

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-161547

(P2009-161547A)

(43) 公開日 平成21年7月23日(2009.7.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/755 (2006.01)</b>	C07K 14/755	4C084
<b>A61K 38/43 (2006.01)</b>	A61K 37/465	4H045
<b>A61K 38/36 (2006.01)</b>	A61K 37/46	
<b>A61P 7/04 (2006.01)</b>	A61P 7/04	

審査請求 有 請求項の数 9 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2009-48163 (P2009-48163)	(71) 出願人	591154762
(22) 出願日	平成21年3月2日 (2009.3.2)		バクスター・イノベーションズ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング
(62) 分割の表示	特願平9-536579の分割		Baxter Innovations GmbH
原出願日	平成9年4月9日 (1997.4.9)		オーストリア、アー-1221ヴィーン、インダストリーシュトラッセ67番
(31) 優先権主張番号	A 667/96	(74) 代理人	100068526
(32) 優先日	平成8年4月12日 (1996.4.12)		弁理士 田村 恭生
(33) 優先権主張国	オーストリア (AT)	(74) 代理人	100100158
			弁理士 鮫島 睦
		(74) 代理人	100138900
			弁理士 新田 昌宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高度に精製された第VIII因子コンプレックス

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】成分第VIII因子（第VIII因子：CまたはFVIII）およびフォンウィルブラントファクターからなる高度に精製された（高度精製）コンプレックス、該高度精製コンプレックスを含む安定な医薬調製物、および高度精製第VIII因子：C/vWF-コンプレックスの製造方法を提供する。

【解決手段】vWFに対する抗体であるイムノアフィニティークロマトグラフィー物質と接触させ、第VIII因子/vWFコンプレックスを溶出用緩衝液で溶出することにより高度精製第VIII因子/vWFコンプレックスを得、該コンプレックスを含む安定な医薬調製物を製造する。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

イムノアフィニティークロマトグラフィーによる第 V I I I 因子：C およびフォンウィルブランドファクター（v W F）を含む出発物質の精製方法であって、

出発物質を v W F に対する抗体であるイムノアフィニティークロマトグラフィー物質と接触させ、

第 V I I I 因子 / v W F コンプレックスを溶出用緩衝液で溶出することにより高度精製第 V I I I 因子 / v W F コンプレックスを得、

さらに、それぞれ非コンプレックス化第 V I I I 因子：C および v W F を、先の溶出用緩衝液に比べてそれぞれ濃度と伝導度が増加したさらなる溶出用緩衝液を用いて溶出する（ここで、溶出される該 v W F は高度精製 v W F として得られる）ことを特徴とする方法であって、該 v W F に対する抗体が 1 M チオシアネートを含む媒質中でも v W F と結合することができる v W F と高い親和性を有する抗体である方法。

10

**【請求項 2】**

該抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

請求項 1 または 2 に記載の方法により得られる少なくとも 70 U 第 V I I I 因子：C / m g の比活性を有する、第 V I I I 因子（第 V I I I 因子：C）、および v W F 抗原に基づいて 0.2 ~ 0.6（血漿単位 / 血漿単位）の範囲のコラーゲン結合活性を有する、フォンウィルブランドファクター（v W F）を成分に含む高度精製コンプレックスを含む、それぞれ非コンプレックス化 v W F および第 V I I I 因子：C を実質的に含まないことを特徴とする調製物。

20

**【請求項 4】**

第 V I I I 因子（第 V I I I 因子：C）および v W F 抗原を成分に含む該高度精製コンプレックスが 100 ~ 300 U 第 V I I I 因子：C / m g の範囲の比活性を有する請求項 3 に記載の調製物。

**【請求項 5】**

該コンプレックスが血漿より少なくとも 5000 倍の濃度で存在することを特徴とする請求項 3 または 4 に記載の調製物。

**【請求項 6】**

該コンプレックスが血漿より 7100 倍 ~ 21400 倍の濃度で存在することを特徴とする請求項 5 に記載の調製物。

30

**【請求項 7】**

医薬調製物として製剤化されることを特徴とする請求項 3 ~ 6 のいずれかに記載の調製物。

**【請求項 8】**

請求項 1 または 2 に記載の方法により得られる高度精製 v W F を含む調製物。

**【請求項 9】**

v W F が v W F 抗原につき少なくとも 0.7 のコラーゲン結合活性（血漿単位 / 血漿単位）を有することを特徴とする請求項 8 に記載の調製物。

40

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、成分第 VIII 因子（第 VIII 因子：C または FVIII）およびフォンウィルブランドファクター（von Willbrand factor）（v W F）からなる高度に精製された（高度精製）コンプレックス、該高度精製コンプレックスを含む安定な医薬調製物、および高度精製第 VIII 因子：C / v W F - コンプレックスの製造方法に関する。

**【背景技術】****【0002】**

フォンウィルブランドファクターは第 12 染色体上の遺伝子によってコードされる、遊

50

離で、そして第10染色体上の遺伝子によりコードされ、血友病Aでそれぞれ欠陥があるかまたは欠損している第VIII凝固因子との非共有結合コンプレックスとして、濃度5~10 $\mu$ g/mLで血漿中を循環している多重結合糖タンパク質である。

【0003】

ヘモスタシス (haemostasis) におけるvWFの最も重要な2つの機能として、

1) 受傷した内皮への血小板の付着、およびvWFが受傷した内皮下 (sub-endothelium) に結合し、この表面と血小板間の架橋ならびに血小板相互の凝集を可能にすることがある。血小板と内皮下間の最初の相互作用は血小板膜の糖タンパク質Ibおよび受傷した内皮のコラーゲン繊維により生じる。vWFはこれら2つのタンパク質と結合することにより、血小板の第一層の形成に参与する。さらに、血小板相互の架橋には、vWFと糖タンパク質コンプレックスIIb/IIIaとの結合が参与する。初期ヘモスタシスのこれら役割は主に大重合体が担っている (Eller, Lab. Med. (1994); 18: 168-176)。

10

【0004】

2) FVIIIに対する結合部位により、vWFは血漿凝固にも影響する。FVIIIは血漿中にほとんどvWFとの非共有結合コンプレックスとして存在し、ほぼvWF 10分子につきFVIII分子を保持している。主としてダイマーおよび小重合体が担体として用いられる。このvWFとの結合により、FVIIIはタンパク質分解性の不活化の増大に対して保護される (例えば、活性化プロテインCにより)。

【0005】

さらに、FVIIIは固有の凝固においてその補助因子活性がコンプレックス形成により強化される (Eller, Lab. Med. (1994), 18: 168-176)。

20

【0006】

vWFは、本質的または刺激された遊離によりこの血漿タンパク質の主な供給源である血管内皮細胞中で形成されるが、巨核球もそれより少ないが合成する (PNAS 92(1995), 2428-2432)。

【0007】

最初の翻訳産物は2813アミノ酸を含む。シグナルペプチド (22アミノ酸) を分離した後、ダイマー化が生じる。さらなるプロセッシングはゴルジ装置中で生じ、プロペプチド (741アミノ酸) の分離下でダイマーが重合する。プロペプチドは、該アミノ末端におけるジスルフィド架橋の形成を触媒することによりダイマーのさらなる連結に重要な役割を果たす。このようにして、500000ダルトンのダイマーから2000万ダルトンまでの大重合体の範囲の種々のサイズのオリゴマーが生じる。タンパク質分解手順に加えて、vWFはグリコシル化および硫酸塩化を含む他の翻訳後修飾を受ける (Mancusoら、Haemostaseologie(1989); 9: 122-129)。

30

【0008】

このように、生合成の複雑さにより、種々の異なる役割と特徴を有する種々の異なるvWF分子が多数存在する。

【0009】

その結果、フォンウィルブラントファクターは天然の結合パートナーとはまったく異なる結合活性を有するかも知れない。特に、種々のvWF分子の、糖タンパク質Ib、コラーゲン、ヘパリン、糖タンパク質IIb/IIIa-コンプレックス、第VIII因子、および内皮下との結合強度は異なるかもしれない。

40

【0010】

しかしながら、これは、各vWF調製物がそれぞれこれら種々のvWFタンパク質またはvWF凝集物の混合物を含むため、第VIII因子に対するその本質的な結合強度といったその特性が不均一であることを意味する。

【0011】

種々の型のvWFの発生は、フォンウィルブラント病の病態生理における複雑で種々の表現型の原因にもなっており、これは、ある場合にはフォンウィルブラントファクターの低産生により、または別の場合には過剰産生による。このように、例えば、vWFの過剰産生

50

は血栓症傾向の増大をもたらし、vWFの低供給は出血傾向の増大または出血時間の増大をもたらすが、これが決定的であるには、フォンウィルブラントファクターの過剰または低産生が常に生じるわけではない。

【0012】

vWFおよびvWF症候群の特性を区別し、特徴付けるには、多くの分析法を用いる。

【0013】

すなわち、診断目的にはリストセチン補助因子活性測定法が必須である。そのためには、抗生物質リストセチンの存在下における血小板凝集が、vWF症候群患者で低下しているかまたはまったくみられないかをアッセイする(Macfarlaneら、Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica 1775;34:306-308)。

10

【0014】

さらに、vWFのコラーゲン結合活性はvWF症候群を区別するのに用いることができる(Thomasら、Haemastaseologie (1994), 14: 133-139)。

【0015】

vWFとFVIII間の結合解離定数はVlotら(Blood 83(11) (1995); 3150-3157)の方法に従って決定することができる。

【0016】

vWFの分子構造は、1.2%アガロースゲル中のSDS電気泳動により多量体構造を分析することにより決定される(Ruggeriら、Blood(1981), 57: 1140-1143)。

【0017】

vWF抗原の総量を測定するには、種々の市販のELISA試験キットを用いる。

20

【0018】

最適FVIII/vWFコンプレックスの調製は、あらゆる不要なタンパク質の存在による望ましくない副作用の危険性があるため、まず、望ましくない付随タンパク質がない安定な生成物を得ることを目指すべきである。

【0019】

すなわち、FVIIIを安定化するのに必要でない濃度のvWFは、血友病患者の負担となる。

【0020】

特に血漿プールからフォンウィルブラント調製物を製造するのに用いる方法の過程において、従来、種々の型のフォンウィルブラントファクターが存在することによる不均一な組成物の危険性を排除することは可能ではなく、先行技術文献において、例えば、あるリガンドへの結合活性に関して一様な特性を有するvWF調製物を得ることは今まで可能ではなかった。

30

【0021】

血漿や寒冷沈降物から種々の抗vWFモノクローナル抗体により第VIIIコンプレックスを精製することが知られている(Thromb. Haemostas.57(1987),102-105)。そのためには、pH6.5の種々の緩衝液におけるFVIII/vWFコンプレックスの安定性も試験した(その中にはグリコール、アミノ酸、カオトロピック物質、アミン、他の塩または有機溶媒および/または界面活性剤を含む緩衝液を含む)。例えば、3M尿素のような高濃度のカオトロピック物質を含む緩衝溶液にリシンを添加することにより、第VIII因子:C/vWF:Agは変性作用から保護される。20%v/vエチレングリコール+1MKJとインキュベーションした後の第VIII因子:CおよびvWF R.cor.の活性は、例えば、それぞれ72%および48%に達し、3M尿素処理後にそれぞれ88%および77%に達した。

40

【0022】

1MKJ+1Mリシン+20mMイミダゾール+5mM CaCl<sub>2</sub>(pH6.5)で溶出した最終産物中の第VIII因子:Cの特異活性は45 I.U./mg総タンパク質であり、vWFのそれは60 I.U./mgであった。

【0023】

Al(OH)<sub>3</sub>で吸着し、抗vWFモノクローナル抗体を用いてウイルス不活化法を実施した後

50

の、寒冷沈降物から第VIII因子 / vWF - コンプレックスのクロマトグラフィーによる精製も報告されている (Biotechnol. Blood Prot.227(1993),109-114)。吸着したコンプレックスの溶出は pH6.5でカオトロピック物質KJ ( 1M)を加えることにより行なう。第VIII因子 : C / vWF:AG比は 0 . 8 であり、第VIII因子 : Cの比活性は 3 8 I.U. / m g であった。

【 0 0 2 4 】

最後に、vWFに対する特異ペプチドを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより不均一な生物学的液状物から第VIII因子コンプレックスを精製することがEP-0295645-A2に記載されている。そのために、該コンプレックスをpH勾配または高イオン強度の緩衝液を用いて溶出した (EP-0295645-A2の実施例5参照)。

【 0 0 2 5 】

EP0416983 A1には、陰イオン交換クロマトグラフィーによって調整する第VIII因子 / vWF - コンプレックスを含む調製物が記載されている。WO86 / 01718 A1によれば、第VIII因子 / vWF - コンプレックス調製物はモノクローナル抗体によるクロマトグラフィーで得られる。

【 0 0 2 6 】

先行技術文献のこれらすべての第VIII因子 / vWF - コンプレックスに共通しているのは、製剤が高度に豊富化され、精製されているにも関わらずvWFの第VIII因子 : Cに対する結合が均質である製剤を提供することができず、比活性の高い天然の第VIII因子 / vWF - 複合体が存在しなかったことである。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 2 7 】

【 特許文献 1 】 EP0295645 A2

【 特許文献 2 】 EP0416983 A1

【 特許文献 3 】 WO86 / 01718 A1

【 特許文献 4 】 EP0159311

【 特許文献 5 】 EP0519901

【 特許文献 6 】 WO94/13329

【 非特許文献 】

【 0 0 2 8 】

【 非特許文献 1 】 Eller, Lab. Med. (1994); 18: 168-176

【 非特許文献 2 】 Mancusoら、Haemostaseologie(1989); 9: 122-129

【 非特許文献 3 】 Macfarlaneら、Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica 1775; 34: 306-308

【 非特許文献 4 】 Thomasら、Haemastaseologie ( 1994), 14: 133-139

【 非特許文献 5 】 Vlotら、Blood(1995), 83(11); 3150-3157

【 非特許文献 6 】 Ruggeriら、Blood (1981), 57: 1140-1143

【 非特許文献 7 】 Thromb. Haemostas. (1987), 57: 102-105

【 非特許文献 8 】 Biotechnol. Blood Prot. (1993), 227: 109-114

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 2 9 】

このように、本発明は、それぞれ、第VIII因子に対するvWFの結合特性に関して一様な構造を有し、特に十分に耐えるかまたは安定な第VIII因子 / vWF - コンプレックスを含む第VIII因子 / vWF - 調製物を提供することを目的とする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 3 0 】

本発明によれば、この目的は、それぞれ第VIII : CとvWのコンプレックス、およびコンプレックス化していない (非コンプレックス化) 第VIII因子 : CおよびvWFを分別的に溶出するアフィニティークロマトグラフィーにより第VIII因子 : CとvWFを含む出発物質を

10

20

30

40

50

精製することにより得られる、比活性が少なくとも70、好ましくは100~300U第VIII因子:C/mgのフォンウィルブラントファクターおよび第VIII因子を成分に含む高度に精製されたコンプレックスを含む調製物により達成される。非コンプレックス化、すなわち、それぞれ過剰な第VIII因子:Cおよびフォンウィルブラントファクターは、特に、コンプレックス化および非コンプレックス化ファクターが別の分画に得られる分別的に溶出によるイムノアフィニティークロマトグラフィーにより分離される。

【0031】

それぞれ非コンプレックス化第VIII因子:Cおよびフォンウィルブラントファクターの革新的分離工程により、特に第VIII因子に対する親和性に欠陥を有するフォンウィルブラントファクターが意図的に分離され、最初に、第VIII因子に対する親和性が明確なvWFの分画を含む、均質な天然の第VIII因子/vWF-コンプレックスを得る。

10

【0032】

驚くべきことに、本発明のコンプレックスは、イムノアフィニティークロマトグラフィー時のカオトロピック環境中で安定である。伝導度が30mSまでの、好ましくは40mSまでの媒質中においても該コンプレックスの解離はみられなかった。このように、抗vWFカラムからの第VIII因子およびvWFの安定なコンプレックスは等張溶液の2~3倍の比較的高いイオン強度でも溶出し、回収することができる。

【0033】

本発明のコンプレックスにおいて、好ましくはvWFはvWF抗原に基づいて0.2~0.6の範囲のコラーゲン結合活性を有する(血漿単位/血漿単位)。

20

【0034】

好ましくは、本発明のコンプレックスは、2つの成分、コンプレックスならびに別々の第VIII因子:CまたはvWFを含む出発物質を精製し、イムノアフィニティ担体から分画で溶出することにより得られる。

【0035】

イムノアフィニティークロマトグラフィーはストリンジェント条件下でも第VIII因子またはvWFに対する親和性または親和力(avidity)を保持する抗体を用いて実施され、このような条件下でも得られた第VIII因子/vWF-コンプレックスは安定であることが好ましいため、溶離剤には、比較的高濃度のカオトロピック物質またはカオトロピックに活性な塩も含まれよう。

30

【0036】

抗体は、例えば、1M NaSCNまたは0.5M塩酸グアニジンでも、または100%飽和硫酸アンモニウムでも結合特性に有害な影響を与えずに抗原と結合するものが選ばれる。それぞれ1.5M NaSCNまたは0.75M塩酸グアニジン、80%エチレングリコールまたは0.75M尿素でもまだ50%の抗原が結合している。好ましくは、イムノアフィニティークロマトグラフィーに用いる抗体は、結合試験において、多くとも30ng/mL、好ましくは多くとも15ng/mLの希釈溶液からでも固定化抗原と結合する強力な抗体である(抗体/抗原比1:5~1:20に相当する)。

【0037】

特に、含まれるvWFの第VIII因子との結合特性の点から均質であるという本発明のコンプレックスのすばらしい特性により、該コンプレックスは第VIII因子および/またはvWFを投与するための医薬調製物を製造するのに特に適している。本発明のコンプレックスは血漿より少なくとも5000倍、好ましくは7100倍~21400倍豊富化された濃度で含むことができることが示されている。このように、本発明のある態様は、それぞれ非コンプレックス化vWFおよび第VIII因子:Cを実質的に含まない、高いコンプレックス結合強度を有する、血漿より少なくとも5000倍、好ましくは7100倍~21400倍豊富化された濃度の高度に精製された本発明のコンプレックスを含む安定な医薬調製物である。このようにして、過剰なvWFや他のタンパク質が患者に負担を与えることなく、第VIII因子/vWF-コンプレックスの生物活性が確実に維持される。本発明の調製物はすばらしい生物学的容認性をも特徴とする。

40

50

## 【0038】

それぞれ非コンプレックス化vWFおよび/または第VIII因子:Cがない(を含まない)とは、総タンパク質含有量に基づいて遊離vWFまたは第VIII因子:Cが医薬調製物中に5%以下、好ましくは1%以下しかみいだせないことをいう。それぞれ非コンプレックス化vWF:Agまたは第VIII因子:Cをそれぞれ検出することができない調製物が特に好ましい。

## 【0039】

それぞれ非コンプレックス化vWFまたは第VIII因子の検出は、それぞれ一定量の遊離vWFまたは第VIII因子をロードするイムノアフィニティー物質上で本発明のコンプレックスを再度クロマトグラフィーにかけ、該コンプレックスを前記の方法のごとく再吸着させ、溶出する。再クロマトグラフィー後に得られた物質は、出発物質と同比の第VIII因子:CとvWF:Agを含み、いかなる相対的損失もみられない。非コンプレックス-結合第VIII因子およびvWFを検出するためのさらなる試験は、該コンプレックスの固定化第VIII因子:C抗体またはvWF抗体との結合であり、吸着後にそれぞれ非結合vWFまたは第VIII因子:Cの実質的な部分が検出されないことである(すなわち、5%以下)。

10

## 【0040】

本発明の医薬調製物はその作用範囲に関して高い信頼性があるのを特徴とし、既知の第VIII因子:C/vWF-コンプレックス調製物に比べて、それぞれ、遊離第VIII因子:Cや容易に解離する第VIII因子:Cの部分が小さいため、第VIII因子の分解または活性化の危険性は著しく低下している。

20

## 【0041】

本発明のコンプレックスを含む医薬調製物は、第VIII因子/vWF調製物に用いる適切な医薬的活性成分、緩衝液、補助物質、または添加物を含んでよいことはもちろんである。第VIII因子/vWF-コンプレックスの優れた安定性により、後者は、アルブミン、糖、特にトレハロースまたはショ糖といった普通の安定化剤をさらに用いることなく安定な医薬調製物に加工することができよう。

## 【0042】

pHが中性の溶液においても、本発明の医薬調製物は液体低温凍結調製物の液体調製物として提供するのに十分安定である。各凍結乾燥調製物の再構成においては、該コンプレックスの組成物がほとんど変化していないことも示すことができる。

30

## 【0043】

該調製物中のそれぞれ投与すべき用量または濃度は、先行技術文献記載の第VIII因子/vWF調製物の投与方法に基づき当業者が容易に決定することもできる。

## 【0044】

第VIII因子および/またはvWFは、該コンプレックス中に第VIII因子のvWFに対する高い結合親和性が保持されている限りにおいて、天然のタンパク質またはその誘導体、例えば、欠失、置換または挿入により突然変異したタンパク質もしくは化学誘導体もしくは断片として本発明の調製物中に含まれていてよい。

## 【0045】

本発明の対象物は、イムノアフィニティークロマトグラフィーにより第VIII因子:CおよびvWFを含む出発物質を精製し、第VIII因子:CとvWFのコンプレックス、および非コンプレックス化第VIII因子およびvWFをそれぞれ分別的に溶出することを含む本発明のコンプレックスを製造することができる方法でもある。該コンプレックスから非コンプレックス化ファクターを意図的に分別溶出することにより、初めて特異結合強度が均一なフォンウィルブラントファクター調製物または第VIII因子/vWF-コンプレックスを得ることが可能となった。

40

## 【0046】

好ましくは、vWFに対する抗体をイムノアフィニティークロマトグラフィーに用いる。この方法では、本質的に種々のvWF分子またはvWF単位を分別することを目的とする精製方法を、種々の天然のフォンウィルブラント分子にも十分用いることができる。

50

## 【0047】

本発明の方法と詳細な態様では、モノクローナル抗体を抗体として用いる。均一性に関して、モノクローナル抗体はポリクローナル抗血清より好ましい。

## 【0048】

アフィニティークロマトグラフィーにおける革新的コンプレックスの好ましい溶出緩衝液は、チオシアネートおよび/またはアンモニウム塩を、好ましくは2 Mを超えない濃度で、最も好ましくは0.05 Mから1.5 Mの範囲で含む緩衝液である。この第一溶出緩衝液は、好ましくはエチレングリコール、グリセロール、またはポリアルキレングリコールを含んでいてよい。

## 【0049】

非コンプレックス化第VIII因子：CまたはvWFはそれぞれ好ましくは、カオトロピック物質、特にチオシアネート、および/またはアンモニウム塩、および/またはアルカリ塩および/またはエチレングリコール、グリセロールまたはポリアルキレングリコールを含む緩衝液で溶出され、均質な調製物としても回収される。そのために、該緩衝液は第一溶出緩衝液より増加した濃度または伝導度、特にそれぞれ20%以上、好ましくは50%~100%高い濃度または伝導度を有する。

## 【0050】

すなわち、本発明のさらなる対象物は、第VIII因子：Cに比べて結合能またはコンプレックス化能が低下し、本発明の方法によって回収することができるフォンウィルブラント調製物にある。

## 【0051】

高度精製コンプレックスおよび革新的非コンプレックス化第VIII因子：CまたはvWF調製物はそれぞれ、所望により、さらなるクロマトグラフィー工程、好ましくはイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィー、特に固定化ヘパリンによるアフィニティークロマトグラフィー、または金属イオンキレートクロマトグラフィーによりさらに精製し、既知の適切な方法で医薬調製物および診断用調製物に加工することができよう。

## 【0052】

原則として医薬調製物を製造するには、ウイルスを不活化または除去する方法、好ましくは加熱処理および/または物理的または化学的処理を提供する必要がある。適切な方法はEP-0159311、EP0519901、およびWO94/13329に記載されている。本発明のコンプレックスは安定性が高いので、好ましくはこのウイルス不活化方法は高度に精製されたコンプレックスに対して行われる。

## 【0053】

本発明の方法の好ましい態様によれば、出発物質は、血漿、例えば寒冷沈降物またはアルコール沈殿物のような血漿分画、細胞培養上清、および医薬調製物からなる群から選ばれる。

## 【0054】

以下の実施例により本発明をより詳細に説明するが、以下の実施例は限定ではない。

## 【実施例】

## 【0055】

実施例1：(現時点で出願人が考える最良の本発明の実施形態)

寒冷沈降物 500gを、30 で溶解緩衝液により1+4に溶解する。次いで、0.45 μmフィルター(例えば、Millipore Durapore)に通して溶液を透明にする。0.5L抗vWFゲル(IMMUNOTECH, フランス)を詰めたカラムをカラム体積(CV)の約10倍量の平衡緩衝液により調製し、透明にした寒冷沈降物溶液を0.5cm/分でカラムに通す。その後、害となる不純物質を5~10CVの平衡緩衝液(流速1cm/分)(場合により、>250mMの、NaCl濃度を増加させた緩衝液でもよい)で洗い流す。次いで、第VIII因子/vWF-コンプレックスが溶出緩衝液1により約1:1の割合で溶出される。溶出緩衝液2による溶出により、第VIII因子をほぼ完全に含まないvWFが得られる。2回目の溶出段階は同

10

20

30

40

50

時にカラムの洗浄にもなり、その後の迅速な平衡化を可能にする。

【 0 0 5 6 】

【表 1】

溶解緩衝液： 7. 5 mM Tris  
6 0 mM NaCl  
1 0 0 mM リシン  
1 0 0 mM 酢酸ナトリウム pH6.8  
2 5 U/mL ヘパリン

平衡緩衝液： 1 0 mM Tris  
1 0 0 mM NaCl  
1 0 0 mM リシン  
3. 2 5 mM CaCl<sub>2</sub> pH6.8

10

溶出緩衝液 1： 1 0 mM Tris  
1 0 0 mM グリシン  
2 5 0 mM NaCl  
3 0 0 mM AMS  
3 mM CaCl<sub>2</sub>  
4 0 %エチレングリコール pH6.5

20

溶出緩衝液 2： 1 0 mM Tris  
1 0 0 mM グリシン  
1. 2 5 M NaCl  
1. 2 5 mM NaSCN  
3 mM CaCl<sub>2</sub>  
4 0 %エチレングリコール pH7.0

【 0 0 5 7 】

【表 2】

30

結果：

試料	U/mL FVIII:C	収率% FVIII:C	U/mg FVIII:C	U/mL vWF	収率% vWF	U/mg vWF	FVIII:C 対 vWF	vWFに 対する Collag. B.
初発	11.0	100.0%	0.4	16.3	100.0%	0.6	1 : 1.48	0.7
FVIII/ vWF	12.7	50.9%	133.7	14.7	39.8%		1 : 1.16	0.3
vWF	0.2	0.5%		23.4	37.2%	236.4		0.7

実施例 2：

40

【 0 0 5 8 】

新鮮な凍結血漿 1LをT>25 で解凍した後、平衡緩衝液で1+2に希釈する。0.45 μmフィルターを通して溶液を透明にする。50 mL抗vWFゲル (IMMUNOTECH) を詰めたカラムを約5 CVの平衡緩衝液により調製した後、透明にした血漿溶液を1 cm/分の流速で通す。望ましくない不純物質を10~20 CVの平衡緩衝液+250 mM NaClで洗い流す。第1の溶出により、第VIII因子/vWF-コンプレックス；第2の溶出により、第VIII因子活性を含まないvWFが得られる。次いで、迅速にカラムを再び平衡化できる。

【 0 0 5 9 】

## 【表 3】

平衡緩衝液： 5 g/L クエン酸ナトリウム  
2 U/mLヘパリン pH7.0

溶出緩衝液 1： 5 g/L クエン酸ナトリウム  
30 g/L AMS  
20 g/L NaSCN  
75 g/L ヒスチジン  
5 g/L NaCl  
0.4 g/L CaCl<sub>2</sub> pH7.0

10

溶出緩衝液 2： 5 g/L クエン酸ナトリウム  
50 g/L AMS  
50 g/L NaSCN  
75 g/L ヒスチジン  
25 g/L NaCl  
0.4 g/L CaCl<sub>2</sub> pH7.0

## 【 0 0 6 0 】

## 【表 4】

20

結果：

試料	U/mL FVIII:C	収率% FVIII:C	U/mg FVIII:C	U/mL vWF	収率% vWF	U/mg vWF	FVIII:C 対 vWF	vWFに 対する Collag. B.
初発	0.3	100.0%	0.01	0.3	100.0%	0.01	1 : 1	1.0
FVIII/vWF	2.4	33.3%	42.86	1.8	24.3%		1 : 0.75	0.5
vWF	0.0	0.2%		4.5	76.0%	112.50		0.8

## フロントページの続き

- (72)発明者 ヴォルフガング・シェーンホーファー  
オーストリア、アー - 3 1 0 0 ザンクト・ペールテン、リンゲルナッツガッセ 5 / ツェー 1 番
- (72)発明者 ヨハン・アイブル  
オーストリア、アー - 1 1 8 0 ヴィーン、グスタフ - チェルマークガッセ 2 番
- (72)発明者 アルフレート・ヴェーバー  
オーストリア、アー - 1 2 1 0 ヴィーン、スクラウプシュトラッセ 2 4 / 4 2 / 8 番
- (72)発明者 イェンドラ・リンナウ  
オーストリア、アー - 1 2 2 4 ヴィーン、ラーヴェンデルヴェーク 2 4 番
- Fターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA06 BA41 BA44 CA59 DA30 DC10 DC15 MA02  
MA16 MA66 NA05 NA06 ZA532  
4H045 AA20 BA41 CA42 DA65 EA24 FA71 GA26