(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4250769号
(P4250769)
(45)発行日　平成21年4月8日(2009.4.8)　(24)登録日　平成21年1月30日(2009.1.30)

(51)Int.Cl.　F I
C07K 14/755 (2006.01)　C07K 14/755
C07K 1/22 (2006.01)　C07K 1/22

請求項の数 10　(全 16 頁)

(21)出願番号	特願平10-537055	(73)特許権者	
(86)(22)出願日	平成10年2月18日(1998.2.18)		バクスター・イノベイションズ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング
(65)公表番号	特表2001-513762(P2001-513762A)		オーストリア、アー－１２２１ヴィーン、インダストリーシュトラーセ６７番
(43)公表日	平成13年9月4日(2001.9.4)	(74)代理人	
(86)国際出願番号	PCT/AT1998/000033		弁理士　青山　葆
(87)国際公開番号	WO1998/038218	(74)代理人	
(87)国際公開日	平成10年9月3日(1998.9.3)		弁理士　田村　恭生
審査請求日	平成17年2月2日(2005.2.2)	(74)代理人	
(31)優先権主張番号	A339/97		弁理士　齋藤　みの里
(32)優先日	平成9年2月27日(1997.2.27)	(72)発明者	ミッテラー，アルトゥール
(33)優先権主張国	オーストリア(AT)		オーストリア、アー－２３０４マンスドルフ１１６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】高度に精製されたｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を得る方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
免疫アフィニティークロマトグラフィーによる高度に精製されたｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の回収方法であって、必須の活性成分として両性イオンを含む溶出剤によって、免疫吸着物質に結合したｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を溶出させ、これによりｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の分子的完全性を維持することを特徴とし、該両性イオンが３．２～９．６の間に等電点を有するアミノ酸またはアミノ酸類似体である、方法。
【請求項２】
両性イオンが中性アミノ酸、特にグリシン、アラニン、β－アラニン、フェニルアラニンおよびヒスチジン、またはベタインの群から選択されることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項３】
溶液中の両性イオンが０．０１から０．５Ｍ、好ましくは０．０８から０．２Ｍ、特に好ましくは０．１から０．１５Ｍの範囲の濃度で存在することを特徴とする請求項１または２のいずれかに記載の方法。
【請求項４】
溶出剤が生理的ｐＨ、好ましくはｐＨ７．０からｐＨ８．０、特に好ましくはｐＨ７．３からｐＨ７．８の範囲、最も好ましくはｐＨ７．４であることを特徴とする請求項１から３のいずれかに記載の方法。

【請求項５】
免疫吸着物質が抗ｖＷＦ抗体、好ましくはモノクローナル抗ｖＷＦ抗体であることを特徴とする請求項１から４のいずれかに記載の方法。
【請求項６】
免疫吸着物質が抗ｖＷＦ抗体の断片であることを特徴とする請求項１から４のいずれかに記載の方法。
【請求項７】
アミノ酸であるグリシン、アラニン、β－アラニン、フェニルアラニンおよびヒスチジン、またはベタインの群から選択される両性イオンを０．０８Ｍから０．２Ｍの範囲の濃度で含む、ｐＨ７．３から７．８の範囲の水溶液中に、精製されたｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を回収することを特徴とする請求項１から６のいずれかに記載の方法。
【請求項８】
精製されたｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体をさらなるクロマトグラフィー工程、好ましくはヘパリンアフィニティークロマトグラフィーに付することを特徴とする請求項１から７のいずれかに記載の方法。
【請求項９】
精製されたｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を高分子安定化剤を加えることなしに凍結乾燥することを特徴とする請求項７または８のいずれかに記載の方法。
【請求項１０】
精製されたｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体をウイルスの不活化および／またはウイルスの涸渇工程に付することを特徴とする請求項１から８のいずれかに記載の方法。
【発明の詳細な説明】
本発明は、免疫アフィニティークロマトグラフィーによる生物学的な出発物質からの高度に精製されたｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の回収方法および高度に精製されたｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を含む安定な調製物に関する。
血液凝固は、一連の成分、特にフィブリノーゲン、因子ＩＩ、因子Ｖ、因子ＶＩＩ、因子ＶＩＩＩ、因子ＩＸ、因子Ｘ、因子ＸＩおよび因子ＸＩＩの連続的相互作用を含む複雑な過程である。これらの成分の１つの喪失またはその機能の阻害は血液凝固傾向の増加を引き起こし、これは患者の生命を脅かし得る。
フォンビルブラント因子（ｖＷＦ）は、血液凝固を助ける因子ＶＩＩＩと複合体形成して、血漿を循環し、この因子ＶＩＩＩとの複合体中のｖＷＦは因子ＶＩＩＩを安定化し、これをタンパク質分解から保護する。また血小板凝固におけるその機能のため、ｖＷＦは血液凝固に直接干渉する。ｖＷＦは分子量１×１０^{6}から２０×１０^{6}ダルトンの一連の多量体形態で血漿中に存在する。ｖＷＦは本来、哺乳類の内皮細胞で形成され、次いで循環中へ放出される糖タンパク質である。この関係では、分子量約２２０ｋＤのポリペプチド鎖から出発し、いくつかの硫黄結合の形成によって分子量５５０ｋＤのｖＷＦ二量体が細胞内で形成される。そのうえ、さらにｖＷＦ二量体が結合することにより２０００万ダルトンまでの大きな分子量のｖＷＦのポリマーが形成される。特に高分子ｖＷＦ多量体は血液凝固に本質的に重要であることが仮定されている。
血友病では、ある血漿の血液凝固因子の欠如により血液凝固が乱される。血友病Ａでは、それぞれ因子ＶＩＩＩの本質的成分を構成する因子ＶＩＩＩの欠如またはｖＷＦの欠如によって出血性質が引き起こされる。主に、欠乏している凝固因子を因子濃縮液で置換すること、例えば因子ＶＩＩＩ、因子ＶＩＩＩ複合体またはｖＷＦの注入によって血友病Ａの処置を行う。
ｖＷＦ症候群は、ｖＷＦの生産不足または過剰生産によって生じるいくつかの臨床像を有する。したがって、ｖＷＦの過剰生産は血栓症傾向の増加を引き起こす。高分子形態のｖＷＦの不存在または減少によって生じる供給不足は、血小板凝集および傷口閉塞を阻害するため、出血傾向の増加および出血時間の増加に現れる。
また、ｖＷＦは機能的な因子ＶＩＩＩの必須の成分であるため、ｖＷＦの欠如は表現型（遺伝子発現型）血友病Ａを引き起こすこともある。これらの例では、血液凝固カスケード

におけるその機能が損なわれる程度まで因子ＶＩＩＩの半減期が減少する。これゆえフォンビルブラント症候群（ｖＷＤ）の患者は頻繁に因子ＶＩＩＩの欠如を示す。これらの患者では、減少した因子ＶＩＩＩ活性はＸ染色体遺伝子欠損の結果ではなく、血漿におけるｖＷＦの定量的および定性的変化の間接的結果である。通常、ｖＷＦ抗原を測定すること、あるいはリストセチン補因子活性を測定することによって血友病ＡおよびｖＷＤを区別することができる。ほとんどのｖＷＤ患者ではｖＷＦ抗原含量およびリストセチン補因子活性が低下しているが、血友病Ａの患者ではこれらは正常である。

フォンビルブラント症候群を治療するための常法では、血漿から回収したｖＷＦを用い、精製されたｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体でｖＷＤ患者を処置することが何度も試みられている。血液因子、特にｖＷＦに対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体の開発により、ｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の血漿または他の生物学的ソースからの単離および精製の改良が可能になってきた。

因子ＶＩＩＩが血漿中で非常に少量のみ生じ、極端に不安定であること、および因子ＶＩＩＩとｖＷＦの結合が特定条件下で可逆的であることは、血漿からの因子ＶＩＩＩおよび因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の精製を特に困難にする。

組換え細胞で因子ＶＩＩＩを発現すること（Wood et al.,Nature 312:330-337,1984）によって、遺伝子工学による因子ＶＩＩＩの製造が可能であるが、組換え因子ＶＩＩＩの商業的に利用可能な収量を達成することができるのは、ｖＷＦの添加あるいは同時発現によってのみであった。同様にｖＷＦは遺伝子工学法によって製造され、組換え細胞中で発現されていた（Fischer et al.,1994,FEBS Letters 351:345-348）。

また、種々の精製法による血漿からの精製された因子ＶＩＩＩ、ｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の回収または組換え細胞からの因子ＶＩＩＩまたはｖＷＦそれぞれの回収が記載されている。

Zimmerman et al.（US 4,361,509）は、因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体をモノクローナル抗ｖＷＦ抗体に結合させ、$CaCl_2$イオンによって因子ＶＩＩＩを複合体から解離させる因子ＶＩＩＩの精製法を記載している。このようにして得られた因子ＶＩＩＩを次いでさらなるクロマトグラフィー工程によって純粋な状態で回収する。ｖＷＦが依然吸着している免疫アフィニティー担体をカオトロピック物質、特にＮａＳＣＮによって再生させる。ｖＷＦ／ＮａＳＣＮ溶液が副産物として生じ、これを廃棄する。

米国５，００６，６４２は、適当な緩衝液に対する透析またはさらなるクロマトグラフィー工程における溶液の脱塩によって、米国４，３６１，５０９に記載の、ｖＷＦおよびカオトロピック物質を含む、副産物として生じた溶液からのｖＷＦの回収を記載する。

ＥＰ　０　３８３　２３４は、カルシウムおよびアミノ酸含有緩衝液の添加によって溶液中に含まれる因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を解離させ、ｖＷＦ濃縮液を回収する、アニオン交換クロマトグラフィーによるｖＷＦ濃縮液の調製を記載する。

ＥＰ　０　４６９　９８５は、ほとんど因子ＶＩＩＩを含まない血漿クリオ沈降物からのｖＷＦの調製法であって、因子ＶＩＩＩはアニオン交換体に結合するが、ｖＷＦは結合しない第一精製工程において、ｖＷＦを因子ＶＩＩＩから分離する方法を記載する。第二工程では、ｖＷＦ含有溶出液の塩濃度を減少させ、それによりｖＷＦは第二アニオン交換体に結合可能となる。その後、イオン強度を増加させてｖＷＦを溶出させる。

因子ＶＩＩＩと複合体形成していることもある精製されたｖＷＦは、フォンビルブラント症候群に悩まされている患者だけでなく、表現型血友病Ａの患者の治療に用いるのに望ましい。さらに、ｖＷＦの安定化作用のために、因子ＶＩＩＩ調製物のより良い保存安定性が得られる。

因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を精製するため、例えばフィブリノーゲンのような混入タンパク質を高濃度のアミノ酸、特にグリシンによって沈降させることが示されている（ＷＯ　８２／０４３９５、ＥＰ　０　３８３　２３４）。

ＥＰ　０　６００　４８０は、アニオン／カチオン交換クロマトグラフィーの組み合わせによる血漿からの因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の精製法であって、因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体をヘパリンで安定化し、所望により抗プロテアーゼとしてリシンを加える精製法を記

載する。
ＥＰ ０ ２９５ ６４５は、アフィニティーマトリックスでの因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の精製法であって、ｖＷＦに結合する特異的ペプチドをアフィニティー担体として用い、複合体をこれらのペプチドに結合させ、次いでｐＨ勾配で溶出させる精製法を記載する。
ＷＯ ９６／１０５８４は、アニオン交換／ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーの組み合わせによる高度に精製された組換えｖＷＦの回収方法を記載し、ＥＰ ０ ７０５ ８４６はｖＷＦの高分子および低分子フラクションの分離法を記載する。
Mejan et al.（1988,Thromb.Haemost.59:364-371）は、免疫アフィニティーによって血漿から因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を精製することを示した。担体にカップリングしたｖＷＦ特異的抗体を用いることによって、生理的条件下で因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を担体に結合させ、この複合体をｐＨ１０．２のアルカリ性条件下で溶出させる。アルカリ性環境を中和するため、溶出液を直ちに２Ｍ酢酸と混合し、ヒト血清アルブミンで安定化し、次いで凍結乾燥する。因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の解離および因子ＶＩＩＩの不活化を防ぐため、弱アルカリ性溶出環境が特に選択された。
しかし、この２つの成分の複合体は不安定なので、この複合体の精製において特に困難なのは、タンパク質の結合を維持することにある。これらの方法を用いて、Mejan et al.（1988,Thromb.Haemost.59:364-371）は、因子ＶＩＩＩの比活性
≧２０Ｕ／ｍｇ
およびｖＷＦの比活性
≧２０Ｕ／ｍｇ
を有する因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の５０％回収を達成した。しかし記載された溶出条件では、カラムからの抗体の部分的放出が観察され、結果として溶出液には１ｍＬ当たり約９０ｎｇのマウスＩｇＧが混入していた。これゆえ、この抗体をさらなるクロマトグラフィー工程によって除去しなければならなかった。
Hornsey et al.（1987,Thromb.Haemost.57:102-105）は、因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の免疫アフィニティー精製における種々の溶出剤の影響を試験し、ヨウ化カリウムおよびジョードサリチル酸リチウム（lithium diiodosalicylates）のようなカオトロピックイオンが溶出剤として特に有効であることを発見した。用いた溶出剤は、因子ＶＩＩＩおよびｖＷＦ活性の安定化のために、さらに塩化カルシウムイオンおよび１Ｍリシンを含んでいた。高濃度のアミノ酸はカオトロピック物質の変性作用からタンパク質を保護することが観察された。用いた溶出条件下、最終産物には、３０ｎｇ／ｍＬ（約３００ｎｇ／タンパク質ｍｇ）までの免疫吸着物質、ここではマウスモノクローナルｖＷＦ抗体が混入していた。カオトロピック脱着物質はその高い毒性のため、さらなる精製工程により生成物から取り除かなければならない。免疫アフィニティークロマトグラフィーにより、Hornsey et al.（1987,Thromb.Haemost.57:102-105）は、５７％因子ＶＩＩＩ：Ｃおよび４７％ｖＷＦの収率を得、タンパク質１ｍｇ当たり因子ＶＩＩＩの比活性４５Ｕおよびリストセチン活性６０Ｕを得た。
免疫アフィニティーはｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を精製する好ましい方法の１つであるが、免疫アフィニティークロマトグラフィーの使用における最大の不利益は、最終産物に免疫吸着物質が混入しているかもしれないことおよび用いたアフィニティーマトリックスの再生が必要であることである。抗体およびｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体間の強い結合は、例えばカオトロピック物質のよう強い脱着物質を用いることを必要とすることが多い。これにより、ｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の活性および分子構造を損なうばかりでなく、担体からの抗体の継続的な遊離のせいで、免疫担体の漏出を生じる。アフィニティー担体の半減期は激しく減少し、その複数の利用可能性は損なわれる。特にｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の商業的製造のために免疫アフィニティーカラムを用いるのは非常に高価であるため、これらの不利益を有さない方法を提供することが望ましいであろう。
したがって、免疫アフィニティークロマトグラフィーによってｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ

／ｖＷＦ複合体を回収する改良された方法であって、上記不利益を有さない方法を提供することが本発明の目的である。

本発明では、免疫アフィニティークロマトグラフィーによってｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を精製する方法であって、実質的な活性成分として両性イオンを有する溶出剤によって免疫吸着物質に結合しているｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を溶出させる方法を提供することでこの目的を達成する。

本発明では、溶出剤中の両性イオンとして、等電領域が３．２から９．６の間にあり、中性ｐＨ領域では両性イオンとして存在する例えばアミノ酸またはアミノ酸類似体を用いることができる。その点で、中性アミノ酸またはアミノ酸類似体、好ましくはアラニン、β－アラニン、２－アミノ－酪酸、４－アミノ－酪酸、アスパラギン、シトルリン、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、サルコシン、セリン、タウリン、スレオニン、トリプトファンおよびチロシン、またはベタインまたはその類似体、特にスルホベタインの群から好ましい両性イオンを選択する。

本方法の実施に特に好ましいのは、アミノ酸アラニン、β－アラニン、グリシン、ヒスチジン、フェニルアラニンまたはベタインである。本発明の方法では、両性イオンは水溶液中に０．０１から０．５Ｍ、好ましくは０．０８から０．２Ｍ、特に好ましくは０．１から０．１５Ｍの濃度で存在し得る。ここで、水溶液はもっぱら水からなり、さらにいかなる添加剤をも含まない溶液であり得る。

本方法では、両性イオンを含む溶出剤は生理的ｐＨ、好ましくは６．５から８．０、特に好ましくは７．０から７．８、さらに特に好ましくは７．４のｐＨを有し得る。このｐＨ領域では、すべての上記アミノ酸またはその類似体は電気的に中性であり、両性イオンとして存在する。

単にアミノ酸またはアミノ酸類似体を所望のモル濃度で水に溶解することによって溶出剤を調製することができる。ｐＨおよびイオン強度は変化しないか、あるいは中性電荷の両性イオンによる実質的でない変化しかしないので、ｐＨまたはイオン強度の調節は必ずしも必要ではない。いくつかの例では、ｖＷＦまたはｖＷＦ複合体を含む溶出液をさらに安定化するのが望ましく、例えば１つまたはいくつかのウイルス不活化工程を行う場合、さらなる物質として、所望により糖、例えばスクロースまたはマルトースを安定化剤として加えることができる。また、これらの糖は化学的／物理的に中性であるため、これを添加しても溶出剤のｐＨは変化しない。

アミノ酸、例えばグリシン、ヒスチジンまたはアルギニンを沈降剤、抗プロテアーゼまたは安定化剤として、あるいは因子ＶＩＩＩ溶液の再組成を改良するために用いることは、例えばＥＰ　０　３８３　２３４またはＥＰ　０　６００　４８０に記載されており、用いるアミノ酸の濃度は０．５－３Ｍであった。さらに、アミノ酸はクロマトグラフィー法における溶出剤または緩衝液の成分としても知られている。Tsang et al.（1991,J.Immunol.Methods 138:291-299）は、免疫アフィニティーマトリックスに結合した抗原の種々の解離条件を試験し、カオトロピック物質が抗原抗体結合を解離させる最も有効な解離剤であることを発見した。しかし、カオトロピック物質の変性作用のせいで、溶出したタンパク質の比活性は低かった。０．５Ｍグリシン、ｐＨ２．０を溶出剤として用いると、解離能が比較的低く、回収されたタンパク質の比活性が比較的低かった。低ｐＨの溶出剤の場合はさらに、溶出液を迅速に中和して、タンパク質の活性がさらに喪失するのを避けることを必要とする。同様に、これらの条件下では抗体が担体から解離し、溶出液中に入ることがわかった。

Tsang et al.（1991,J.Immunol.Methods 138:291-299）により観察されたことを考えると、穏やかな条件下、中性ｐＨ領域で、カオトロピック物質を用いずに、必須の活性な溶出試薬として両性イオンを含む溶出剤により抗体／抗原複合体を効率的に解離させることができることを本発明の範囲内に見出せたことはさらに驚くべきことであった。穏やかな溶出条件のため、精製形態の所望の抗原を効率良く、また抗体に対する高い特異性のために、混入成分を含まずに得るばかりでなく、担体への抗体の結合に影響せず、抗体は担体と

安定に結合したまま、抗体抗原複合体の解離が生じるので、実質的に免疫吸着物質を含まずに回収することができる。
本発明の方法を行うのに、リガンドとして、ｖＷＦに対する結合特異性を有し、固形担体にリガンドとして固定化できるいかなる免疫吸着物質をも用いることができる。
本発明の方法の一態様では、免疫吸着物質として抗ｖＷＦ抗体を用いる。用いる抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであってよい。しかし、モノクローナル抗体は特に好ましい。本発明の方法を行うのに、例えばGoodall et al.（Thromb.Haemost.54:878-891, 1985）によって記載されているようなすべての既知の抗ｖＷＦ抗体を用いることができる。好ましくは、例えばＥＰ　０　１７９　００６に記載の因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体で免疫化したマウス骨髄腫細胞Ｘ６３およびＢＡＬＢ／Ｃマウスの脾臓細胞の細胞ハイブリッド形成シリーズから選択されたハイブリドーマ由来のモノクローナルｖＷＦ抗体を用いる。
好ましい態様では、本発明の方法を行うためのリガンドとして、それぞれｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体と結合する抗ｖＷＦ抗体の断片を用いる。特に好ましいのは、ｖＷＦ抗体のＦ’ａｂ断片である。特異的抗体の断片を用いると、抗体断片をリガンドとして有するアフィニティー担体マトリックスを単純な方法で調製でき、これにより、リガンドの分子サイズが小さいおかげで、抗原の結合能および担体の結合効率を増加させることができる利点がある。また、溶出液中に入る可能性のある完全な抗体が生成物に混入する危険性を大きく減少させ、これゆえ無視できるものとする。
免疫吸着物質を担体に固定化するのが好ましいが、ここに担体として、アフィニティークロマトグラフィーに適当なすべての既知の天然または合成の不溶性ポリマーを用いることができる。
本発明の方法は、高い比活性を有するｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を、所望により前精製されていないタンパク質溶液から高収率で、単純かつ効率的に回収する方法を構成する。ｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を含む出発物質として、いずれかの生物学的溶液、例えば血漿、血漿プール、血漿フラクション、クリオ沈降物、組換えｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩを発現し、あるいは因子ＶＩＩＩおよびｖＷＦを同時発現している細胞培養上清、または前精製されたタンパク質溶液を用いることができる。しかし本発明は、前精製されていないタンパク質溶液から、例えば血漿から直接、あるいは組換え細胞培養物の上清からｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を回収するのに特に適当である。本発明では、出発物質中に含まれるｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体は、好ましくは生理的条件下で免疫吸着物質と結合する。ここで出発溶液を４℃から２０℃の温度でｐＨ６．５から７．８に調節し、免疫吸着剤と接触させ、これにより、抗体のｖＷＦに対する特異的結合能のために、ｖＷＦまたはｖＷＦと複合体形成した因子ＶＩＩＩは結合するが、溶液中に含まれる他のタンパク質は結合せず、ｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体から単純な方法で分離できる。
本発明の方法および必須溶離剤として両性イオンを含む中性ｐＨ領域の緩衝液での溶出により、免疫吸着物質からｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を特に高い効率で回収することができる。また、複合体中のｖＷＦおよび因子ＶＩＩＩの特異的相互作用のために、ｖＷＦと複合体形成した因子ＶＩＩＩは結合するが、複合体形成していないＶＩＩＩは免疫吸着物質に結合できない。したがって、本発明の方法により、純粋なｖＷＦまたはｖＷＦとのみ複合体形成した因子ＶＩＩＩを回収する。特に、出発物質中に存在するｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の約８５％を回収することができることがわかった。したがって、本発明の方法により、ｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体が純度９０％以上、好ましくは９５％以上で回収される。今までに記載されているクロマトグラフ法によっては一工程でこの高い回収率および純度を達成することはできなかった。さらに、記載されている溶出剤および穏やかな溶出条件を用いると、ｖＷＦと因子ＶＩＩＩの結合、従って複合体の生理的な分子構造を維持することができる利点がある。
さらに本発明の方法は特に、溶出前および溶出時にタンパク質を含む溶液のｐＨ変化が必要ではなく、ｐＨの変化によって精製されるタンパク質の生物学的活性が損なわれない利

点を有する。

上記溶出剤を用いて、ｖＷＦの構造完全性およびｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩの活性を損なうことなく、ｖＷＦまたはｖＷＦ複合体を免疫吸着物質から効率的に脱着させる。ｖＷＦの構造完全性の無傷さは、吸着前および免疫担体からの溶出後に、特に例えばＥＰ　０７０５　８４６に記載のｖＷＦ多量体分析によって証明された。同様に、ｖＷＦのコラーゲン結合活性および特異的血小板凝集活性は実質的に損なわれていないことが示された。

出発物質中および担体から溶出した後の因子ＶＩＩＩ：Ｃ活性に対する因子ＶＩＩＩ：Ａｇの比較では、割合が変化しないことが示された。比活性は＞８０Ｕ／ｍｇであるのが好ましい。

同様に、本発明の方法によって得られた精製度の高いｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を、先行技術によって既知のクロマトグラフ法、例えばイオン交換、アフィニティーまたはゲルろ過クロマトグラフィーによってさらに精製することができる。精製された因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を、例えばｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩのいずれかと特異的に結合するアフィニティー担体に吸着させ、複合体を解離させる緩衝液、例えば低ｐＨ、高イオン強度を有し、$CaCl_2$またはＮａＣｌを含む緩衝液によって、このタンパク質をお互いから分離し、遊離形態で回収することができる。この手法を用い、ｖＷＦと複合体形成していない遊離の因子ＶＩＩＩまたは因子ＶＩＩＩと複合体形成していないｖＷＦを選択的に回収することができる。このように単離されたタンパク質または抗原は、そのｖＷＦ結合性またはその因子ＶＩＩＩ結合性に関して損なわれないことによって特に特徴付けられる。これにより、抗原含量に関して、高いｖＷＦ結合特異性を有する高純度の因子ＶＩＩＩまたは高い因子ＶＩＩＩ結合特異性を有する高純度のｖＷＦを意図的に回収することが可能である。

したがって本発明は、９０％以上、好ましくは９５％以上の因子ＶＩＩＩ結合能を有する精製度の高いｖＷＦおよび少なくとも９０％のｖＷＦ結合アフィニティーを有する因子ＶＩＩＩをも含む。このように精製したｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を、例えばＥＰ　０　７０５　８４６に記載されているヘパリンアフィニティークロマトグラフィーによってさらに精製することができ、これにより高分子ｖＷＦ多量体を豊富にすることができる。特に高分子ｖＷＦ多量体を含むこのように得られたｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体は、少なくとも６０Ｕ／タンパク質ｍｇの高度に特異的な血小板凝集によって特徴付けられる。

本発明の方法によって、特にアミノ酸であるグリシン、アラニン、β－アラニン、フェニルアラニンおよびヒスチジンまたはベタインの群から選択される０．０８Ｍから０．２Ｍの濃度の両性イオンを含み、ｐＨ７．３から７．８の水溶液中、精製されたｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を回収する。この精製されたｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を所望により、先行技術により既知であるウイルスの涸渇および／またはウイルスの不活化工程にさらに付することができる。

精製された溶液を、例えば孔幅１００ｎＭから０．４５μｍのフィルターにより直接滅菌ろ過し、安定化剤、特に高分子安定化剤を加えることなしに凍結乾燥することができる。

本発明の方法を用いて、組換えまたは血漿ｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を精製し、回収することができる。

本発明のさらなる目的は、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって得られる精製度の高いｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を含む安定な調製物に関する。本発明では、安定な調製物は、純度少なくとも９５％および特異的抗原活性（比活性）少なくとも９５Ｕ／タンパク質ｍｇ、好ましくは１００Ｕ／タンパク質ｍｇを有するｖＷＦを含む。本発明が提供する、因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を含む安定な調製物は、純度少なくとも９５％、好ましくは９９％を有し、因子ＶＩＩＩ：Ｃの比活性が少なくとも９５Ｕ／タンパク質ｍｇであり、ｖＷＦの比活性が少なくとも９５Ｕ／タンパク質ｍｇであり、それゆえ複合体中の比活性の比が１：１であるものである。

特定の態様では、因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体は、組換え因子ＶＩＩＩおよび組換えｖＷＦからなり、因子ＶＩＩＩ：ｖＷＦの比は１：１００から１００：１の間、好ましくは１

：３０から１：７０の間、特に好ましくは約１：５０である。本発明の範囲内では、明確な濃度の抗原を有する組換えｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ発現細胞の細胞培養上清をある所望の割合で混合し、本発明の方法を行った後、組換えタンパク質からなる精製された複合体を所望の割合で再び回収することもできることがわかっている。

血漿またはクリオ沈降物から精製するときに、ｖＷＦは存在する可能性のあるプロテアーゼによって低分子ｖＷＦ断片に分解され、この断片は、付随するバンドを有する低分子フラクションとしてＳＤＳゲル上で同定されることが分かっている（Furlan et al.,1993,PNAS.90:7503-7507）。さらに、存在するプロテアーゼによって因子ＶＩＩＩが部分的に活性化され、これにより、因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の比活性が減少する。

本発明のさらなる側面では、特にｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の分子および構造完全性が実質的に維持され、いかなるｖＷＦタンパク質加水分解産物または活性化された因子ＶＩＩＩをも含まないことによって特徴付けられる精製度の高いｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を含む安定な調製物を提供する。

さらなる側面では、本発明の調製物は、免疫吸着物質によって生じる不純物を実質的に含まず、存在する可能性のある免疫吸着物質、特に抗体の量は１５ｎｇ／タンパク質ｍｇ以下、好ましくは１０ｎｇ／タンパク質ｍｇ以下、特に好ましくは７ｎｇ／タンパク質ｍｇ以下である。さらに、本発明の調製物は、３％以下好ましくは１％以下のフィブリノーゲンおよび１％以下、好ましくは０．５％以下のフィブロネクチンを含むことによって特徴付けられる。ここでは先行文献に記載されているＥＬＩＳＡによってフィブリノーゲンおよびフィブロネクチン含量を決定した。

また本発明の範囲内では、特に緩衝液中、必須の溶離剤として、これまでタンパク質溶液の安定化に用いられていたアミノ酸、例えばグリシン、ヒスチジンまたはアラニンを含む溶出剤を用いることによって、溶出したｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を全精製手順の間、安定化環境に維持することができ、これゆえ得られた調製物を特に安定にすることができることが示されている。

本発明の調製物は、溶液中では４℃で少なくとも２週間、急速冷凍物は－２０℃で少なくとも６月間、凍結乾燥物として－２０℃から４℃の温度で少なくとも１年間安定である。

溶出剤中に例えばヒスチジンが存在することによって、さらに凍結乾燥時のｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の沈降を防ぐことができる。これゆえ本発明の調製物は所望により、さらに加工処理して、さらなる添加剤なしに凍結乾燥産物とすることができる。

また凍結乾燥調製物の再組成を改良するため、例えばＷＯ　９３／２２３３６に記載されているようにアルギニンを混合することができる。安定な調製物を、それぞれの方法により安定な医薬調製物としてヒトに投与するために製剤化することができ、適当な緩衝液または生理的に許容される担体を含ませることができる。すでに上述したように、この調製物の特に良好な安定性のおかげで、所望により安定化剤の添加は省略できる。安定化剤、特にＨＳＡの添加によって、抗原調製物の比活性が減少し、これにより投与される医薬組成物は、精製後に直接回収されたタンパク質調製物より低い比活性を有することが知られている。

したがって本発明では、純度少なくとも９５％、好ましくは９９％、ｖＷＦの比活性少なくとも９５Ｕ／ｍｇおよび因子ＶＩＩＩの比活性少なくとも９５Ｕ／ｍｇを有するｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を含む医薬組成物を、実質的に高分子物質および安定化剤を含まない、特にＨＳＡを含まない状態で提供する。これにより、本発明の医薬調製物は、安定化のためにアルブミンまたはヘパリンのような物質を含む今までに既知である医薬組成物のいずれとも異なる。

アフィニティー担体から精製産物を生理的に適合可能な組成物中に回収できるので、精製された調製物をヒトへの投与用に、さらに複雑な再製剤化に付す必要は原則としてない。同様に、それは安定な、および安定化された形で溶出液中に存在している。

したがって、本発明の方法は、精製度の高いｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を穏やかに回収するため、ならびに安定な医薬調製物を簡単に生産するための単純な方法を構成し、所望により直接治療的適用のために用いることができる。

純度の高いｖＷＦまたはｖＷＦ複合体それぞれを医薬調製物に加工処理する前に、ウイルスの不活化または涸渇を行うことは有益である。これは先行技術分野に既知の化学的および／または物理的処理によって行うことができる。グリシン、アラニンまたはヒスチジンのようなアミノ酸が本発明の安定な調製物中に含まれて存在するせいで、ｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体が生理的な安定化環境に存在するため、精製された生成物は所望により、さらにいかなる安定化剤をも添加することなしに直接ウイルス不活化工程に付することができる。
血友病ＡまたはｖＷＤの処置用薬剤を生産するために本発明が提供する安定な調製物を用いることができる。
以下の実施例および図面により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの特定の態様に限定されない。
図１は因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体のゲルろ過分析を示す。
実施例１は、表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance）および種々の緩衝液による複合体からの抗原の解離による種々の抗ｖＷＦ抗体およびｖＷＦの相互作用の測定を記載し；実施例２は、種々の緩衝液条件下での抗原抗体複合体からのｖＷＦ抗原の解離性質を記載し；実施例３は、免疫アフィニティーによる細胞培養上清からの組換えｖＷＦの精製を記載し；実施例４は、血漿因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の精製を記載し；実施例５は、ｖＷＦを免疫アフィニティー精製するための抗体断片の使用を記載し；実施例６は、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーによる免疫アフィニティー精製されたｖＷＦの後の精製を記載し、実施例７は、因子ＶＩＩＩ：Ｃ活性に対する溶出剤の影響を記載し；実施例８は、組換え因子ＶＩＩＩおよび組換えｖＷＦからなる複合体の精製を記載し；実施例９は、マウスＩｇＧおよびＦ’ａｂ断片に関する溶出液のアッセイを記載し；ならびに実施例１０は、本発明の溶出環境における因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の完全性を示す。
実施例
高分子の相互作用を決定するための試験系に関する方法の全体的説明
最近、新しい技術である表面プラズモン共鳴により、タンパク質の特異的抗体との反応をも含む高分子の相互作用を直接追跡することが可能となった（Karlsson,1994,Analyt.Biochem.221:142-151;Malmqvist,1993,Nature 361;186-187）。
試験サンプルと直接接触させる光系では、分子濃度に依存するパラメーターを測定し、いわゆる反応単位（レスポンスユニット、ＲＵ）で表す。高いＲＵ値は、測定表面上（センサーチップ）の高濃度の吸着高分子に相当する。
この方法の利点は、物質をほとんど消費しないこと、迅速に行うことができること、ならびにデータを動力学的に評価できることである。この測定系により、ｖＷＦ特異的抗体の基本的結合性質を試験した。
実施例１：
表面プラズモン共鳴および種々の緩衝液での複合体からの抗原の脱着による種々の抗ｖＷＦ抗体およびｖＷＦの相互作用の測定
モノクローナル抗ｖＷＦ抗体（Immunotech,Marseille）を、Pharmaciaが記載する標準方法によってＣＭセンサーチップの活性層（active layer）に結合させた。ネガティブ対照として、センサーチップのレーンをシュードモナスフラジェリンに対するモノクローナル抗体（ＰＡＭ ２４）でコーティングした。シグナルの増加からカップリング効率を認識した。カップリング後、センサーチップのレーンを３Ｍ ＮａＳＣＮで洗浄し、非特異的に吸着した抗体をチップ表面から除去した。次いで（アニオン交換クロマトグラフィーによって前精製した）ｖＷＦをチップ表面に置いた（吸着期）。トリス緩衝液、ｐＨ７．４で洗浄した後、１００ｍＭグリシンを含み、ｐＨ６．０からｐＨ９．０まで増加するｐＨ値を有する種々の緩衝液をチップ上に流した（溶出期）。表１は、表面プラズモン共鳴および種々のｐＨ値を有するグリシン緩衝液での複合体からの抗原の脱着によって種々の抗ｖＷＦ構抗体およびｖＷＦの相互作用を測定した結果を示す。

表１

レーン	rWfローディング (RU)		グリシン溶出 pH6		pH7		pH8		pH9	
	r-vWF	pdvWF	r-vWF	pdvWF	r-vWF	pdvWF	r-vWF	pdvWF	r-vWF	pdvWF
AvW8-1	650	490	145	220	40	65	15	20	10	20
AvW8-2	870	760	75	125	25	50	10	15	15	12
PAM24	12	25	10	15	10	15	10	15	10	15
ブランクレーン	14	35	-5	5	-20	5	-20	5	-20	5

Mejan et al.（1988,Thromb.Haemost.59:364-371）の開示内容では、抗体および抗原間の最大アフィニティーはｐＨ５からｐＨ７であった。したがって、吸着したｒｖＷＦがｐＨ６．０から著しく解離することは予測できないことであった。抗原抗体複合体の脱着性質の変化は、緩衝液中のグリシンの存在に帰するものである。さらに、２つの異なる抗ｖＷＦ抗体、ＡｖＷ８－１およびＡｖＷ８－２はグリシンに関して同じ性質を有することが示されている。

観察された作用が組換えｖＷＦに特定の性質であることを排除するために、血漿ｖＷＦ（ｐｄｖＷＦ）を用いて実験を繰り返し、同じ結果を得た。

実施例２：

種々の緩衝液条件下での抗原抗体複合体からのｖＷＦ抗原の解離性質

ｖＷＦ抗原／抗ｖＷＦ抗体の相互作用の性質をより綿密に調べるため、種々の緩衝液／溶出剤を用いてさらに溶出試験を行った。特に、種々のアミノ酸またはその誘導体を含むｐＨ７．４の緩衝液の効果を試験した。

試験した物質には、アラニン、β－アラニン、フェニルアラニン、ヒスチジン、アルギニン、リシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ベタインおよびアセテートがあった。

表２は、表面プラズモン共鳴および溶出剤として種々のアミノ酸を含む緩衝液によって複合体から抗原を脱着させることによって、抗ｖＷＦ抗体およびｖＷＦ抗原の相互作用を測定した結果を示す。

表２

アミノ酸	RU 溶出前	RU 溶出後	溶出%
アラニン	８５０	２５	９７
β－アラニン	８３０	３０	９７
フェニルアラニン	５２０	２５	９５
ヒスチジン	５５０	１５	９７
アルギニン	９７０	７８０	２０
リシン	８４０	７３０	１３
グルタミン酸	７６０	７２０	５
アスパラギン酸	６７０	５９０	１２
ベタイン	６８０	－１０	１００
アセテート	５７０	５５０	３

特に非極性基を有するアミノ酸、例えばグリシン、アラニン、β－アラニンまたはフェニルアラニン、またはその誘導体、または中性領域で両性イオンとして存在するアミノ酸、例えばヒスチジンが抗体に結合したｖＷＦを効果的に溶出させることができることがわかった（表２）。

ｖＷＦまたはｖＷＦ／因子ＶＩＩＩ複合体を精製するためのこれらのアミノ酸またはその

誘導体を含む各緩衝液を免疫アフィニティークロマトグラフィーによって試験した。

実施例３

免疫アフィニティーによる細胞培養上清からの組換えｖＷＦの精製（現時点で発明者らが本発明の実施に最適な方法であると考えているもの）

製造元の指示にしたがい、モノクローナル抗ｖＷＦ抗体ＡｖＷ８－２をＣＮＢｒ活性化セファロース（Pharmacia）に共有結合でカップリングさせた。ここでは、パッケージゲル１ｍＬ当たり１ｍｇ量の抗体を結合した樹脂を載せた。

アフィニティー樹脂５０ｍＬを充填したカラムに、組換えｖＷＦ（ｒｖＷＦ）を含む濃縮された発酵上清５００ｍＬを直線状流速（linear flow rate）２０ｃｍ／時でアプライした。サンプルをアプライした後、カラム流出液のＵＶ吸収がベースラインの値に達するまで、このカラムをリン酸緩衝液、ｐＨ７．４ですすいだ。１００mMグリシン、ｐＨ７．４で結合したｒｖＷＦをゆっくり（５ｃｍ／時）カラムから溶出させた。

表３に、対応するフラクションの分析データを示す。

表３

ｻﾝﾌﾟﾙ	vWF Ag (ELISA)		ﾘｽﾄｾﾁﾝ活性		タンパク質		比活性	
	μg/mL	%	U/mL	%	μg/mL	%	Ag mg / Prot mg	RCoA U / Prot mg
出発物質	120	100	1.5	100	1400	100	0.08	1.07
吸着物質	10	9	<0.02	<7	1220	96	0.008	<0.02
溶出液	370	74	5.0	80	350	6	1.06	14.2

これらの結果から、記載した条件下では、発酵上清から、良好な収率、高純度で、比活性少なくとも１００Ｕ／タンパク質ｍｇを有し、回収率少なくとも７４％の組換えｖＷＦを得ることができることがわかる。

実施例４：

血漿ＦＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の精製

クリオ沈降物５０ｇをヘパリン緩衝液４５０ｍＬに溶解した。０．１％アルヒドロゲル（alhydrogel）を加えてプロトロンビン複合体の因子を除去した。不純物を除去したタンパク質溶液を実施例３に記載のように免疫アフィニティーによって精製する。表４に、精製前および後の分析データをまとめる。

表４

ｻﾝﾌﾟﾙ	vWF Ag (ELISA)		FVIII活性		タンパク質		比活性	
	μg/mL	%	U/mL	%	mg/mL	%	vWF mg / Prot mg	FVIII:C / Prot mg
出発物質	230	100	16	100	21	100	0.01	0.76
吸着物質	10.3	6	1.1	9	15.2	98	0.00	0.07
溶出液	320	68	25.5	78	0.27	0.9	1.18	94

表４から、クリオ沈降物を出発物質として用いた場合、高純度、ｖＷＦの比活性少なくとも１１８抗原Ｕ／タンパク質ｍｇおよび因子ＶＩＩＩの比活性少なくとも９４Ｕ／ｍｇを有するＦＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を回収することができることが明らかである。本発明の方法により、遊離の因子ＶＩＩＩを取り除き、実質的に純粋な因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を約１：１の比で回収する。純粋な因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の収率は約７０％から８０％であり、これゆえ免疫アフィニティークロマトグラフィーによるタンパク質の回収について記載されている今までの値を上回っている。

実施例５：

ｖＷＦを免疫アフィニティー精製するための抗体断片の使用

また、無傷のモノクローナル抗体と同様に、モノクローナル抗体のＦ’ａｂ断片またはＦ’ａｂ２断片を用いることができる。この様式の手法では、最終産物中に存在する可能性がある微量の抗体がもはや免疫学的に活性なタンパク質部分（Ｆｃ部分）を含まないので好都合である。
選択的プロテアーゼ、例えば（遊離形態または不溶性担体物質に結合している）パパインまたはペプシンによって抗体の断片化を行うことができる。以下、モノクローナル抗体ＡｖＷ８－２由来のＦ’ａｂ断片の調製、精製および使用を記載する。
モノクローナル抗体ＡｖＷ８－２　１００ｍｇを１ｍＭシステインと混合する。この溶液に固定化パパイン（Pierce）０．５ｍｇを加え、この懸濁液を３７℃で５時間インキュベートした。固定化パパインをろ過して除き、プロテアーゼ消化を停止させ、１０ｍＭヨードアセテートを加えて、残留し得る活性を阻害した。PorosＱでのアニオン交換クロマトグラフィーによってＦｃ断片、より小さい断片および無傷の抗体からＦ’ａｂ断片を分離した。精製したＦ’ａｂ断片をＣＮＢｒ活性化セファロースに１ｍｇ／ゲルｍＬの密度で載せ、カップリングさせた。このように調製したアフィニティー樹脂５０ｍＬによって実施例３に記載のようにｒｖＷＦを含む濃縮した発酵上清５００ｍＬを精製した。
表５は１００ｍＭグリシンを含むｐＨ７．４の緩衝液で溶出を行う免疫アフィニティークロマトグラフィーの結果を示す。

表５

ｻﾝﾌﾟﾙ	vWF Ag (ELISA)		ﾘｽﾄｾﾁﾝ活性		タンパク質		比活性	
	μg/mL	%	U/mL	%	μg/mL	%	Ag mg / Prot mg	RCoA U / Prot mg
出発物質	105	100	1.8	100	1250	100	0.08	1.44
吸着物質	9	9	<0.02	<8	1200	105	0.00	<0.02
溶出液	248	85	3.8	76	265	4	0.93	14.3

表５に示した結果から、ｖＷＦを免疫アフィニティークロマトグラフ精製するために、無傷の抗体と同じ効力を有するモノクローナル抗体のＦ’ａｂ断片を用いることができることが明らかである。しかし、出発物質の８５％の改良された収率および比活性少なくとも９３抗原Ｕ／タンパク質ｍｇでｖＷＦを回収することができた。
実施例６：
ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーによる後の精製
さらなる精製工程において、高分子ｖＷＦ多量体からなるｖＷＦ多量体を豊富にすることによって、あるいは残留する混入物を除去することによって、上記精製されたｖＷＦの質をさらに改良することが可能である。このための方法として、既知の方法、例えばイオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーまたはゲルろ過を用いることができる。
以下、免疫アフィニティークロマトグラフィー、それに続くヘパリンクロマトグラフィーの組み合わせを記載する。
免疫アフィニティークロマトグラフィーの溶出液（実施例５）を、さらにいかなる処理をもすることなしに、フラクトゲル^{R}－ヘパリンを充填した５０ｍＬカラムに載せる。段階様（step-like）の塩濃度勾配を適用して結合したｒｖＷＦを溶出させる。ｒｖＷＦは主に０．２５Ｍから０．３Ｍ ＮａＣｌの範囲で溶出する。
ヘパリンクロマトグラフィー時に漏出し得るｖＷＦのＦ’ａｂ断片の解離を確実にするため、すべてのクロマトグラフィー緩衝液は１００ｍＭグリシンを含む。ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーの結果を表６にまとめる。

表６

サンプル	vWF Ag (ELISA)		リストセチン活性		タンパク質		比活性	
	μg/mL	%	U/mL	%	μg/mL	%	Ag mg / Prot mg	RCoA U / Prot mg
出発物質	250	100	3.8	100	265	100	0.94	14.3
吸着物質	95	46	<0.02	<4	105	48	0.9	<0.19
工程１	85	15	0.8	9	89	14	0.96	9.0
工程２	115	19	7.8	85	125	20	0.92	62.4

表６から見て取れるように、次なる精製工程によりｖＷＦのリストセチン活性をさらに改良することができる。特に、６０Ｕ／タンパク質ｍｇ以上の特異的な血小板凝集活性が得られることがわかった。さらに、用いる物質の８５％以上を高い比活性を有する精製タンパク質として回収することができる。

滅菌ろ過および医薬製剤化後、精製の最終産物をそれぞれの最終容器に充填し、凍結乾燥することができる。この例では、緩衝液中に含まれるグリシンは凍結乾燥および溶解手順時の安定化剤として働く。

実施例７：

溶出剤のＦＶＩＩＩ：Ｃ活性に対する影響

実施例４に記載のように、ＡｖＷ８－２を載せたカラムに、溶解させたクリオブリン（cryobulin）を吸着させた。この例では、ベンゾキノンを介して抗体をカップリングさせ、ｐＨ安定性を改良した。一方では、Mejan et al. （1988,Thromb.Haemost.59:364-371）に記載のようにｐＨを上げることによって、他方では本発明の方法に記載のグリシン溶出によって、結合したＦＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の溶出を行った。

表７に、異なる溶出方法を用いた免疫アフィニティークロマトグラフィーによって、収率および因子ＶＩＩＩの比活性を測定した結果をまとめる。

表７

溶出方法	比活性 FVIII:C U / タンパク質 mg	収率 FVIII:C%
ｐＨシフト	３７	２１
グリシン	６７	８２

表７から、溶出剤としてグリシン緩衝液を用いると、ｐＨシフトと比べて、収率が４倍まで増加し、回収された因子ＶＩＩＩの比活性が２倍になり得る。この理由は、ｐＨシフトにおいてはＦＶＩＩＩが暴露または活性化されることにあるあるらしく、アミノ酸または両性イオンが存在する穏やかな溶出条件下、中性ｐＨでは、因子ＶＩＩＩの活性損傷程度はより少ない。

実施例８：

組換えＦＶＩＩＩおよび組換えｖＷＦからなる複合体の精製

それぞれ因子ＶＩＩＩまたはｖＷＦをコードするｃＤＮＡを含むベクターでトランスフェクションした組換え細胞からの細胞培養上清を、因子ＶＩＩＩ：ｖＷＦ＝３：１の比で混合した。ｒＦＶＩＩＩ／ｒｖＷＦ複合体を含む混合物を実施例３に記載の条件下で精製した。

表８には、このｒ因子ＶＩＩＩ／ｒｖＷＦの精製結果を示す。

表８

ｻﾝﾌﾟﾙ	FVIII:C U/mL	収率 FVIII:C	vWF μg/mL	収率 vWF	FVIII:C U / vWF U
ｱﾌﾟﾗｲ物質	２．１	１００	６．１	１００	３．４
流出液	０．４	１９	neg.	０	n.d.*
グリシン溶出液	８．３	７３	２５．７	６７	３．２

＊ n.d. ＝ 検出できず

表８は、記載した条件下、ｒＦＶＩＩＩおよびｒｖＷＦからなる複合体は、ちょうど血漿複合体のようにふるまうことを示す。同様に、出発物質の混合比に依存して相互に一定比率のｒＦＶＩＩＩ／ｒｖＷＦ複合体を回収した。出発物質のＦＶＩＩＩ／ｖＷＦ比を変えることによって、あるいはさらなるクロマトグラフィー工程を続けることによって、ＦＶＩＩＩの相対含量に有利なように、ｖＷＦに対するＦＶＩＩＩ：Ｃの割合をさらに変化させることができる。これにより、所望の比の因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を意図的に得ることができる。

実施例９：

マウスＩｇＧ（Ｆ’ａｂ断片）に関するアッセイ

免疫学的方法（免疫リガンドアッセイ、Molecular Devices）によって免疫アフィニティーカラムの溶出液中の混入Ｆ’ａｂ断片を検出した。

ウサギー抗ーマウスーＩｇＧ（Ｆ’ａｂー特異的）をビオチンまたはフルオレセインでラベルする。カラム溶出液１００μＬをビオチンおよびフルオレセインでラベルした抗体各２μｇと混合し、インキュベートした。さらにストレプトアビジンおよびウレアーゼラベル化抗フルオレセイン抗体２μｇとインキュベートした後、この混合物をビオチニル化膜を通してろ過した。この膜を洗浄した後、高感度（約１００ｐｇ／ｍＬ）で結合したＦ’ａｂ断片を検出することができる。

表９には、種々のクロマトグラフィーを実行した結果をまとめる。

表９

ｻﾝﾌﾟﾙ	溶出方法	vWF-抗原 μg/mL	ﾏｳｽ IgG ng/mL	ﾏｳｽ IgG ng / vWF 抗原 mg
ｸﾘｵ沈降物	ｐＨシフト*	２８０	３４．５	１２３．２
組換えvWF	ｐＨシフト*	１９０	２８．６	１５０．５
ｸﾘｵ沈降物	グリシン	３２０	４．２	１３．１
組換えvWF	グリシン	２４８	１．９	７．６

＊ この例では、より良好なｐＨ安定性を達成するため、ベンゾキノンを介して抗体をカップリングさせた。

表９から、本発明の方法を用い、ｖＷＦまたは因子ＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体を非常に少量のマウスＩｇＧ（Ｆ’ａｂ断片）しか混入させずに回収することができることがわかる。さらなるクロマトグラフィー工程（ヘパリンクロマトグラフィーまたはイオン交換クロマトグラフィー）を追加することによって、残留する混入物を検出下限以下に減らすことができる。

実施例１０：

精製されたＦＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体の完全性

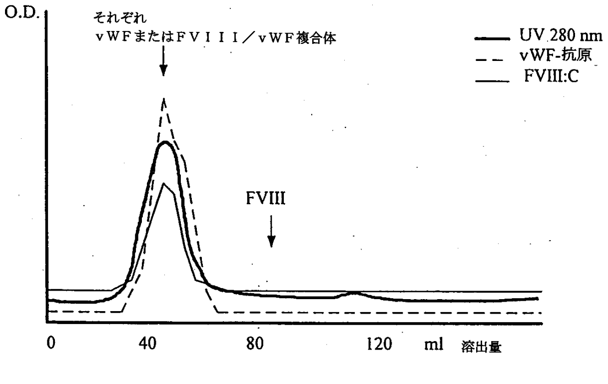
ＦＶＩＩＩおよびｖＷＦからなる精製された複合体の完全性を示すために、実施例４にしたがって得られた免疫アフィニティーカラムの溶出液５ｍＬを、セファロースＣＬ６Ｂ１２０ｍＬを充填したゲルろ過カラムにアプライした。ランニング溶媒としてグリシン緩衝液を用いて溶出させると、クロマトグラフィー実行時に分子サイズにしたがって分離される。

２種の異なる分子種（ＦＶＩＩＩおよびｖＷＦ）が存在する場合、カラム物質の分離性質に基づいて、両タンパク質が分離される。図１では、このクロマトグラフィーを実行した結果が示されている。
実施例４にしたがって得られたＦＶＩＩＩおよびｖＷＦの複合体はピーク
(━━━)
に現れていることが明らかに認められる。２種のタンパク質が結合していない場合、相互にはっきりと分離して溶出する（ラベル化参照）。
これゆえ、本発明の方法にしたがって精製されたＦＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体はｖＷＦがＦＶＩＩＩを安定化する働きを有するタンパク質複合体として存在する。

【図１】

FIG. 1

ＦＶＩＩＩ／ｖＷＦ複合体のゲル濾過分析



フロントページの続き

(72)発明者 フィードラー，クリスティアン
オーストリア、アー－１２２０ヴィーン、ハフナーガッセ７８／６／３番
(72)発明者 フィッシャー，ベルンハルト
オーストリア、アー－１１６０ヴィーン、ヴィルヘルミネンシュトラーセ９５／ツェー／１７番
(72)発明者 ドルナー，フリードリッヒ
オーストリア、アー－１２３０ヴィーン、ペーターリニガッセ１７番
(72)発明者 アイブル，ヨハン
オーストリア、アー－１１８０ヴィーン、グスタフーチェルマークガッセ２番

審査官 石丸 聡

(56)参考文献 特表昭６２－５００５２０（ＪＰ，Ａ）
特表２０００－５０６８６９（ＪＰ，Ａ）
特表２０００－５０８６４４（ＪＰ，Ａ）
Thromb. Res., vol. 74, pp. 347-354 (1994)
Ann. Clin. Lab. Sci., vol. 19, pp. 84-91 (1989)
Thromb. Haemost., vol. 57, pp. 102-105 (1987)
Thromb Res., vol. 12, pp. 667-675 (1978)

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C07K 14/755
C07K 1/22
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)