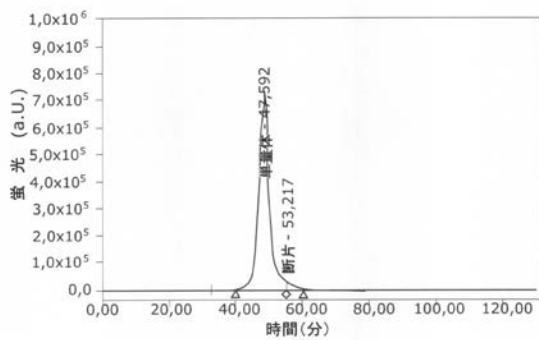
【図 8】



ピーク結果

	名称	滞留時間	面積	高さ	% 面積
1	Aggregates	43,000			
2	Monomer	47,588	1768269027462	9172995796	98,42
3	Fragments	53,150	28304093640	168373476	1,58

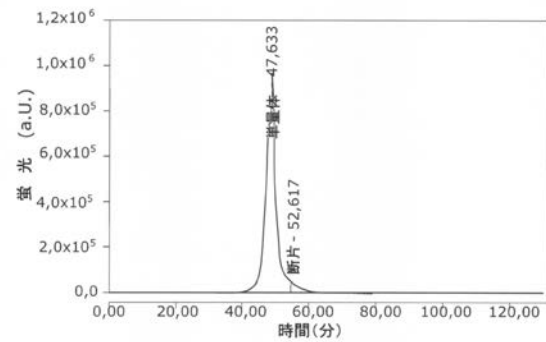
【図 9】



ピーク結果

	名称	滞留時間	面積	高さ	% 面積
1	Aggregates	43,000			
2	Monomer	47,592	1719232994028	8904449926	98,31
3	Fragments	53,217	29509101684	167045410	1,69

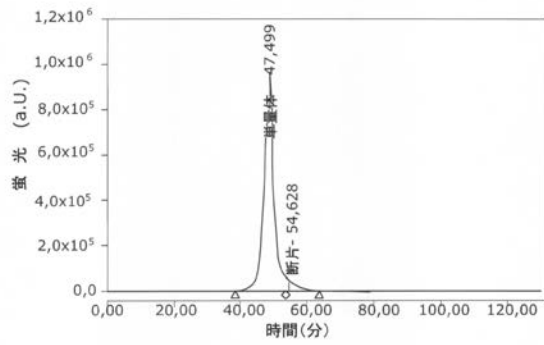
【図 10】



ピーク結果

	名称	滞留時間	面積	高さ	% 面積
1	Aggregates	43,000			
2	Monomer	47,633	1893442741446	9902048058	98,50
3	Fragments	52,617	28802684958	192960787	1,50

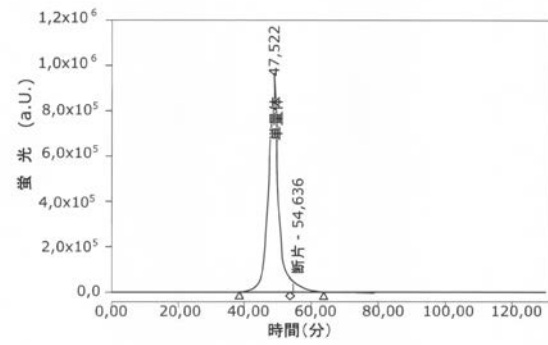
【図 1 1】



P ピーク結果

	名称	滞留時間	面積	高さ	% 面積
1	Aggregates	43,000			
2	Monomer	47,499	1773602574318	9231478934	98,96
3	Fragments	54,628	18594141020	99103234	1,04

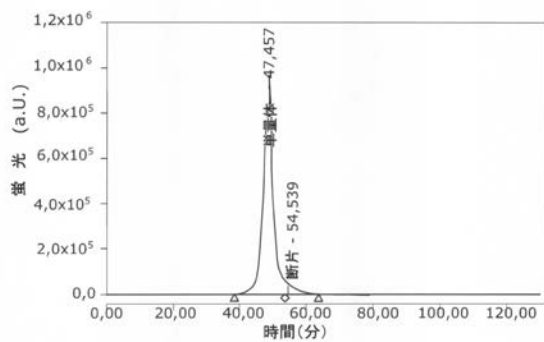
【図 1 2】



ピーク結果

	名称	滞留時間	面積	高さ	% 面積
1	Aggregates	43,000			
2	Monomer	47,522	1719646080820	8891551115	98,85
3	Fragments	54,636	19988833478	108669274	1,15

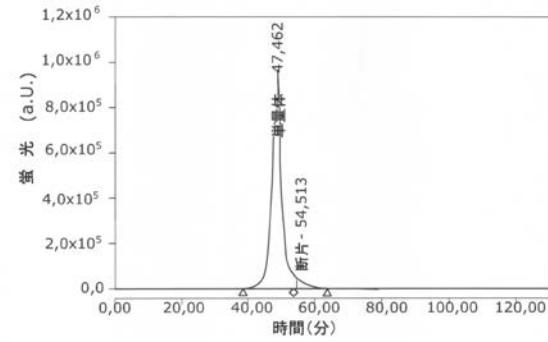
【図 1 3】



ピーク結果

	名称	滞留時間	面積	高さ	% 面積
1	Aggregates	43,000			
2	Monomer	47,522	1723045643516	8891011635	98,83
3	Fragments	54,636	20428784717	109598314	1,17

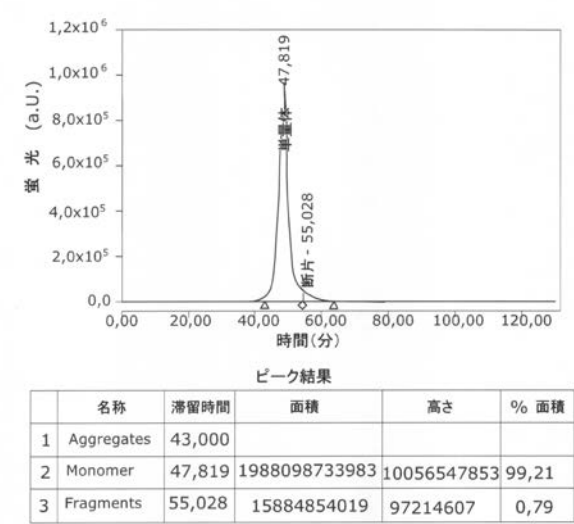
【図 1 4】



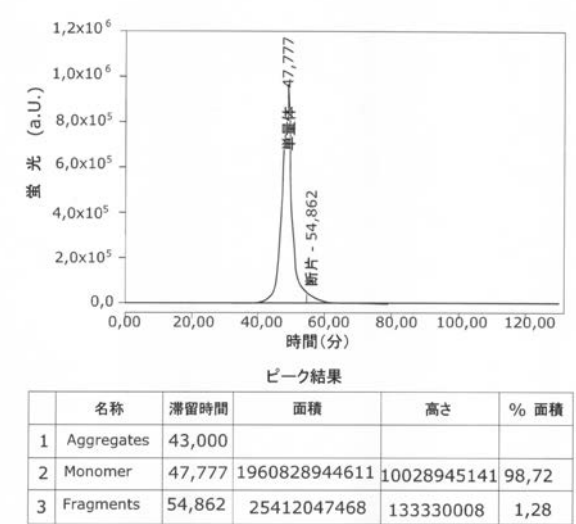
ピーク結果

	名称	滞留時間	面積	高さ	% 面積
1	Aggregates	43,000			
2	Monomer	47,462	1723203354445	8844566443	98,63
3	Fragments	54,513	23977018029	123642477	1,37

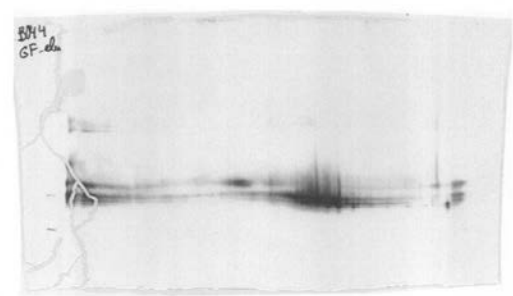
【図 1 5】



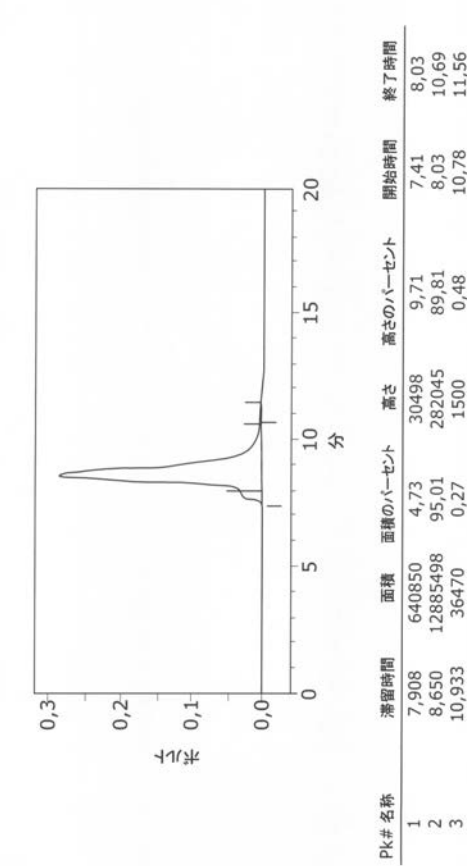
【図 1 6】



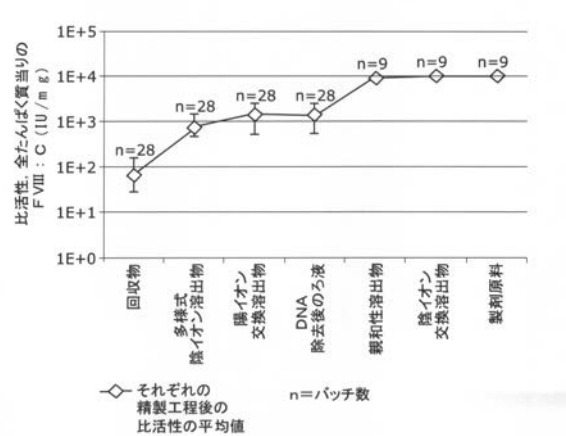
【図 1 7】



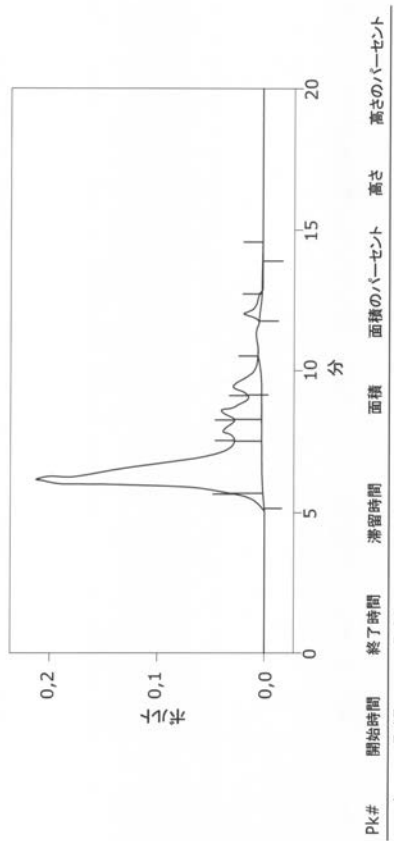
【図 1 9】



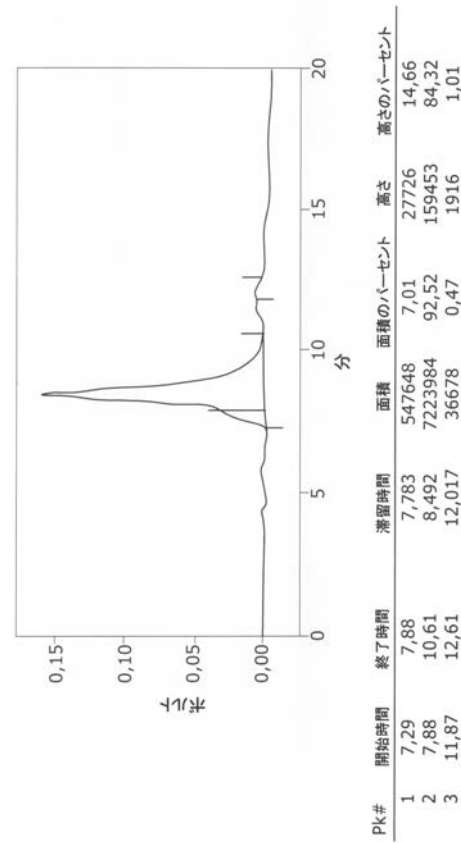
【図 1 8】



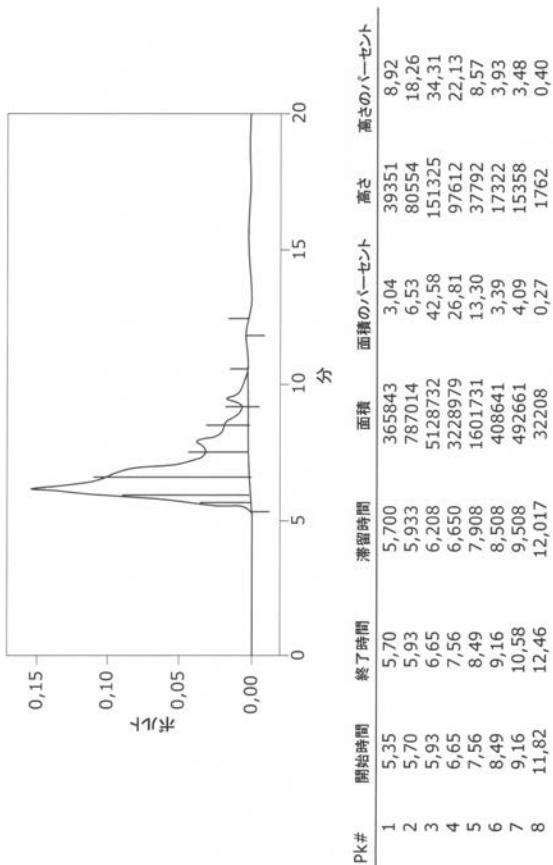
【図 20】



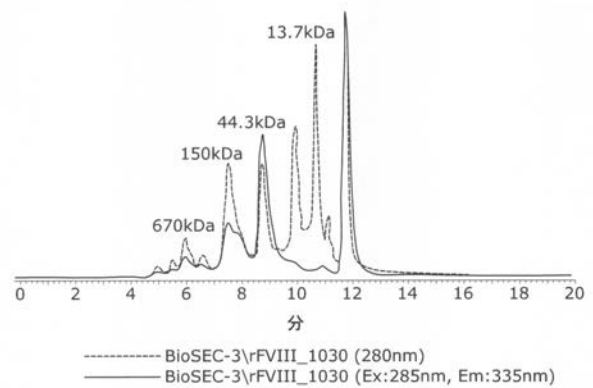
【図 21】



【図 22】



【図 23】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/051028

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/755 A61K38/37
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/156430 A1 (OCTAPharma AG [CH]; BORGVALL CARIN [SE]; ERICSSON ULRIKA [SE]; GILLJAM) 30 December 2009 (2009-12-30) cited in the application the whole document, in particular Example 8 ----- -/--	1-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 February 2015

Date of mailing of the international search report

25/02/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bassias, Ioannis

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/051028

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCCUE J T ET AL: "Application of a novel affinity adsorbent for the capture and purification of recombinant Factor VIII compounds", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, NL, vol. 1216, no. 45, 6 November 2009 (2009-11-06), pages 7824-7830, XP026691482, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2009.09.045 [retrieved on 2009-09-23] cited in the application the whole document	1,4,8, 13,15,16
X	WO 2010/115866 A1 (NOVO NORDISK AS [DK]; OESTERGAARD HENRIK [DK]; PUSATERI TONY [US]; BAR) 14 October 2010 (2010-10-14) the whole document, in particular Example 11	1,4,13, 15,16, 21,22
X	WO 97/33178 A1 (OCTAPHARMA AG [CH]; BUCHACHER ANDREA [AT]; STADLER MONIKA [AT]; JOSIC) 12 September 1997 (1997-09-12) the whole document, in particular the claims	2,3,15, 17,18
X	US 4 675 385 A (HERRING STEVEN W [US]) 23 June 1987 (1987-06-23) the whole document, in particular the claims	3,15,17, 18
X	THIM ET AL.: "Purification and characterization of new recombinant Factor VIII (N8", HAEMOPHILIA, vol. 16, 2010, pages 349-359, XP002583862, cited in the application the whole document, in particular "Material and methods"	2,15,17, 18
X	EP 0 412 466 A2 (BEHRINGWERKE AG [DE]) 13 February 1991 (1991-02-13) the whole document	2,15,17, 18
X	FR 2 650 393 A1 (HERAULT CTRE RGL TRANSFUSION S [FR]) 1 February 1991 (1991-02-01) the whole document	2,15,17, 18
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/051028

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ELISABETH CHENG ET AL: "Purification of coagulation factor VIII using chromatographic methods. Direct chromatography of plasma in anion exchange resins", BIOTECHNOLOGY LETTERS, SPRINGER NETHERLANDS, DORDRECHT, vol. 32, no. 9, 30 April 2010 (2010-04-30), pages 1207-1214, XP019813464, ISSN: 1573-6776 the whole document -----	2,15,17, 18
A	FRANCES ROTBLAT ET AL: "Purification of human factor VIII:C and its characterization by Western blotting using monoclonal antibodies", BIOCHEMISTRY, vol. 24, no. 16, 1 July 1985 (1985-07-01), pages 4294-4300, XP055121015, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi00337a007 -----	1-18
A	"VIIISelect", GE Healthcare February 2009 (2009-02), XP007922718, Retrieved from the Internet: URL:https://www.gelifesciences.com/gehcls/images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc28966237AB_20110831120139.pdf -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/051028

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009156430	A1	30-12-2009	AU 2009264282 A1	30-12-2009
			CA 2728047 A1	30-12-2009
			CN 102066417 A	18-05-2011
			DK 2300497 T3	29-10-2012
			EP 2300497 A1	30-03-2011
			EP 2537862 A1	26-12-2012
			ES 2391613 T3	28-11-2012
			IL 209758 A	27-02-2014
			JP 5619738 B2	05-11-2014
			JP 2011525523 A	22-09-2011
			KR 20110038634 A	14-04-2011
			PT 2300497 E	30-10-2012
			RU 2011102437 A	27-07-2012
			SI 2300497 T1	28-02-2013
			UA 100901 C2	11-02-2013
			US 2011160435 A1	30-06-2011
			WO 2009156430 A1	30-12-2009
WO 2010115866	A1	14-10-2010	CN 102482340 A	30-05-2012
			EP 2417155 A1	15-02-2012
			ES 2427627 T3	31-10-2013
			JP 2012522529 A	27-09-2012
			US 2012093840 A1	19-04-2012
			WO 2010115866 A1	14-10-2010
WO 9733178	A1	12-09-1997	AR 006149 A1	11-08-1999
			AU 1725297 A	22-09-1997
			EP 0885394 A1	23-12-1998
			MY 118087 A	30-08-2004
			US 6057164 A	02-05-2000
			WO 9733178 A1	12-09-1997
US 4675385	A	23-06-1987	NONE	
EP 0412466	A2	13-02-1991	AT 101041 T	15-02-1994
			AU 635298 B2	18-03-1993
			AU 6015090 A	07-02-1991
			CA 2022650 A1	08-02-1991
			DE 3926034 A1	14-02-1991
			DE 59004488 D1	17-03-1994
			DK 0412466 T3	24-05-1994
			EP 0412466 A2	13-02-1991
			ES 2062222 T3	16-12-1994
			IE 902817 A1	27-02-1991
			JP 3180957 B2	03-07-2001
			JP H03148294 A	25-06-1991
			PT 94917 A	18-04-1991
			US 5424401 A	13-06-1995
FR 2650393	A1	01-02-1991	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 P 7/04 (2006.01) A 6 1 P 7/04

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NL,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 ダダイアン、 マリナ
スウェーデン国 エス - 1 1 2 7 5 ストックホルム ノルデンフライヒツヴァーゲン 5 5 オ
クタファルマ アーバー内

(72)発明者 ヨハンソン、 エリカ
スウェーデン国 エス - 1 1 2 7 5 ストックホルム ノルデンフライヒツヴァーゲン 5 5 オ
クタファルマ アーバー内

(72)発明者 フックス、 ビルテ
ドイツ連邦共和国 1 3 3 5 1 ベルリン カメルナーシュトラッセ 4 9

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA06 BA44 CA36 CA53 DC15 MA44 NA14 ZA531
4H045 AA10 AA20 BA10 CA40 DA66 EA20 GA21 GA23 GA26