明　細　書

発明の名称 ： 高純度可溶性トロンボモジュリン及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は高純度可溶性トロンボモジュリン及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] トロンボモジュリンは、トロンビンと特異的に結合しトロンビンの血液凝固活性を阻害すると同時にトロンビンのプロテインＣ活性化能を著しく促進する作用を有する物質として知られ、強力な血液凝固阻害作用を有することが知られている。トロンビンによる凝固時間を延長することや、トロンビンによる血小板凝集を抑制することが知られている。プロテインＣは、血液凝固線溶系において重要な役割を演じているビタミンＫ依存性の蛋白質であり、トロンビンの作用により活性化され、活性化プロテインＣとなる。この活性化プロテインＣは、生体内で血液凝固系因子の活性型第Ｖ因子、及び活性型第ＶＩＩＩ因子を失活させ、また血栓溶解作用を有するプラスミノゲンアクチベーターの産生に関与していることが知られている（非特許文献１）。したがって、トロンボモジュリンは、このトロンビンによるプロテインＣの活性化を促進して抗血液凝固剤又は血栓溶解剤として有用であるとされており、凝固亢進を伴う疾患の治療、予防に有効であるという動物実験についての報告もある（非特許文献２）。

[0003] 従来、トロンボモジュリンは、ヒトをはじめとする種々の動物種の血管内皮細胞上に発現している糖蛋白質として発見取得され、その後、クローニングに成功した。即ち、遺伝子工学的手法を用いてヒト肺ｃＤＮＡライブラリーからシグナルペプチドを含むヒトトロンボモジュリン前駆体の遺伝子をクローニングし、そしてトロンボモジュリンの全遺伝子配列を解析し、シグナルペプチド（通常は、１８アミノ酸残基が例示される）を含む５７５残基のアミノ酸配列が明らかにされている（特許文献１）。シグナルペプチドが切断されたマチュアなトロンボモジュリンは、そのマチュアなペプチドのＮ末

端側よりＮ末端領域（１－２２６番目：シグナルペプチドが１８アミノ酸残基であると考えた場合の位置表示、以下同じ）、６つのＥＧＦ様構造をもつ領域（２２７－４６２番目）、Ｏ型糖鎖付加領域（４６３－４９８番目）、膜貫通領域（４９９－５２１番目）、そして細胞質内領域（５２２－５５７番目）の５つの領域から構成されており、そして全長のトロンボモジュリンと同じ活性を有する部分（すなわち、最小活性単位）としては、６つのＥＧＦ様構造を持つ領域のうち、主にはＮ末端側から４，５，６番目のＥＧＦ様構造からなる部分であることが知られている（非特許文献３）。

[0004] 全長のトロンボモジュリンは界面活性剤の存在下でないと溶解し難く、製剤としては界面活性剤の添加が必須であるのに対して、界面活性剤の非存在下でもきれいに溶解することができる可溶性トロンボモジュリンが存在する。可溶性トロンボモジュリンは、少なくとも、膜貫通領域の一部又は全部を含有せしめないように調製すればよく、例えば、Ｎ末端領域と６つのＥＧＦ様構造をもつ領域とＯ型糖鎖付加領域の３つの領域のみからなる（即ち、配列番号１の第１９～５１６位のアミノ酸配列からなる）可溶性トロンボモジュリンは、組換え技術の応用により取得できること、そしてその組換え体可溶性トロンボモジュリンは、天然のトロンボモジュリンの活性を有していることが確認されている（特許文献１）。他に可溶性トロンボモジュリンの例としていくつかの報告がある（特許文献２～９）。あるいは天然型としてヒト尿由来の可溶性トロンボモジュリン等も例示される（特許文献１０、１１）。

[0005] 因みに、遺伝子においては、自然の変異又は取得時の変異により、多くのケースで認められる通り、ヒトにおいても多型性の変異が見つけられており、上述の５７５残基のアミノ酸配列からなるヒトトロンボモジュリン前駆体の第４７３位のアミノ酸においてＶａｌであるものと、Ａｌａであるものが現在確認されている。このアミノ酸をコードする塩基配列においては、第１４１８位において、それぞれＴとＣとの変異に相当する（非特許文献４）。しかし、活性及び物性においては、全く相違なく、両者は実質的に同一と判

断できる。

[0006] トロンボモジュリンはＤＩＣの治療において効果があることが報告されている（非特許文献５、６）。トロンボモジュリンの用途としては上述の他に、例えば、急性冠動脈症候群（ＡＣＳ）、血栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管炎、心臓手術に続発する機能性障害、臓器移植の合併症、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症、糖尿病、肝ＶＯＤ（Ｌｉｖｅｒ ｖｅｎｏ－ｏｃｃｌｕｓｉｖｅ ｄｉｓｅａｓｅ；劇症肝炎や骨髄移植後の肝静脈閉塞症）、深部静脈血栓症（ＤＶＴ；Ｄｅｅｐ ｖｅｎｏｕｓ ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ）等や、さらには成人呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ；Ａｄｕｌｔ ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ ｄｉｓｔｒｅｓｓ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）の疾患の治療及び予防に用いられることが期待されている。

[0007] 医薬品への利用を考える前提として、可溶性トロンボモジュリンを、大量に、そしてより安価に製造する必要があることは言うまでもないが、製造工程に由来する異種たん白質、例えば、宿主細胞由来のたん白質、培地由来のウシ血清たん白質、抗体カラム由来のマウスＩｇＧ等が免疫原性となり、安全性の面から問題となる可能性が指摘されている（非特許文献７）。

[0008] 医薬品への利用を考え、工業レベルで可溶性トロンボモジュリンを製造する方法としては、例えば主精製工程としてトロンボモジュリンに対する抗体を担持させたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いる方法、更にアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより得られた該可溶性トロンボモジュリンを、比伝導度２５～３４ｍｓ／ｃｍ、ｐＨ３～４の条件下にて、陽イオン交換体と接触させる工程において、素通り画分として該可溶性トロンボモジュリンを取得することを特徴とする血清由来物及び抗体由来物を実質的に含有しない高純度可溶性トロンボモジュリンの製造方法が知られている（特許文献１２）。また、主精製工程のアフィニティーカラムクロマトグラフィー工程の後に強陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを組み合わせた精製方法が知られている（特許文献１３）。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開昭６４－６２１９号公報

特許文献2：特開平２－２５５６９９号公報

特許文献3：特開平３－１３３３８０号公報

特許文献4：特開平３－２５９０８４号公報

特許文献5：特開平４－２１０７００号公報

特許文献6：特開平５－２１３９９８号公報

特許文献7：ＷＯ９２／００３２５号公報

特許文献8：ＷＯ９２／０３１４９号公報

特許文献9：ＷＯ９３／１５７５５号公報

特許文献10：特開平３－８６９００号公報

特許文献11：特開平３－２１８３９９号公報

特許文献12：特開平１１－３４１９９０号公報

特許文献13：ＷＯ２００８／１１７７３５号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：鈴木宏治、医学のあゆみ、第１２５巻、９０１頁（１９８３年）

非特許文献2：Ｋ．Ｇｏｍｉら Ｂｌｏｏｄ ７５．１３９６－１３９９（１９９０）

非特許文献3：Ｍ．Ｚｕｓｈｉら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２４６，１０３５１－１０３５３（１９８９）

非特許文献4：Ｄ．Ｚ．Ｗｅｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２６，４３５０－４３５７（１９８７）

非特許文献5：Ｓ．Ｍ．Ｂａｔｅｓら、Ｂｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，１４４，１０１７－１０２８（２００５）

非特許文献6：Ｈ．Ｓａｉｔｏら、Ｊ．Ｔｈｒｏｍｂ Ｈａｅｍｏｓｔ，５（１），３１（２００７）

非特許文献7：早川堯夫、バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保、２７３－

２７４（２００７）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明の課題は、宿主細胞由来たん白質の濃度が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率である、高純度可溶性トロンボモジュリン及びその製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0012] 特許文献１３には、精製された可溶性トロンボモジュリンが記載されている。特に、当該文献の実施例１４には、宿主由来のたん白質（以下、本明細書において「ＨＣＰ」と略すことがある。）の濃度が「Ｎ．Ｄ．」（明記はされていないが「検出されず」を意味するものと思われる）と記載された可溶性トロンボモジュリンが開示されている。当該記載を見た当業者は、ＨＣＰの混入が低減された高純度可溶性トロンボモジュリンは充分に達成されており、もはや可溶性トロンボモジュリン中のＨＣＰを低減しようとは思わない、すなわち可溶性トロンボモジュリン中のＨＣＰの混入を低減しようとする動機などは働かないのが通常である。

[0013] しかしながら、本発明者らは精製された可溶性トロンボモジュリンを医薬品として用いる場合、ＨＣＰが混入していればそれがアナフィラキシーショック等の予期せぬ事態を引き起こし、場合によっては死に至るリスクがあることを大きな問題点として強く認識していた。そこで、本発明者らは、上記特許文献１３の実施例１４に「Ｎ．Ｄ．」と記載されているために充分にＨＣＰの混入が低減されていると当業者であれば通常考えるであろう中、上記特許文献１３の実施例１４に記載の精製された可溶性トロンボモジュリンのＨＣＰ濃度を測定したところ、定量限界ではあるが混入するＨＣＰ濃度が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕ（後述の参考例１に記載の通り、特にことわらない限り「Ｕ」はプロテインＣ活性化を促進する作用（以下、ＡＰＣ活性と略すことがある）を示す単位を意味する。以下においても同様である。）に対して７０～８０ｎｇ未満という比率を示し、ＨＣＰの低減につ

いてはまだまだ改善の余地がある可能性があることを本発明者らは初めて確認した。当該ＨＣＰ濃度については、特許文献１３には開示の無い濃縮工程という新たな工程をＨＣＰ測定において採用することで、濃度を正確に測定することができると本発明者らは独自に考えている。

[0014] 上記事実を初めて見出した本発明者らは、可溶性トロンボモジュリンを医薬品としてより安全に利用することを考え、可溶性トロンボモジュリン中のＨＣＰ含量をさらに低減させた精製されたトロンボモジュリンを取得し、アナフィラキシーショックのリスクを最小限にするという新規な課題を見出した。

[0015] 本発明者らは、ＨＣＰの混入がさらに低減された高純度可溶性トロンボモジュリンを工業レベルで製造するために、新たなカラムクロマトグラフィー工程の導入を検討した。すなわち、最もＨＣＰ除去効果が高いとされるアフィニティーカラムクロマトグラフィーに複数のカラムクロマトグラフィーを組み合わせることによりＨＣＰの低減を試みたが、カラムクロマトグラフィー工程の追加は製造の手間が増えるだけでなく、可溶性トロンボモジュリンの収率を低下させるという問題が発生した。また、アフィニティーカラムクロマトグラフィーに複数のカラムクロマトフラフィーを組み合わせても、ＨＣＰ濃度が従来以上にさらに低減された高純度可溶性トロンボモジュリンを取得することができなかった。さらに、カラムクロマトグラフィーは、ｐＨやイオン強度などが僅かに変化しただけで、ＨＣＰと可溶性トロンボモジュリンの分離が変化し、期待する結果が再現されないという問題点もあり、高純度可溶性トロンボモジュリンを取得することは困難であった。

[0016] そこで本発明者らは、カラムクロマトグラフィーよりも操作が簡便で、可溶性トロンボモジュリンの収率を低下させることなく、工業レベルでＨＣＰを効率よく除去し、ＨＣＰの混入がさらに低減された高純度可溶性トロンボモジュリンを取得する方法を見出すべく鋭意検討した結果、ナイロン及び／又はポリエーテルスルホン、中でもナイロンを用いることでＨＣＰ濃度が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の高純度可溶

性トロンボモジュリンを取得するという上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0017] すなわち本発明としては以下のものが挙げられる。

〔１〕 可溶性トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡを宿主細胞にトランスフェクトして得られた形質転換細胞にて産生される可溶性トロンボモジュリンであって、該宿主細胞由来たん白質の含有率が、可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率である高純度可溶性トロンボモジュリン。

〔１－２〕 高純度可溶性トロンボモジュリンが、総たん白質中純度９９％以上である前記〔１〕に記載の高純度可溶性トロンボモジュリン。

〔１－３〕 高純度可溶性トロンボモジュリンが水溶液の形態である前記〔１〕

又は〔１－２〕に記載の高純度可溶性トロンボモジュリン。

〔１－４〕 高純度可溶性トロンボモジュリン水溶液中の可溶性トロンボモジュリン濃度が８ｍｇ／ｍＬ以上の濃度である前記〔１－３〕に記載の高純度可溶性トロンボモジュリン。

[0018] 〔２〕 可溶性トロンボモジュリンが該形質転換細胞を無血清培養により産生されるトロンボモジュリンである前記〔１〕～〔１－４〕のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン。

なお、前記〔１〕～〔１－４〕のように引用する項番号が範囲で示され、その範囲内に〔１－２〕等の枝番号を有する項が配置されている場合には、〔１－２〕等の枝番号を有する項も引用されることを意味する。以下においても同様である。

[0019] 〔２－２〕 該宿主細胞由来たん白質の含有率の測定に際して、以下の工程を少なくとも含む方法にて測定することにより、可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の宿主細胞由来たん白質濃度であることを確認する前記〔１〕～〔２〕のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン；

（ａ）可溶性トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡを宿主細胞にトランスフェクトして得られた形質転換細胞、又はその宿主細胞のいずれかを無血清培養して得られる培養上清から宿主細胞由来たん白質を調製する工程、

（ｂ）上記（ａ）の該宿主細胞由来たん白質をウサギに感作して得られる抗血清から抗宿主細胞由来たん白質抗体を精製する工程、

（ｃ１）上記（ｂ）の該抗宿主細胞由来たん白質抗体を固相に吸着させる工程、

（ｃ２－１）該抗宿主細胞由来たん白質抗体を吸着させた該固相に、該宿主細胞由来たん白質の混入が疑われる可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液を接触させる工程、及び該抗宿主細胞由来たん白質抗体を吸着させた該固相に濃度が既知の宿主細胞由来たん白質含有溶液を接触させる工程、

（ｃ３）該固相にビオチン化した抗宿主細胞由来たん白質抗体を添加する工程、

（ｃ４）該固相にアビジン化したペルオキシダーゼ溶液を添加する工程、

（ｃ５）酵素基質溶液を添加し、発色させる工程、及び

（ｃ６）発色を停止し、その吸光度を測定する工程、

を含む測定系を構築する工程、

（ｄ）上記測定系にて該宿主細胞由来たん白質の混入が疑われる可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液の宿主細胞由来たん白質濃度を測定し、該可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液の宿主細胞由来たん白質濃度が、上記測定系にて濃度が既知の宿主細胞由来たん白質含有溶液を用いて測定することにより予め確認した上記測定系における定量可能範囲におさまるか否かを判断する工程、

（ｅ－１）上記（ｄ）において、該宿主細胞由来たん白質の混入が疑われる可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液中の宿主細胞由来たん白質濃度が定量可能範囲におさまる場合、該濃度を該宿主細胞由来たん白質濃度とする工程、

（ｅ－２－１）上記（ｄ）において、該宿主細胞由来たん白質の混入が疑われる可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液中の宿主細胞由来たん白質濃度が定量可能範囲におさまらない場合、上記測定系における定量可能範囲におさまる測定可能な濃度とするために必要に応じて可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液を濃縮又は希釈し、その濃縮率又は希釈率を記録する工程、

（ｅ－２－２）上記（ｅ－２－１）において濃縮又は希釈した可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液中の宿主細胞由来たん白質濃度を、上記（ｃ１）～（ｃ６）で示される測定系のうち（ｃ２－１）を以下に示す（ｃ２－２）に置き換えた測定系にて測定し、濃縮率又は希釈率を考慮して該宿主細胞由来たん白質濃度を求める工程、

（ｃ２－２）該抗宿主細胞由来たん白質抗体を吸着させた該固相に、必要に応じて濃縮又は希釈した可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液を接触させる工程、及び該抗宿主細胞由来たん白質抗体を吸着させた該固相に濃度が既知の宿主細胞由来たん白質含有溶液を接触させる工程、及び

（ｆ）別途測定した可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液単位体積あたりのトロンボモジュリンのＡＰＣ活性に対する、（ｅ－１）又は（ｅ－２－２）で求めた宿主細胞由来たん白質濃度の割合を算出する工程。

〔２－３〕　前記〔２－２〕（ａ）における宿主細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞ＤＸＢ１１株である前記〔２－２〕に記載の高純度可溶性トロンボモジュリン。

[0020] 〔３〕　該宿主細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞である前記〔１〕～〔２－３〕のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン。

〔４〕　該可溶性トロンボモジュリンが、下記の（１）～（５）の性質を有する可溶性トロンボモジュリンである前記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン；

（１）トロンビンと選択的に結合する作用、

（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用、

（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、

（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用、及び

（５）抗炎症作用。

〔４－２〕　該可溶性トロンボモジュリンが、下記の（１）～（４）の性質を有する可溶性トロンボモジュリンである前記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン；

（１）トロンビンと選択的に結合する作用、

（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用、

（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、及び

（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用。

[0021] 〔５〕　該可溶性トロンボモジュリンの分子量が５０，０００から８０，０００である前記〔１〕～〔４－２〕のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン。

〔６〕　該高純度可溶性トロンボモジュリンが以下の工程を含む方法により製造される前記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン；

（ａ）可溶性トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡを宿主細胞にトランスフェクトして形質転換細胞を取得する工程、

（ｂ）該形質転換細胞を培養して可溶性トロンボモジュリンを含む溶液を取得する工程、及び

（ｃ）該可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させ、宿主細胞由来たん白質の含有率が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率である高純度可溶性トロンボモジュリンを得る工程。

[0022] 〔７〕　該可溶性トロンボモジュリンが、

（ｉ）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列における第３６７～４８０位のアミノ酸配列を含み、かつ下記（ii－１）又は（ii－２）のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであって、該ペプチドが下記の（１）～（５）の性質を有する可溶性トロンボモジュリンである前記〔

１〕～〔６〕のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン；

（ｉｉ－１）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列における第１９～２４４位のアミノ酸配列、又は

（ｉｉ－２）上記（ｉｉ－１）のアミノ酸配列の１つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列、

（１）トロンビンと選択的に結合する作用、

（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用、

（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、

（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用、及び

（５）抗炎症作用。

[0023] 〔７－２〕　該可溶性トロンボモジュリンが、

（ｉ）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列における第３６７～４８０位のアミノ酸配列を含み、かつ下記（ｉｉ－１）又は（ｉｉ－２）のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであって、該ペプチドが下記の（１）～（４）の性質を有する可溶性トロンボモジュリンである前記〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン；

（ｉｉ－１）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列における第１９～２４４位のアミノ酸配列、又は

（ｉｉ－２）上記（ｉｉ－１）のアミノ酸配列の１つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列、

（１）トロンビンと選択的に結合する作用、

（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用、

（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、及び

（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用。

[0024] 〔７－３〕　該可溶性トロンボモジュリンが、

下記（ｉ－１）又は（ｉ－２）のいずれかのアミノ酸配列を含み、かつ下記（ｉｉ－１）又は（ｉｉ－２）のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであって、該ペプチドが下記の（１）～（５）の性質を有する可溶性トロンボモジ

ュリンである前記〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン；

（ｉ－１）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列における第３６７～４８０位のアミノ酸配列、又は

（ｉ－２）上記（ｉ－１）のアミノ酸配列の１つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列、

（ii－１）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列における第１９～２４４位のアミノ酸配列、又は

（ii－２）上記（ii－１）のアミノ酸配列の１つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列、

（１）トロンビンと選択的に結合する作用、

（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用、

（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、

（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用、及び

（５）抗炎症作用。

[0025] 〔８〕 該可溶性トロンボモジュリンが、

（ｉ－１）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列における第１９～５１６位のアミノ酸配列、又は

（ｉ－２）上記（ｉ－１）のアミノ酸配列の１つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列

のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチドであって、該ペプチドが下記の（１）～（５）の性質を有する可溶性トロンボモジュリンである前記〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン；

（１）トロンビンと選択的に結合する作用、

（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用、

（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、

（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用、及び

（５）抗炎症作用。

[0026] 〔９〕　該可溶性トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡが、配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするＤＮＡである前記〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン。

〔１０〕　前記〔１〕～〔９〕の何れかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン及び薬学上許容される担体を含有する医薬組成物。

〔１１〕　宿主細胞由来たん白質の含有率が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率である高純度可溶性トロンボモジュリンの製造方法であって、可溶性トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡを宿主細胞にトランスフェクトして得られた形質転換細胞が産生する可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させる工程を含む製造方法。

〔１２〕　可溶性トロンボモジュリンを該形質転換細胞を無血清培養することにより産生する前記〔１１〕に記載の製造方法。

[0027] 〔１３〕　該可溶性トロンボモジュリンが、下記の（１）～（５）の性質を有する可溶性トロンボモジュリンである前記〔１１〕又は〔１２〕に記載の高純度可溶性トロンボモジュリンの製造方法；

（１）トロンビンと選択的に結合する作用、

（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用、

（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、

（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用、及び

（５）抗炎症作用。

〔１４〕　該宿主細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞である前記〔１１〕～〔１３〕のいずれかに記載の製造方法。

〔１５〕　該可溶性トロンボモジュリンの分子量が５０，０００から８０，０００である前記〔１１〕～〔１４〕のいずれかに記載の製造方法。

[0028] 〔１６〕　該可溶性トロンボモジュリンが、

（ｉ）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列におけ

る第３６７～４８０位のアミノ酸配列を含み、かつ下記（ｉｉ－１）又は（ｉｉ－２）のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであって、該ペプチドが下記の（１）～（５）の性質を有する可溶性トロンボモジュリンである前記〔１１〕～〔１５〕のいずれかに記載の製造方法；

（ｉｉ－１）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列における第１９～２４４位のアミノ酸配列、又は

（ｉｉ－２）上記（ｉｉ－１）のアミノ酸配列の１つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列、

（１）トロンビンと選択的に結合する作用、

（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用、

（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、

（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用、及び

（５）抗炎症作用。

[0029] 〔１７〕　該可溶性トロンボモジュリンが、

（ｉ－１）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列における第１９～５１６位のアミノ酸配列、又は

（ｉ－２）上記（ｉ－１）のアミノ酸配列の１つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列

のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチドであって、該ペプチドが下記の（１）～（５）の性質を有する可溶性トロンボモジュリンである前記〔１１〕～〔１５〕のいずれかに記載の製造方法；

（１）トロンビンと選択的に結合する作用、

（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用、

（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、

（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用、及び

（５）抗炎症作用。

[0030] 〔１８〕　該可溶性トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡが、配列番号９又は配列番号１１に記載のアミノ酸配列をコードするＤ

ＮＡである前記〔１１〕～〔１５〕のいずれかに記載の製造方法。

〔１９〕　ナイロン及び／又はポリエーテルスルホンの形態がろ過膜の形態である前記〔１１〕～〔１８〕のいずれかに記載の製造方法。

〔２０〕　ろ過膜の膜面積が宿主細胞由来たん白質１ｍｇに対して０．０１から０．５m^2である前記〔１９〕に記載の製造方法。

〔２１〕　ナイロン及び／又はポリエーテルスルホンがナイロンである前記〔１１〕～〔２０〕のいずれかに記載の製造方法。

〔２２〕　前記〔１１〕～〔２０〕に記載の高純度可溶性トロンボモジュリンの製造方法であって、〔１－２〕～〔１～４〕、〔２－２〕、〔２－３〕、〔７－２〕、又は〔７－３〕のいずれかに記載の特徴を有する製造方法。

[0031] 〔２３〕　宿主細胞由来たん白質の含有率が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率である高純度可溶性トロンボモジュリンの製造方法であって、

（ａ）配列番号９又は配列番号１１に記載のアミノ酸配列をコードするＤＮＡを宿主細胞にトランスフェクトして形質転換細胞を取得する工程、

（ｂ）該形質転換細胞を培養して可溶性トロンボモジュリンを含む溶液を取得する工程、

（ｃ）該可溶性トロンボモジュリンを含む溶液を総たん白質中トロンボモジュリン純度９９％以上に精製する工程、及び

（ｄ）該可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロンに接触させ、宿主細胞由来たん白質の含有率が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率である高純度可溶性トロンボモジュリンを単離する工程

を含む製造方法であって、前記宿主細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞である前記〔１１〕～〔２２〕のいずれかに記載の製造方法。

〔２４〕　前記〔２３〕に記載の方法により製造される高純度可溶性トロンボモジュリン。

〔２５〕　可溶性トロンボモジュリン中の宿主細胞由来たん白質を除去する

方法であって、可溶性トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡを宿主細胞にトランスフェクトして得られた形質転換細胞が産生する可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させる工程を含む方法。

〔２６〕　可溶性トロンボモジュリン中の宿主細胞由来たん白質を除去する方法であって、（ａ）配列番号９又は配列番号１１に記載のアミノ酸配列をコードするＤＮＡを宿主細胞にトランスフェクトして形質転換細胞を取得する工程、

（ｂ）該形質転換細胞を培養して可溶性トロンボモジュリンを含む溶液を取得する工程、

（ｃ）該可溶性トロンボモジュリンを含む溶液を総たん白質中トロンボモジュリン純度９９％以上に精製する工程、及び

（ｄ）該可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロンに接触させる工程を含む方法であって、前記宿主細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞である前記〔２５〕に記載の方法。

〔２７〕　前記〔２５〕に記載の可溶性トロンボモジュリン中の宿主細胞由来たん白質を除去する方法であって、前記〔１〕～〔９〕のいずれかに記載の特徴を有する方法。

発明の効果

[0032]　本発明の製造方法を用いることにより、宿主細胞由来たん白質の含有率が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率である、宿主細胞由来たん白質の混入が低減された高純度可溶性トロンボモジュリンを取得できる。これにより、医薬品として可溶性トロンボモジュリンを利用する際のアナフィラキシーショックのリスクをさらに低減させることができる。

発明を実施するための形態

[0033]　以下、本発明をいくつかの好ましい態様（本発明を実施するための好ましい形態：以下、本明細書において「実施の形態」と略すことがある）につい

て具体的に説明するが、本発明の範囲は下記に説明する特定の態様に限定されることはない。

[0034] 本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンは医薬原料として用いることができる。本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンを他の薬学上許容される担体と組み合わせて医薬品として使用することもできる。

また、本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンは、可溶性トロンボモジュリン以外の物質を実質的に含まない、高純度の可溶性トロンボモジュリン含有医薬組成物として使用することができる。本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンを他の薬学上許容される担体と組み合わせた医薬組成物として使用することもできる。

[0035] 以下、高純度可溶性トロンボモジュリンの医薬原料を含めて高純度トロンボモジュリンと呼ぶ場合がある。また、可溶性トロンボモジュリン以外の物質を実質的に含まない高純度可溶性トロンボモジュリン含有医薬組成物を含めて高純度可溶性トロンボモジュリンと呼ぶ場合がある。

[0036] 本実施の形態におけるトロンボモジュリンは、（１）トロンビンと選択的に結合して（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用を有することが知られている。また、（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用、及び／又は（５）抗炎症作用が通常認められることが好ましい。これらトロンボモジュリンの持つ作用をトロンボモジュリン活性と呼ぶことがある。

[0037] トロンボモジュリン活性としては、上記（１）及び（２）の作用を有し、さらに上記（１）～（４）の作用を有していることが好ましい。また、トロンボモジュリン活性としては、（１）～（５）の作用を全て備えていることがより好ましい。

[0038] トロンボモジュリンのトロンビンとの結合作用は、例えば、Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ ａｎｄ Ｈａｅｍｏｓｔａｓｉｓ １９９３ ７０（３）：４１８－４２２を初めとする各種の公知文献に記載の試験方法により確認できる。トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用は、例えば、特開

昭６４－６２１９号公報を初めとする各種の公知文献に明確に記載された試験方法によりプロテインＣの活性化を促進する作用の活性量やその有無を容易に確認できるものである。また、トロンビンによる凝固時間を延長する作用、及び／又はトロンビンによる血小板凝集を抑制する作用についても同様に容易に確認できる。さらには、抗炎症作用についても、例えばｂｌｏｏｄ　２００８　１１２：３３６１－３６７０、Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ　２００５　１１５　５：１２６７－１２７４を初めとする各種の公知文献に記載の試験方法により確認できる。

[0039] 可溶性トロンボモジュリンとしては、界面活性剤の非存在下で水に可溶な可溶性トロンボモジュリンが例として挙げられる。可溶性トロンボモジュリンの溶解性の好ましい例示としては、水、例えば注射用蒸留水に対して（トリトンＸ－１００やポリドカノール等の界面活性剤の非存在下、通常は中性付近にて）、１ｍｇ／ｍｌ以上、又は１０ｍｇ／ｍｌ以上が挙げられ、好ましくは１５ｍｇ／ｍｌ以上、又は１７ｍｇ／ｍｌ以上が挙げられ、さらに好ましくは２０ｍｇ／ｍｌ以上、２５ｍｇ／ｍｌ以上、又は３０ｍｇ／ｍｌ以上が例示され、特に好ましくは６０ｍｇ／ｍｌ以上が挙げられ、場合によっては、８０ｍｇ／ｍｌ以上、又は１００ｍｇ／ｍｌ以上がそれぞれ挙げられる。可溶性トロンボモジュリンが溶解し得たか否かを判断するに当たっては、溶解した後に、例えば白色光源の直下、約１０００ルクスの明るさの位置で、肉眼で観察した場合に、澄明であって、明らかに認められるような程度の不溶性物質を含まないことが端的な指標となるものと理解される。また、濾過して残渣の有無を確認することもできる。

[0040] 可溶性トロンボモジュリンは上記に示した通り、トロンボモジュリン活性を有し、可溶性であれば、その分子量は限定されないが、分子量の上限としては１００，０００以下が好ましく、９０，０００以下がより好ましく、８０，０００以下がさらに好ましく、７０，０００以下が特に好ましく、分子量の下限としては、５０，０００以上がさらに好ましく、６０，０００以上

が特に好ましい。可溶性トロンボモジュリンの分子量は、たん白質の分子量を測定する通常の方法で容易に測定が可能であるが、質量分析法にて測定することが好ましく、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ法がより好ましい。

[0041] 目的の範囲の分子量の可溶性トロンボモジュリンを取得するためには、後述の通り、可溶性トロンボモジュリンをコードするＤＮＡをベクターにより宿主細胞にトランスフェクトして調製された形質転換細胞を培養することにより取得される可溶性トロンボモジュリンをカラムクロマトグラフィー等により分画することで取得することができる。

[0042] 可溶性トロンボモジュリンとしては、ヒト型のトロンボモジュリンにおいて配列番号１の第１９～１３２位のアミノ酸配列、及び配列番号９又は配列番号１１の第１９～２４４位のアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列の１つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加していてもよいアミノ酸配列を包含していることが好ましい。該配列番号１の第１９～１３２位のアミノ酸配列は、トロンボモジュリン活性のうちトロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用に関与する配列である。一方、配列番号９又は配列番号１１の第１９～２４４位のアミノ酸配列は、トロンボモジュリン活性のうち抗炎症作用に関与する配列である。可溶性トロンボモジュリンが、可溶性トロンボモジュリン全体としてトロンボモジュリン活性を有する限り、該配列番号１の第１９～１３２位のアミノ酸配列は自然又は人工的に変異していてもよく、すなわち配列番号１の第１９～１３２位のアミノ酸配列の１つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加していてもよい。許容される変異の程度は、トロンボモジュリン活性を有すれば特に限定されないが、例えばアミノ酸配列として５０％以上の相同性が例示され、７０％以上の相同性が好ましく、８０％以上の相同性がより好ましく、９０％以上の相同性がさらに好ましく、９５％以上の相同性が特に好ましく、９８％以上の相同性が最も好ましい。このようにアミノ酸配列の１つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加しているアミノ酸配列を相同変異配列という。これらの変異については後述の通り、通常の遺伝子操作技術を用いれば容易に取得可能である。可溶性トロン

ボモジュリンは上記配列を有し、少なくとも可溶性トロンボモジュリン全体としてトロンビンと選択的に結合してトロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用を有していれば特に限定されないが、同時に抗炎症作用を有することが好ましい。

[0043] 配列番号３の配列は、配列番号１の配列の第１２５位のアミノ酸であるＶａｌがＡｌａに変異したものであるが、本実施の形態における可溶性トロンボモジュリンとして、配列番号３の第１９～１３２位のアミノ酸配列を包含していることも好ましい。

[0044] このように可溶性トロンボモジュリンとしては、配列番号１もしくは配列番号３の第１９～１３２位の配列又はそれらの相同変異配列、及び配列番号９もしくは配列番号１１の第１９～２４４位の配列又はそれらの相同変異配列を少なくとも有し、少なくとも可溶性トロンボモジュリン全体としてトロンビンと選択的に結合してトロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用を有していれば特に限定されないが、配列番号１もしくは配列番号３における第１９～１３２位もしくは第１７～１３２位の配列からなるペプチド又は上記配列の相同変異配列、及び配列番号９もしくは配列番号１１の第１９～２４４位の配列又はそれらの相同変異配列からなり少なくとも可溶性トロンボモジュリン全体としてトロンボモジュリン活性を有するペプチドが好ましい例として挙げられ、配列番号１もしくは配列番号３の第１９～１３２位の配列、及び配列番号９もしくは配列番号１１の第１９～２４４位の配列又はそれらの相同変異配列からなるペプチドがより好ましい。また、配列番号１もしくは配列番号３における第１９～１３２位もしくは第１７～１３２位の相同変異配列、及び配列番号９もしくは配列番号１１の第１９～２４４位の配列又はそれらの相同変異配列からなり少なくとも可溶性トロンボモジュリン全体としてトロンボモジュリン活性を有するペプチドがより好ましい別の態様もある。

可溶性トロンボモジュリンは、可溶性トロンボモジュリン全体として同時に抗炎症作用を有することが好ましい。

[0045] また、可溶性トロンボモジュリンの別の態様として、配列番号５の第１９～４８０位のアミノ酸配列を包含していることが好ましく、配列番号５の第１９～４８０位のアミノ酸配列を包含していれば特に限定されない。該配列番号５の第１９～４８０位のアミノ酸配列は、トロンボモジュリン活性を有する限りその相同変異配列であってもよい。

[0046] 配列番号７の配列は、配列番号５の配列の第４７３位のアミノ酸であるＶａｌがＡｌａに変異したものであるが、本実施の形態における可溶性トロンボモジュリンとして、配列番号７の第１９～４８０位のアミノ酸配列を包含していることも好ましい。

[0047] このように、可溶性トロンボモジュリンとしては、配列番号５もしくは配列番号７の第１９～４８０位の配列、又はそれらの相同変異配列を少なくとも有し、少なくともトロンボモジュリン活性を有するペプチド配列を包含していれば特に限定されないが、配列番号５もしくは配列番号７のそれぞれにおける第１９～４８０位もしくは第１７～４８０位の配列からなるペプチド、又は上記配列の相同変異配列からなり少なくともトロンボモジュリン活性を有するペプチドが好ましい例として挙げられ、配列番号５もしくは配列番号７の第１９～４８０位の配列からなるペプチドがより好ましい。また、配列番号５もしくは配列番号７のそれぞれにおける第１９～４８０位もしくは第１７～４８０位の相同変異配列からなり少なくともトロンボモジュリン活性を有するペプチドがより好ましい別の態様もある。

可溶性トロンボモジュリンは、同時に抗炎症作用を有することが好ましい。

[0048] また可溶性トロンボモジュリンの特に好ましい別の態様として、配列番号９の第１９～５１５位のアミノ酸配列を包含していることが好ましく、配列番号９の第１９～５１５位のアミノ酸配列を包含していれば特に限定されない。該配列番号９の第１９～５１５位のアミノ酸配列は、トロンボモジュリン活性を有する限りその相同変異配列であってもよい。

[0049] 配列番号１１の配列は、配列番号９の配列の第４７３位のアミノ酸である

ＶａｌがＡｌａに変異したものであるが、本実施の形態におけるトロンボモジュリンとして、配列番号１１の第１９～５１５位のアミノ酸配列を包含していることも好ましい。

[0050] このように可溶性トロンボモジュリンとしては、配列番号９もしくは配列番号１１の第１９～５１５位の配列、又はそれらの相同変異配列を少なくとも有し、少なくともトロンボモジュリン活性を有するペプチド配列を包含していれば特に限定されないが、配列番号９もしくは配列番号１１のそれぞれにおける第１９～５１６位、第１９～５１５位、第１９～５１４位、第１７～５１６位、第１７～５１５位、もしくは第１７～５１４位の配列からなるペプチド、又は上記配列の相同変異配列からなり少なくともトロンボモジュリン活性を有するペプチドがより好ましい例として挙げられ、配列番号９における第１９～５１６位、第１９～５１５位、第１９～５１４位、第１７～５１６位、第１７～５１５位、もしくは第１７～５１４位の配列からなるペプチドが特に好ましい。これらの混合物も好ましい例として挙げられる。また、配列番号１１のそれぞれにおける第１９～５１６位、第１９～５１５位、第１９～５１４位、第１７～５１６位、第１７～５１５位、もしくは第１７～５１４位の配列からなるペプチドが特に好ましい別の態様もある。これらの混合物も好ましい例として挙げられる。さらにそれらの相同変異配列からなり、少なくともトロンボモジュリン活性を有するペプチドも好ましい例として挙げられる。

可溶性トロンボモジュリンは、同時に抗炎症作用を有することが好ましい。

[0051] 相同変異配列を有するペプチドとは、上述した通りであるが、対象とするペプチドのアミノ酸配列中１つ以上、すなわち１つ又は複数のアミノ酸、さらに好ましくは数個（例えば１から２０個、好ましくは１から１０個、より好ましくは１から５個、特に好ましくは１から３個）のアミノ酸が置換、欠失、付加していてもよいペプチドをも意味する。許容される変異の程度は、トロンボモジュリン活性を有すれば特に限定されないが、例えばアミノ酸配

列として５０％以上の相同性が例示され、７０％以上の相同性が好ましく、８０％以上の相同性がより好ましく、９０％以上の相同性がさらに好ましく、９５％以上の相同性が特に好ましく、９８％以上の相同性が最も好ましい。

[0052] さらに、可溶性トロンボモジュリンとしては、特開昭６４－６２１９号公報における配列番号１４の配列（４６２アミノ酸残基）からなるペプチド、配列番号８の配列（２７２アミノ酸残基）からなるペプチド、又は配列番号６の配列（２３６アミノ酸残基）からなるペプチドも好ましい例として挙げられる。

[0053] 可溶性トロンボモジュリンとしては配列番号１又は配列番号３の第１９～１３２位のアミノ酸配列及び配列番号９もしくは配列番号１１の第１９～２４４位の配列、又はそれらの相同変異配列を少なくとも有し、少なくとも可溶性トロンボモジュリン全体としてトロンボモジュリン活性を有しているペプチドであれば特に限定されないが、その中でも配列番号５又は配列番号７の第１９～４８０位のアミノ酸配列を少なくとも有しているペプチドであることが好ましく、配列番号９もしくは配列番号１１の第１９～５１５位のアミノ酸配列を少なくとも有しているペプチドであることがより好ましい。配列番号９もしくは配列番号１１の第１９～５１５位のアミノ酸配列を少なくとも有しているペプチドとしては、配列番号９もしくは配列番号１１のそれぞれにおける第１９～５１６位、第１９～５１５位、第１９～５１４位、第１７～５１６位、第１７～５１５位、もしくは第１７～５１４位の配列からなるペプチドがより好ましい例として挙げられる。また、配列番号９もしくは配列番号１１のそれぞれにおける第１９～５１６位、第１９～５１５位、第１９～５１４位、第１７～５１６位、第１７～５１５位、もしくは第１７～５１４位の配列からなるペプチドの、配列番号９もしくは配列番号１１それぞれについての混合物もより好ましい例として挙げられる。

[0054] 上記混合物の場合、配列番号９もしくは配列番号１１のそれぞれにおける第１７位から始まるペプチドと第１９位から始まるペプチドの混合割合とし

ては、（３０：７０）～（５０：５０）が例示され、（３５：６５）～（４５：５５）が好ましい例として挙げられる。

また、配列番号９もしくは配列番号１１のそれぞれにおける第５１４位、第５１５位、及び第５１６位で終わるペプチドの混合割合としては、（０：０：１００）～（０：９０：１０）が例示され、場合によっては、（０：７０：３０）～（１０：９０：０）、（１０：０：９０）～（２０：１０：７０）が例示される。

これらペプチドの混合割合は、通常の方法により求めることができる。

[0055] なお、配列番号１の第１９～１３２位の配列は、配列番号９の第３６７～４８０位の配列に相当し、配列番号５の第１９～４８０位の配列は、配列番号９の第１９～４８０位の配列に相当する。

[0056] また、配列番号３の第１９～１３２位の配列は、配列番号１１の第３６７～４８０位の配列に相当し、配列番号７の第１９～４８０位の配列は、配列番号１１の第１９～４８０位の配列に相当する。

さらに、配列番号１、３、５、７、９、及び１１のそれぞれにおける第１～１８位の配列は、全て同一の配列である。

[0057] これら可溶性トロンボモジュリンは、後述の通り例えばこれらのペプチドをコードするＤＮＡ（具体的には、配列番号１０の第１～７３２位の塩基配列及び配列番号２の第５５～３９６位の塩基配列を有する塩基配列、配列番号１０の第１～７３２位の塩基配列及び配列番号４の第５５～３９６位の塩基配列を有する塩基配列、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、又は配列番号１２等の塩基配列）をベクターにより宿主細胞にトランスフェクトして調製された形質転換細胞より取得することができる。

[0058] さらに、これらのペプチドは、前記のアミノ酸配列を有していればよく、糖鎖が付いていても、又付いていなくともよく、この点は特に限定されるものではない。また遺伝子操作においては、使用する宿主細胞の種類により、糖鎖の種類や、付加位置や付加の程度は相違するものであり、いずれも用いることができる。糖鎖の結合位置及び種類については、特開平１１－３４１

９９０号公報に記載の事実が知られており、本実施の形態におけるトロンボモジュリンについても同様の位置に同様の糖鎖が付加する場合がある。本実施の形態の可溶性トロンボモジュリンにはフコシルバイアンテナリー型とフコシルトリアンテナリー型の２種類のＮ結合型糖鎖が結合し、その比率は（１００：０）～（６０：４０）が例示され、（９５：５）～（６０：４０）が好ましく、（９０：１０）～（７０：３０）がより好ましい例として挙げられる。これらの糖鎖の比率は、生物化学実験法２３　糖蛋白質糖鎖研究法、学会出版センター（１９９０年）などに記載の２次元糖鎖マップによって測定できる。さらに、本実施の形態の可溶性トロンボモジュリンの糖組成を調べると、中性糖、アミノ糖及びシアル酸が検出され、たん白質含量に対し、それぞれ独立に重量比で１～３０%の比率が例示され、２～２０%が好ましく、５～１０%がより好ましい。これら糖含量は、新生化学実験講座３糖質Ｉ糖タンパク質（上）、東京化学同人（１９９０年）に記載の方法（中性糖：フェノールー硫酸法、アミノ糖：エルソンーモルガン法、シアル酸：過ヨウ素酸ーレゾルシノール法）によって測定できる。

[0059] 遺伝子操作により可溶性トロンボモジュリンを取得する場合には、発現に際して用いることができるシグナル配列としては、上述の配列番号９の第１～１８位のアミノ酸配列をコードする塩基配列、配列番号９の第１～１６位のアミノ酸配列をコードする塩基配列、その他公知のシグナル配列、例えば、ヒト組織型プラスミノゲンアクチベーターのシグナル配列を利用することができる（国際公開８８／９８１１号公報）。

[0060] 可溶性トロンボモジュリンをコードするＤＮＡ配列を宿主細胞へ導入する場合には、好ましくは可溶性トロンボモジュリンをコードするＤＮＡ配列を、ベクター、特に好ましくは、動物細胞において発現可能な発現ベクターに組み込んで導入する方法が挙げられる。発現ベクターとは、プロモーター配列、ｍＲＮＡにリボソーム結合部位を付与する配列、発現したい蛋白をコードするＤＮＡ配列、スプライシングシグナル、転写終結のターミネーター配列、複製起源配列などで構成されるＤＮＡ分子であり、好ましい動物細胞発

現ベクターの例としては、Ｒ．Ｃ．Ｍｕｌｌｉｇａｎら［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７８．２０７２（１９８１）］が報告しているｐＳＶ２－Ｘや、Ｐ．Ｍ．Ｈｏｗｌｅｙら［Ｍｅｔｈｏｄ ｉｎ Ｅｍｚｙｍｏｌｏｇｙ，１０１，３８７，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９８３）］が報告しているｐＢＰ６９Ｔ（６９－６）などが挙げられる。また、微生物において発現可能な発現ベクターに組み込む別の好ましい態様もある。

[0061] これらのペプチドを製造するに際して用いることのできる宿主細胞としては、動物細胞が挙げられる。

動物細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＣＯＳ－１細胞、ＣＯＳ－７細胞、ＶＥＲＯ（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－８１）細胞、ＢＨＫ細胞、イヌ腎由来ＭＤＣＫ細胞、ハムスターＡＶ-１２-６６４細胞、ＮＳ０細胞等が、またヒト由来細胞としてＨｅＬａ細胞、ＷＩ３８細胞、ヒト２９３細胞、ＰＥＲ．Ｃ６細胞が挙げられる。ＣＨＯ細胞が極めて一般的であり好ましく、ＣＨＯ細胞においては、ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）欠損ＣＨＯ細胞がさらに好ましい。

[0062] また、遺伝子操作の過程やペプチドの製造過程において、大腸菌等の微生物も多く使われ、それぞれに適した宿主－ベクター系を使用することが好ましく、上述の宿主細胞においても、適宜のベクター系を選択することができる。遺伝子組換え技術に用いるトロンボモジュリンの遺伝子は、クローニングされており、そしてトロンボモジュリンの遺伝子組換え技術を用いた製造例が開示されており、さらにはその精製品を得るための精製方法も知られている［特開昭６４－６２１９号公報、特開平２－２５５６９９号公報、特開平５－２１３９９８号公報、特開平５－３１０７８７号公報、特開平７－１５５１７６号公報、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６４：１０３５１－１０３５３（１９８９）］。したがって本実施の形態で用いる可溶性トロンボモジュリンは、上記の報告に記載されている方法を用いることにより、あるいはそれらに記載の方法に準じることにより製造することができる。例えば特

開昭６４－６２１９号公報では、全長のトロンボモジュリンをコードするＤＮＡを含むプラスミドｐＳＶ２トロンボモジュリンＪ２を含む、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｋ－１２ ｓｔｒａｉｎ ＤＨ５（ＡＴＣＣ寄託番号６７２８３号）が開示されている。また、この菌株を生命研（現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター）に再寄託した菌株（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＤＨ５／ｐＳＶ２ＴＭ Ｊ２）（ＦＥＲＭ ＢＰ－５５７０）を用いることもできる。この全長のトロンボモジュリンをコードするＤＮＡを原料として、公知の遺伝子操作技術によって、本実施の形態のトロンボモジュリンを調製することができる。

[0063] 可溶性トロンボモジュリンは、従来公知の方法又はそれに準じて調製すればよいが、例えば、前記山本らの方法［特開昭６４－６２１９号公報］、又は特開平５－２１３９９８号公報を参考にすることができる。すなわちヒト由来の可溶性トロンボモジュリン遺伝子を遺伝子操作技術により、例えば、配列番号９のアミノ酸配列をコードするＤＮＡとなし、さらに必要に応じた改変を行うことも可能である。この改変としては、例えば、配列番号１１のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ（具体的には、配列番号１２の塩基配列よりなる）となすために、配列番号９のアミノ酸配列の第４７３位のアミノ酸をコードするコドン（特に、第１４１８位の塩基）に、メソッド イン エンザイモロジー［Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１００：４６８（１９８３年），アカデミックプレス（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ）］に記載の方法に従って、部位特異的変異を行う。例えば、配列番号１０の第１４１８位の塩基Ｔは、配列番号１３に示された塩基配列を有する変異用合成ＤＮＡを用いて塩基Ｃに変換したＤＮＡとなすことができる。

[0064] このようにして調製したＤＮＡを、例えばチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞に組み込んで、形質転換細胞とし、適宜選択し、この細胞を培養して得た培養液から、公知の方法により精製された可溶性トロンボモジュリンが製造できる。前述の通り配列番号９のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ（配列番号１０）を前記宿主細胞にトランスフェクトすることが好ましい

。

[0065] 上記の形質転換細胞を培養するにあたっては、通常の細胞培養に用いられる培地を使用することが可能であり、その形質転換細胞を各種の培地にて事前に培養して、最適の培地を選択することが好ましい。例えば、ＭＥＭ培地、ＤＭＥＭ培地、１９９培地などの公知の培地を基本培地とし、さらに改良あるいは各種培地用のサプリメントを添加した培地を使用すればよい。培養方法としては、血清を添加した培地で培養する血清培養、又は血清を添加しない培地で培養する無血清培養が挙げられる。培養方法は特に限定されることはないが、無血清培養が好ましい。

[0066] 血清培養において、培地に血清を添加する場合はウシ血清が好ましい。ウシ血清には、ウシ胎児血清、新生仔ウシ血清、仔ウシ血清、成牛血清などがあるが、細胞培養に適したものであれば、どれを使用してもよい。一方、無血清培養において、使用する無血清培地は、市販の培地を使用することが可能である。各種細胞に適した無血清培地が市販されており、例えばＣＨＯ細胞に対しては、インビトロジェン社からＣＤ－ＣＨＯ、ＣＨＯ－Ｓ－ＳＦＭＩＩ、ＣＨＯ－ＩＩＩ－ＰＦＭが、アーバイン　サイエンティフィック社からＩＳ　ＣＨＯ、ＩＳ　ＣＨＯ－ＣＤ培地などが販売されている。これらの培地をそのまま、改良あるいはサプリメントを添加して使用してもよい。さらに、無血清培地としては、インスリン、トランスフェリン、及び亜セレン酸をそれぞれ５ｍｇ／Ｌとなるように添加したＤＭＥＭ培地が例示される。このように、本実施の形態のトロンボモジュリンを産生できる培地であれば、特に限定されない。培養方法は特に限定されず、バッチ培養、繰り返しバッチ培養、フェドバッチ培養、灌流培養等どのような培養法でもよい。

[0067] 上記細胞培養方法により可溶性トロンボモジュリンを製造する場合、タンパク質の翻訳後修飾により、Ｎ末端アミノ酸に多様性が認められる場合がある。例えば、配列番号９における第１７位、１８位、１９位、もしくは２２位のアミノ酸がＮ末端となる場合がある。また、例えば第２２位のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換されるように、Ｎ末端アミノ酸が修飾される

場合もある。第１７位又は１９位のアミノ酸がＮ末端となることが好ましく、第１９位のアミノ酸がＮ末端となることがより好ましい。また、第１７位のアミノ酸がＮ末端となることが好ましい別の態様もある。以上の修飾や多様性等については配列番号１１についても同様な例が挙げられる。

[0068] さらに、配列番号１０の塩基配列を有するＤＮＡを用いて可溶性トロンボモジュリンを製造する場合、Ｃ末端アミノ酸の多様性が認められることがあり、１アミノ酸残基短いペプチドが製造される場合がある。すなわち、第５１５位のアミノ酸がＣ末端となり、さらに該第５１５位がアミド化されるといったように、Ｃ末端アミノ酸が修飾される場合がある。また、２アミノ酸残基短いペプチドが製造される場合もある。すなわち、第５１４位のアミノ酸がＣ末端となる場合がある。したがって、Ｎ末端アミノ酸とＣ末端アミノ酸が多様性に富んだペプチド、又はそれらの混合物が製造されることがある。第５１５位のアミノ酸又は第５１６位のアミノ酸がＣ末端となることが好ましく、第５１６位のアミノ酸がＣ末端となることがより好ましい。また、第５１４位のアミノ酸がＣ末端になることが好ましい別の態様もある。以上の修飾や多様性等については配列番号１２の塩基配列を有するＤＮＡについても同様である。

[0069] 上記方法で得られるトロンボモジュリンは、Ｎ末端及びＣ末端に多様性が認められるペプチドの混合物である場合がある。具体的は、配列番号９における第１９～５１６位、第１９～５１５位、第１９～５１４位、第１７～５１６位、第１７～５１５位、もしくは第１７～５１４位の配列からなるペプチドの混合物が挙げられる。

[0070] 本発明により、ＨＣＰの混入が低減された高純度可溶性トロンボモジュリンが提供される。

本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンとしては、可溶性トロンボモジュリン以外のたん白質を実質的に含まない高い純度の可溶性トロンボモジュリンが挙げられる。具体的には、例えば、ＨＣＰを実質的に含まない可溶性トロンボモジュリンが挙げられる。好ましくは、ＨＣＰ、マウスＩｇ

Ｇ、及びウシ血清たん白質を実質的に含まない可溶性トロンボモジュリンが挙げられる。

本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンはヒト由来のたん白質は含まない。

[0071] ＨＣＰの含量は、ＨＣＰを実質的に含まない状態であれば特に限定されないが、可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対してＨＣＰが１０ｎｇ未満の比率が好ましく、８ｎｇ未満の比率がより好ましく、７ｎｇ未満の比率がさらに好ましく、６ｎｇ未満の比率が特に好ましく、５ｎｇ未満の比率が特に好ましい。本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンは、可溶性トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡを宿主細胞にトランスフェクトして得られた形質転換細胞にて産生され、いかに精製されたとしても現実的には痕跡量程度のＨＣＰの混入があり得ると考えられる。ＨＣＰの含量が低ければ低い程好ましいが、例えばＨＣＰの含量の下限としては、可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対してＨＣＰ０．００１ｎｇの比率が例示される。

[0072] マウスＩｇＧの含量は、マウスＩｇＧを実質的に含まない状態であれば特に限定されないが、可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対してマウスＩｇＧが１０ｎｇ未満の比率が好ましく、２ｎｇ未満の比率がより好ましく、０．６ｎｇ未満の比率がさらに好ましい。

[0073] ウシ血清たん白質の含量は、ウシ血清たん白質を実質的に含まない状態であれば特に限定されないが、可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対してが１０ｎｇ未満の比率が好ましく、２ｎｇ未満の比率がより好ましく、０．６ｎｇ未満の比率がさらに好ましい。これらのたん白質濃度は、ＥＬＩＳＡ法によって測定することが好ましく、生化学実験法１１　エンザイムイムノアッセイ　東京化学同人（１９９２年）などを参考にして測定することができる。

[0074] また、本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンの、総たん白質中の可溶性トロンボモジュリン純度としては、ＨＰＬＣ法において、９９％以

上であることが好ましく、９９．５%以上であることがより好ましく、９９．７%以上であることがさらに好ましく、９９．９%以上の純度であることが特に好ましい。ＨＰＬＣ法におけるクロマトグラフィーは可溶性トロンボモジュリンの純度を測定できるものであれば限定はされないが、ゲルろ過液体クロマトグラフィー、イオン交換液体クロマトグラフィー及び逆相液体クロマトグラフィーなどが例示され、ゲルろ過液体クロマトグラフィーが好ましい。ゲルろ過液体クロマトグラフィーを用いる場合には、使用するカラムは可溶性トロンボモジュリンの分子量に合わせて選択すればよく、例えば、ＴＯＳＯＨ　ＴＳＫｇｅｌ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ（日本国、東ソー）を用いて、ｐＨ７．３のリン酸塩緩衝液で展開する方法が挙げられる。日本薬局方の液体クロマトグラフィー＜２．０１＞に従って試験を実施すればよい。

[0075] さらに本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンは、宿主由来のＤＮＡ成分については、可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対し２ｎｇ未満の比率であることが好ましく、０．２ｎｇ未満の比率がより好ましく、０．０２ｎｇ未満の比率がさらに好ましい。ＤＮＡ量の測定は、スレッシュホールドシステム（米国、モレキュラーデバイス）を使用すれば容易に測定することが可能である。

[0076] 本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンは、ＨＣＰの含量が該可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率であればその形態は特に限定されず、溶液又は粉末の形態で存在することができる。溶液の形態で存在することが好ましい。また、粉末の形態で存在することが好ましい別の態様もある。溶液の状態である場合の濃度としては、上限としては１００ｍｇ／ｍＬ以下であることが好ましく６０ｍｇ／ｍＬ以下であることがより好ましく、３０ｍｇ／ｍＬ以下であることがさらに好ましく、１５ｍｇ／ｍＬ以下であることが特に好ましく、下限としては、２ｍｇ／ｍＬ以上であることが好ましく、４ｍｇ／ｍＬ以上であることがより好ましく、６ｍｇ／ｍＬ以上であることがさらに好ましく、８ｍｇ／ｍＬ以上であることが特に好ましく、１０ｍｇ／ｍＬ以上であることが最も好ましい。また

、粉末の形態で存在する場合、凍結乾燥の形態が好ましい例として挙げられる。凍結乾燥体はＷＯ０３／０６１６８７に記載の方法を参考に取得することができる。

[0077] 本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンは、実質的にエンドドキシンを含まないものとして取得可能である。エンドトキシン含量としては、可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１エンドトキシンユニット（ＥＵ）未満でありことが好ましく、０．２ＥＵ未満であることがより好ましく、０．０４ＥＵ未満であることががさらに好ましい。エンドトキシン量は日本薬局方一般試験法のエンドトキシン試験法＜４．０１＞に従って測定することができる。また、本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンは、ＴＦＡ等生体に害となる物質を含まず、無菌に近い状態で取得されるため、医薬品の原料として使用することができる。

[0078] 本実施の形態のＨＣＰの混入が低減された高純度可溶性トロンボモジュリンは、可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロン及び／又はポリエーテルスルホンと接触させることにより取得することができるが、ナイロンを用いることが好ましい。また、ポリエーテルスルホンを用いることが好ましい別の態様もある。

[0079] 本実施の形態の可溶性トロンボモジュリンを含む溶液を接触させるナイロンとしては、脂肪族骨格を含むポリアミドが挙げられ、例えばナイロン６、ナイロン６６、ナイロン４６、又はナイロンＭＸＤ６が例示される。ＨＣＰを吸着するものであれば、その種類は限定されないが、ナイロン６が好ましい。ナイロンは、例えばザルトリウス社から販売されているＭｉｎｉｓａｒｔ　ＮＹとして入手可能である。ナイロンの形態については、膜状、不織布、ビーズ状等、溶液を接触させることが可能であれば特に限定はされないが、膜状に成型してろ過膜として使用することが好ましい。この場合のろ過膜の孔径は、ＨＣＰが通過できる大きさであれば限定されないが、０．０１～１０μｍが例示され、０．１～１μｍが好ましく、０．０１～０．０６μｍがより好ましい。ナイロンに接触させる可溶性トロンボモジュリンを含む溶

液の量は、事前に一部の溶液を少量のナイロンに接触させてＨＣＰの除去能を評価することにより容易に決めることができる。

[0080] 本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンの取得は、ＨＣＰを含む可溶性トロンボモジュリン含有溶液をナイロンに接触させた後の溶液中のＨＣＰ含量が、可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率となっていることを確認しながら行い、ＨＣＰ含量が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ以上となるところで取得をやめるか、又は使用中のナイロンを未使用のものに変更して高純度可溶性トロンボモジュリンの取得を再開すればよい。ＨＣＰ量とナイロンの量との関係を例示するとすれば、例えばナイロンがろ過膜である場合は、ＨＣＰ１ｍｇに対して膜面積が、上限としては５０m^2以下が例示され、５m^2以下が好ましく、０．５m^2以下がより好ましく、０．１m^2以下がさらに好ましく、下限としては０．０１m^2以上が好ましく、０．０２m^2以上がより好ましく、０．０３m^2以上がさらに好ましい。低減したいＨＣＰ量に応じて膜面積を設定することが重要である。

[0081] 本実施の形態の可溶性トロンボモジュリンを含む溶液を接触させるポリエーテルスルホンは、例えば、ザルトリウス社から販売されているＭｉｎｉｓａｒｔ　Ｈｉｇｈ－Ｆｌｏｗとして入手可能である。ポリエーテルスルホンの形態については、膜状、不織布、ビーズ状等、溶液を接触させることが可能であれば特に限定はされないが、膜状に成型してろ過膜として使用することが好ましい。この場合のろ過膜の孔径は、ＨＣＰが通過できる大きさであれば限定されないが、０．０１～１０μｍが例示され、０．１～１μｍが好ましく、０．０１～０．０６μｍがより好ましい。ポリエーテルスルホンに接触させる可溶性トロンボモジュリンを含む溶液の量は、事前に一部の溶液を少量のポリエーテルスルホンに接触させてＨＣＰの除去能を評価することにより容易に決めることができる。

[0082] 本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンの取得は、ＨＣＰを含む可溶性トロンボモジュリン含有溶液をポリエーテルスルホンに接触させた後

の溶液中のＨＣＰ含量が、可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率となっていることを確認しながら行い、ＨＣＰ含量が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ以上となるところで取得をやめるか、又は使用中のポリエーテルスルホンを未使用のものに変更して高純度可溶性トロンボモジュリンの取得を再開すればよい。ＨＣＰ量とポリエーテルスルホンの量との関係を例示するとすれば、例えばポリエーテルスルホンがろ過膜である場合はＨＣＰ１ｍｇに対して膜面積が、上限としては５０m^2以下が例示され、５m^2以下が好ましく、０．５m^2以下がより好ましく、下限としては０．０２m^2以上が好ましく、０．０３m^2以上がより好ましく、０．０５m^2以上がさらに好ましい。低減したいＨＣＰ量に応じて膜面積を設定することが重要である。

[0083] 本実施の形態のＨＣＰの混入が低減された高純度可溶性トロンボモジュリンの製造工程は、可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させる工程を含み、ＨＣＰ含量が該可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率となるようにすれば特に限定されないが、以下の製造工程が例示される。

可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させる工程を含む（ａ）～（ｇ）からなる製造工程。

（ａ）形質転換細胞を培養して培養液（生産液）を回収する工程、

（ｂ）生産液をろ過してろ過後生産液を得る工程、

（ｃ）ろ過後生産液を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供し、粗精製液を得る工程、

（ｄ）粗精製液を抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体を担持させたアフィニティーカラムクロマトグラフィーに供し、精製液１を得る工程、

（ｅ）精製液１を陽イオン交換カラムクロマトグラフィー工程に供し、精製液２を得る工程、

（ｆ）濃縮した精製液２をゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供し、その溶出液を濃縮して精製液３を得る工程、及び

（ｇ）精製液３をウイルス除去膜及び無菌ろ過膜で濾過する工程。

[0084] 上記製造工程において、可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させる工程は、（ｂ）～（ｇ）のいずれか、もしくは複数の工程に含まれてもよいが、（ｄ）～（ｇ）のいずれか、もしくは複数の工程に含まれることが好ましい。効率的にＨＣＰを除去するためには製造工程の最後の工程、すなわち（ｇ）の後にナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させる工程を加えることが非常に好ましい。

また、ウシ血清たん白質の混入を０とするために、（ａ）の形質転換細胞の培養が無血清培養であることがより好ましい。

[0085] さらに、本実施の形態のＨＣＰの混入が低減された高純度可溶性トロンボモジュリンの製造工程としては、以下に示す製造工程が挙げられる。

可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させる工程を含む（ａ）～（ｇ）からなる製造工程。

（ａ）形質転換細胞を培養して培養液（生産液）を回収する工程、

（ｂ）生産液をろ過してろ過後生産液を得る工程、

（ｃ）ろ過後生産液を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供し、粗精製液１を得る工程、

（ｄ）粗精製液１を疎水カラムクロマトグラフィーに供し、粗精製液２を得る工程、

（ｅ）粗精製液２を抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体を担持させたアフィニティーカラムクロマトグラフィーに供し、精製液１を得る工程、

（ｆ）濃縮した精製液１をゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供し、精製液２を得る工程、及び

（ｇ）精製液２を無菌ろ過膜で濾過する工程。

[0086] 上記製造工程において、可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させる工程は、（ｂ）～（ｇ）のいずれか、もしくは複数の工程に含まれてもよいが、（ｅ）～（ｇ）のいずれ

か、もしくは複数の工程に含まれることが好ましい。効率的にＨＣＰを除去するためには製造工程の最後の工程、すなわち（ｇ）の後にナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させる工程を加えることが好ましい場合もある。

また、ウシ血清たん白質の混入を０とするために、（ａ）の形質転換細胞の培養が無血清培養であることがより好ましい。

[0087] 本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンの取得は、ＨＣＰを含む可溶性トロンボモジュリン含有溶液をナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させた後の溶液中のＨＣＰ含量が、可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率となっていることを確認しながら行い、ＨＣＰ含量が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ以上となるところで取得をやめるか、又は使用中のナイロン及び／又はポリエーテルスルホンを未使用のものに変更して高純度可溶性トロンボモジュリンの取得を再開すればよい。また、上述した通り、本実施の形態のＨＣＰの混入が低減された高純度可溶性トロンボモジュリンの製造工程は、可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させる工程を含み、ＨＣＰ含量が該可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率となるようにすれば特に限定されない。つまり、ナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させる工程の後に精製工程が存在してもよく、結果としてＨＣＰの含有率が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率である高純度可溶性トロンボモジュリンを取得できればよい。

ナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させる工程の後に存在してもよい精製工程としては、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニティカラムクロマトグラフィー、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、又は疎水カラムクロマトグラフィー等のカラムクロマトグラフィー工程、膜濃縮工程、ウイルス除去、無菌ろ過等の膜ろ過工程、又はこれら２種以上の組み合わせが挙げられ、陽イオン交

換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、膜濃縮、ウイルス除去、無菌ろ過、又はこれらの２種以上の組み合わせが好ましい。ナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させる工程の後に、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、膜濃縮、ウイルス除去、及び無菌ろ過が存在することが好ましい場合がある。また、ナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させる工程の後に、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、膜濃縮、ウイルス除去、及び無菌ろ過の精製工程が、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、膜濃縮、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、膜濃縮、ウイルス除去、無菌ろ過の順番で存在することがより好ましい例として挙げられる。なお、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーとしては、ＳＰ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ、ＤＥＡＥ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ、Ｃａｐｔｏ Ｓ、Ｃａｐｔｏ ＤＥＡＥ（ＧＥヘルスケア社）、Ｓ ＨｙｐｅｒＣｅｌ（ポール社）、ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ ＧｉｇａＣａｐ Ｓ－６５０（東ソー社）が例示され、ＳＰ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗが好ましい。濃縮膜としては、ＭＩＣＲＯＺＡ ＵＦ（旭化成ケミカルズ社）、Ｋｖｉｃｋ Ｆｌｏｗ １０ＫＤ（ＧＥヘルスケア社）、Ｐｅｌｌｉｃｏｎ ２ （ミリポア社）が例示され、ＭＩＣＲＯＺＡ ＵＦが好ましい。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーとしては、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ－３００ ＨＲ、Ｓｕｐｅｒｏｓｅ １２ ｐｇ（ＧＥヘルスケア社）、ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ ＨＷ（東ソー）が例示され、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ－３００ ＨＲが好ましい。ウイルス除去膜としては、ＰＬＡＮＯＶＡ １５Ｎ（旭化成メディカル）、Ｂｉｒｅｓｏｌｖｅ ＮＦＰ（ミリポア社）、Ｕｌｔｉｐｏｒ ＶＦ（ポール社）が例示され、ＰＬＡＮＯＶＡ １５Ｎが好ましい。無菌ろ過膜としては、Ｍｉｌｌｉｐａｋ、Ｍｉｌｌｉｄｉｓｋ（ミリポア社）、Ｓｕｐｏｒｅ ＥＶＡ（ポール社）、Ｓａｒｔｏｐｏｒｅ ２（サルトリウス ステディム社）が例示され、Ｍｉｌｌｉｐａｋが好ましい。

[0088] このように、本実施の形態の可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させることにより取得される高純度可溶性トロンボモジュリンは、可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率であるＨＣＰを含有するものである。

[0089] 本実施の形態の可溶性トロンボモジュリン１Ｕは、プロテインＣの活性化を指標としたＡＰＣアッセイにて１分間に０．１μｍｏｌのｐ－ニトロアニリンを生じる量と定義され、Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ（２００２）３０、６９－７６に記載の方法に従って、以下の工程を含む方法にて測定される。

（ａ）可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液にヒトトロンビンを添加し、加温する工程、

（ｂ）ヒトプロテインＣを添加し、加温する工程、

（ｃ）ヘパリン－アンチトロンビンＩＩＩを添加し、加温する工程、

（ｄ）合成基質Ｓ－２３６６（ｐｙｒｏＧｌｕ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ－ｐＮＡ・ＨＣｌ）を添加し、加温する工程、

（ｅ）酢酸を添加し、基質切断反応を止める工程、

（ｆ）４０５ｎｍの吸光度を測定する工程、及び

（ｇ）以下の式に従って可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液の活性を測定する工程。

[数1]

$$\text{活性（U／mL）} = \frac{(A_{sample} - A_{blank}) \times V}{M \times T \times k \times V_2} \times \text{試料の希釈倍数}$$

A_{sample}：試料溶液の吸光度

A_{blank}：対照（水）の吸光度

Ｍ：ｐ－ニトロアニリンのモル吸光係数　９．６×１０$^{-3}$［１／μＭ］

V_1：吸光度測定時の液量　（Ｌ）

V_2：試料溶液の液量　（ｍＬ）

Ｔ：基質切断反応時間　（分）

ｋ：トロンボモジュリン１Ｕより生成した活性化プロテインＣが遊離させる

ｐ－ニトロアニリンのモル数　　０．１（μｍｏｌ／分／Ｕ）

[0090] 本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンはたん白質１ｍｇあたり３，０００Ｕの活性を有することが例示され、好ましくは４，０００Ｕ～９，０００Ｕ、より好ましくは５，０００Ｕ～８，０００Ｕ、さらに好ましくは６，０００Ｕ～７，０００Ｕである。たん白質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準品として、公知のたん白濃度測定法に従って測定することができる。例えば、ローリー法、ブラッドフォード法、ＢＣＡ法などが例示される。

[0091] 本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンのＨＣＰ含量は、少なくとも以下の工程を含む方法にて測定される。

（ａ）可溶性トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡを宿主細胞にトランスフェクトして得られた形質転換細胞、又はその宿主細胞のいずれかを無血清培養して得られる培養上清から宿主細胞由来たん白質を調製する工程、

（ｂ）上記（ａ）の該宿主細胞由来たん白質をウサギに感作して得られる抗血清から抗宿主細胞由来たん白質抗体を精製する工程、

（ｃ１）上記（ｂ）の該抗宿主細胞由来たん白質抗体を固相に吸着させる工程、

（ｃ２－１）該抗宿主細胞由来たん白質抗体を吸着させた該固相に、該宿主細胞由来たん白質の混入が疑われる可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液を接触させる工程、

（ｃ３）該固相にビオチン化した抗宿主細胞由来たん白質抗体を添加する工程、

（ｃ４）該固相にアビジン化したペルオキシダーゼ溶液を添加する工程、

（ｃ５）酵素基質溶液を添加し、発色させる工程、及び

（ｃ６）発色を停止し、その吸光度を測定する工程、

を含む測定系を構築する工程、

（ｄ）上記測定系にて該宿主細胞由来たん白質の混入が疑われる可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液の宿主細胞由来たん白質濃度を測定し、該可溶

性トロンボモジュリン含有被検溶液の宿主細胞由来たん白質濃度が、上記測定系にて濃度が既知の宿主細胞由来たん白質含有溶液を用いて測定することにより予め確認した上記測定系における定量可能範囲におさまるか否かを判断する工程、

（ｅ－１）上記（ｄ）において、該宿主細胞由来たん白質の混入が疑われる可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液中の宿主細胞由来たん白質濃度が定量可能範囲におさまる場合、該濃度を該宿主細胞由来たん白質濃度とする工程、

（ｅ－２－１）上記（ｄ）において、該宿主細胞由来たん白質の混入が疑われる可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液中の宿主細胞由来たん白質濃度が定量可能範囲におさまらない場合、上記測定系における定量可能範囲におさまる測定可能な濃度とするために必要に応じて可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液を濃縮又は希釈し、その濃縮率又は希釈率を記録する工程、

（ｅ－２－２）上記（ｅ－２－１）において濃縮又は希釈した可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液中の宿主細胞由来たん白質濃度を、上記（ｃ１）～（ｃ６）で示される測定系のうち（ｃ２－１）を以下に示す（ｃ２－２）に置き換えた測定系にて測定し、濃縮率又は希釈率を考慮して該宿主細胞由来たん白質濃度を求める工程、

（ｃ２－２）該抗宿主細胞由来たん白質抗体を吸着させた該固相に、必要に応じて濃縮又は希釈した可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液を接触させる工程、及び該抗宿主細胞由来たん白質抗体を吸着させた該固相に濃度が既知の宿主細胞由来たん白質含有溶液を接触させる工程、及び

（ｆ）別途測定した可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液単位体積あたりのトロンボモジュリンのＡＰＣ活性に対する、（ｅ－１）又は（ｅ－２－２）で求めた宿主細胞由来たん白質濃度の割合を算出する工程。

[0092] 本明細書において、ＨＣＰは可溶性トロンボモジュリンを産生する遺伝子組換え細胞を作製する際に用いた宿主細胞由来のたん白質であって、可溶性トロンボモジュリンは含まれない。ＨＣＰはトロンボモジュリンをコードす

る塩基配列を包含するＤＮＡのトランスフェクトにて使用するものと同種の宿主細胞を培養して得られた培養上清より調製することができる。同種の宿主細胞とは、例えばＣＨＯ細胞の場合、ＣＨＯ－Ｋ１株（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－６１）、ＣＨＯ－Ｓ株（米国、インビトロジェン　カタログ番号１１６１９－０１２）、ＣＨＯ－ＤＸＢ１１、ＣＨＯ－ＤＧ４４株（米国、インビトロジェン　カタログ番号１２６１０－０１０）等、ＣＨＯ細胞に分類される株を含む概念を示し、ＣＨＯ細胞に分類されるものであればどの株を用いて調製してもよい。ＣＨＯ細胞に関して言えば、同種の宿主細胞としてはＤＸＢ１１株又はＣＨＯ－Ｋ１株を用いることが好ましく、ＤＸＢ１１株を用いることがより好ましい。また、ＣＨＯ－Ｋ１株を用いることが好ましい別の態様もある。

ＨＣＰは、可溶性トロンボモジュリンを産生する遺伝子組換え細胞を作製する際に用いた宿主細胞由来のたん白質であり、少なくとも上記（ａ）～（ｆ）の工程を含む方法にて測定されるものとして定義されるが、ＨＣＰの構成要素としては、試験例６に示すようにヒストンＨ２Ｂ（Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ，　６１（１），　６１－６９（１９７９））が挙げられる。

[0093] また、トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡを同種の宿主細胞にトランスフェクトして得られる形質転換細胞を培養して得られた培養上清から調製する場合は、その培養上清をトロンボモジュリンに特異的に結合する抗体をリガンドとした抗体カラムに供し、非吸着画分を回収すればよい。この非吸着画分はトロンボモジュリンのＡＰＣ活性が検出されないことを確認した後、ＨＣＰとして使用できる。ＨＣＰは必要に応じて限外ろ過膜にて濃縮することが好ましい。なお、宿主細胞又は形質転換細胞を培養する際に使用する培地は、他のたん白質の混入を避けるために、無血清培地であることが好ましく、無血清培地が無たん白質培地であることがより好ましい。ＨＣＰをウサギに感作して得たられた抗ＨＣＰ抗血清からの抗ＨＣＰ抗体精製は、カラムクロマトグラフィーを利用すれば良く、さらに硫安塩析法及びカラムクロマトグラフィーの組み合わせが例示される。抗ＨＣＰ抗

体精製におけるカラムクロマトグラフィーはプロテインＡカラムを使用することが好ましい。ＨＣＰの調製に際し、トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡを宿主細胞にトランスフェクトして得られる形質転換細胞を使用する場合は、抗ＨＣＰ抗体精製の際には、プロテインＡカラムにて精製した後にトロンボモジュリンカラムを使用し、その非吸着画分を取得して抗ＨＣＰ抗体とすることが好ましい別の態様もある。

ＨＣＰ濃度測定系を構築する際には、その定量可能範囲を明確にする必要があり、トロンボモジュリン１０，０００Ｕ当たりのＨＣＰ含量が１０ｎｇ未満であることが測定できるのであれば、定量可能範囲は限定されないが、低い濃度まで測定できるほどよい。定量可能範囲としては、下限として１００ｎｇ／ｍＬ以上が例示され、５０ｎｇ／ｍＬ以上が好ましく、２５ｎｇ／ｍＬ以上がより好ましく、上限として５００ｎｇ／ｍＬが例示される。

[0094] 被験溶液を濃縮する場合は、通常のたん白質濃縮法に従えばよく特に限定はされないが、限外ろ過膜による濃縮が好ましい。また、凍結乾燥した後に少量の水や緩衝液で溶解することにより濃縮する方法が好ましい別の態様もある。なお、濃縮することにより、ＨＣＰ以外の成分も濃縮され、それがＨＣＰ測定系に影響を及ぼす可能性があるため、被検溶液はＨＣＰ測定系に影響を与えない範囲内で濃縮する必要がある。例えば、ＨＣＰ測定系に影響を与えない可溶性トロンボモジュリン含有被検溶液濃度の範囲の上限として５ｍｇ／ｍＬが挙げられる。

トロンボモジュリン１０，０００Ｕ当たりのＨＣＰ含量は、以下の式に従って算出される。

ａ／ｂ×１０，０００

ａ：試料１ｍＬ当たりのＨＣＰ含量（ｎｇ／ｍＬ）

ｂ：試料１ｍＬ当たりのトロンボモジュリンのＡＰＣ活性（Ｕ／ｍＬ）

[0095] 本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンは、このトロンビンによるプロテインＣの活性化を促進して抗血液凝固作用と血栓溶解作用を示す活性型プロテインＣを大量に産生させるものである。従って、本実施の形態の

高純度可溶性トロンボモジュリンは生体における抗血液凝固及び血栓溶解に大きく寄与するものである。本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンは抗血液凝固作用と血小板凝集抑制作用及び血栓溶解作用を有するので、血液凝固を制御するための、又は血小板凝集を制御するための医薬組成物として用いることが可能であり、具体的には、例えば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内血液凝固症候群（ＤＩＣ）、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症等の疾患の治療及び予防に用いることができる。

[0096] 本実施の形態の医薬組成物を調製するに際しては、本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンと、薬学上許容される担体とを混合すればよい。即ち、上記の疾患を治療又は予防するのに有効な量の本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンを適当な量の担体と混ぜて、患者に効果的に投与するのに適した医薬組成物を調製することができる。本実施の形態の医薬組成物としては、凍結乾燥された製剤となすことが好ましい。また本実施の形態の医薬組成物は血管内注射用製剤として用いることが好ましい。さらには、点滴静注用製剤とすることが好ましい。なお、凍結乾燥製剤を製造するに際しては、ＷＯ０３／０６１６８７に記載の方法を参考に行うことができる。

[0097] 注射剤として用いる場合に、上記の担体は、薬剤として投与可能であり、かつ生理食塩水又はブドウ糖注射液に溶解し得る担体であることが好ましく、この担体としては、ショ糖、精製ゼラチン、アルブミン、マンニトール、ブドウ糖及び塩化ナトリウムからなる群より選ばれた１種以上が例示され、また各種無機塩のｐＨ調整剤などを添加することも好ましい例として挙げられるが、その場合には本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンとの組み合わせにおいて、医薬組成物全体として可溶性であり、且つ綺麗に凍結乾燥が可能であって、好ましい。また本実施の形態においては、上記担体が、グリセリンであることもまた好ましい。上記の担体は、製剤を調製する際に添加することが好ましいが、用時に溶解された際において添加されること

も許されるものである。

[0098] 本実施の形態の高純度可溶性トロンボモジュリンの成人１回当たりの投与量は、年齢、性別、体重、症状等により異なるが、一般に約０．１～２００ｍｇであり、一日当たり一回又は必要に応じて数回、例えば血管内注射、好ましくは点滴静注により投与する方法が例示される。本実施の形態の医薬組成物についても、有効成分である可溶性トロンボモジュリン換算で０．１～２００ｍｇとなるよう一日当たり一回又は必要に応じて数回、例えば血管内注射、好ましくは点滴静注により投与すればよい。

実施例

[0099] 以下の実施例によって、本発明をより具体的に説明するが、本発明の範囲は何らこれらによって限定されるものではない。

[0100] （参考例１）トロンボモジュリンのＡＰＣ活性の測定方法

Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ（２００２）３０，６９－７６に従い、プロテインＣの活性化を指標としたトロンボモジュリンのＡＰＣ活性を測定する。２　０ｍＭ塩化カルシウム溶液７５μＬに０．０５％ポリソルベート２０を含むトリス・イミダゾール緩衝液で希釈した試料溶液２５μＬを添加し氷冷した後、４０Ｕ／ｍＬのヒトトロンビン（米国、シグマ）溶液２５μＬを添加撹拌し、３７℃で加温する。ヒトトロンビン溶液を添加してから１０分後に１２Ｕ／ｍＬのヒトプロテインＣ（米国、エンザイムリサーチ）溶液２５μＬを添加撹拌し、３７℃で加温する。ヒトプロテインＣ溶液を添加してから１０分後に、ヘパリン－アンチトロンビンＩＩＩ溶液１００μＬを添加撹拌し、３７℃で加温する。ヘパリン－アンチトロンビンＩＩＩ溶液を添加してから１０分後に、あらかじめ３７℃に加温した合成基質Ｓ－２３６６（スウェーデン国、クロモジェニックス）溶液２５０μＬを添加撹拌し、３７℃で加温する。基質溶液を添加してから１０分後に、５０％酢酸１．５ｍＬを添加攪拌し、水を対照として４０５ｎｍにおける吸光度を測定する。

[0101] トロンボモジュリンのＡＰＣ活性は以下の式に従って算出する。なお、トロンボモジュリン１Ｕは、１分間に０．１μｍｏｌのｐ－ニトロアニリンを

生じる量と定義する。

[数2]

$$\text{活性（U／mL）} = \frac{(A_{sample} - A_{blank}) \times V_1}{M \times T \times k \times V_2} \times \text{試料の希釈倍数}$$

A_{sample}：試料溶液の吸光度

A_{blank}：対照（水）の吸光度

M：ｐ－ニトロアニリンのモル吸光係数　９．６×１０$^{-3}$［１／μM］

V_1：吸光度測定時の液量　２．０×１０$^{-3}$（Ｌ）

V_2：試料溶液の液量　０．０２５（ｍＬ）

Ｔ：基質切断反応時間　１０（分）

ｋ：トロンボモジュリン１Ｕより生成した活性化プロテインＣが遊離させるｐ－ニトロアニリンのモル数　０．１（μｍｏｌ／分／Ｕ）

[0102] なお、試薬は以下のとおりである。

＜トリス・イミダゾール緩衝液＞

Ｂ液１００ｍＬにＡ液を加えｐＨ８．４に調整し、水で１０倍に希釈する。

Ａ液：２－アミノ－２－ヒドロキシメチル－１，３－プロパンジオール３．０３ｇ及びイミダゾール１．７０ｇを、１Ｍ塩酸５０ｍＬに溶解し、水を加えて１００ｍＬとし、塩化ナトリウム１１．７ｇを加えて溶解する。

Ｂ液：２－アミノ－２－ヒドロキシメチル－１，３－プロパンジオール４．０４ｇ、イミダゾール２．２７ｇ及び塩化ナトリウム１．９５ｇを水に溶解し１００ｍＬとし、塩化ナトリウム１１．７ｇ加えて溶解する。

＜２０ｍＭ塩化カルシウム溶液＞

６０ｍＭ塩化カルシウム溶液１ｍＬにトリス・イミダゾール緩衝液２ｍＬを加える。

＜ヘパリン－アンチトロンビンＩＩＩ溶液＞

２Ｕ／ｍＬのアンチトロンビンIII（日本国、三菱ウェルファーマ）溶液７．５μＬ、トリス・イミダゾール緩衝液４２．５μＬ及び３０Ｕ／ｍＬのヘ

パリン（日本国、持田製薬）溶液５０μＬを加えて振り混ぜる。用時調製し、使用直前まで氷冷する。

[0103] （参考例２）ＨＣＰ濃度の測定方法

トロンボモジュリン遺伝子を導入した遺伝子組換えＣＨＯ細胞を無血清培養する。培養上清を抗トロンボモジュリン抗体カラムに供し非吸着画分を得る。この非吸着画分について参考例１に従ってトロンボモジュリンのＡＰＣ活性を測定し、活性が検出されないことを確認した後、限外ろ過膜にて濃縮したものをＨＣＰとする。ＨＣＰを抗原としてウサギに感作して得た抗ＨＣＰ抗血清を硫安塩析及びプロテインＡカラムにより精製した後、トロンボモジュリンをリガンドとしたアフィニティカラムに供し非吸着画分を得る。このようにしてトロンボモジュリンを認識しないウサギ抗ＨＣＰ抗体を得る。

[0104] 予想されるＨＣＰ濃度が０～５００ｎｇ／ｍＬとなるように０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで希釈し、試料溶液とする。なお、試料溶液のＨＣＰ濃度が低い場合は、限外ろ過膜等を使用して適切な濃度まで濃縮する。別にＨＣＰに０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳを加えて、その１ｍＬ中に５００、４００、３００、２００、１００、５０、２５、及び０ｎｇを含む８種類の液を調製し、標準溶液とする。

[0105] ポリスチレン製９６穴プレートに、炭酸ナトリウム緩衝液で希釈した２５μｇ／ｍＬのウサギ抗ＨＣＰ抗体溶液を１穴当たり１００μＬずつ加えた後、２５℃で約２時間静置する。次いで２５０μＬの０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで各穴を５回洗浄し、１%ゼラチンを含むＰＢＳを２００μＬずつ加え、２５℃で約１時間静置する。２５０μＬの０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで各穴を５回洗浄した後、１００μＬの試料溶液及び標準溶液をそれぞれの穴に加え、２５℃で約１６時間静置する。次いで２５０μＬの０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで各穴を５回洗浄した後、ビオチン化したウサギ抗ＨＣＰ抗体溶液を１００μＬずつ加え、２５℃で約２時間静置する。２５０μＬの０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで各穴を５回洗浄した後、アビジンーペルオキシダーゼ溶液を１

００μＬずつ加え、２５℃で約２時間静置する。２５０μＬの０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで各穴を５回洗浄した後、酵素基質溶液を１００μＬずつ加え、室温暗所に静置する。適度に発色したら、２５%硫酸を５０μＬずつ加えて反応を停止させ、９６穴プレート用吸光度計（日本国、テカンジャパン）で４９２ｎｍの吸光度を測定する。標準溶液による検量線から、試料１ｍＬ中のＨＣＰ含量を求める。なお、本測定法の定量限界の一例は、２５ｎｇ／ｍＬである。必要に応じて次の式に従ってトロンボモジュリン１０，０００Ｕ当たりのＨＣＰ含量を算出する。

[0106] トロンボモジュリン１０，０００Ｕ当たりのＨＣＰ含量（ｎｇ／１０，０００Ｕ）

＝ａ／ｂ×１０，０００

ａ：試料１ｍＬ当たりのＨＣＰ含量（ｎｇ／ｍＬ）

ｂ：試料１ｍＬ当たりのトロンボモジュリンのＡＰＣ活性（Ｕ／ｍＬ）

[0107] なお、試薬は以下のとおりである。

＜炭酸ナトリウム緩衝液＞

無水炭酸ナトリウム０．１６ｇ 及び炭酸水素ナトリウム ０．２９ｇ に水を加えて溶解し １００ｍＬとする。

＜アビジン－ペルオキシダーゼ溶液＞

アビジンＤを結合した西洋わさびペルオキシダーゼ原液（米国、ベクターラボラトリーズ）を、０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで約３０，０００倍に希釈する。

＜酵素基質溶液＞

オルトーフェニレンジアミン二塩酸塩１０ｍｇをクエン酸・リン酸塩緩衝液（クエン酸一水和物２．５６ｇ及びリン酸水素二ナトリウム十二水和物９．１２ｇを水に溶解し５００ｍＬとする）２０ｍＬに加えて溶解し、使用する直前に過酸化水素水１０μＬを加える。

[0108] （参考例３）マウスＩｇＧ濃度の測定方法

マウスＩｇＧを抗原としてウサギに感作して得た抗マウスＩｇＧ抗血清を

硫安塩析及びプロテインＡカラムにより精製し、ウサギ抗マウスＩｇＧ抗体を得る。

予想されるマウスＩｇＧ濃度が０～２５ｎｇ／ｍＬとなるように０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで希釈し、試料溶液とする。なお、試料溶液のＩｇＧ濃度が低い場合は、限外ろ過膜等を使用して適切な濃度まで濃縮する。別にマウスＩｇＧに０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳを加えて、その１ｍＬ中に２５、２０、１５、１０、５、２．５、１．２５、０．６３及び０ｎｇを含む９種類の液を調製し、標準溶液とする。

[0109] ポリスチレン製９６穴プレートに、炭酸ナトリウム緩衝液で希釈した１．５μｇ／ｍＬのウサギ抗マウスＩｇＧ抗体溶液を１穴当たり１００μＬずつ加えた後、２５℃で約２時間静置する。次いで２５０μＬの０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで各穴を５回洗浄し、１%ゼラチンを含むＰＢＳを２００μＬずつ加え、２５℃で約１時間静置する。２５０μＬの０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで各穴を５回洗浄した後、１００μＬの試料溶液及び標準溶液をそれぞれの穴に加え、２５℃で約１６時間静置する。次いで２５０μＬの０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで各穴を５回洗浄した後、ビオチン化したウサギ抗マウスＩｇＧ抗体溶液を１００μＬずつ加え、２５℃で約２時間静置する。２５０μＬの０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで各穴を５回洗浄した後、アビジン－ペルオキシダーゼ溶液を１００μＬずつ加え、２５℃で約２時間静置する。２５０μＬの０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで各穴を５回洗浄した後、酵素基質溶液を１００μＬずつ加え、室温暗所に静置する。適度に発色したら、２５%硫酸を５０μＬずつ加えて反応を停止させ、９６穴プレート用吸光度計（日本国、テカンジャパン）で４９２ｎｍの吸光度を測定する。標準溶液による検量線から、試料１ｍＬ中のマウスＩｇＧ含量を求める。本測定法の定量限界の一例は、０．６３ｎｇ／ｍＬである。必要に応じて次の式に従ってトロンボモジュリン１０，０００Ｕ当たりのマウスＩｇＧ含量を算出する。

[0110] トロンボモジュリン１０，０００Ｕ当たりのマウスＩｇＧ含量（ｎｇ／１０，０００Ｕ）

＝ａ／ｂ×１０，０００

ａ：試料１ｍＬ当たりのマウスＩｇＧ含量（ｎｇ／ｍＬ）

ｂ：試料１ｍＬ当たりのトロンボモジュリンのＡＰＣ活性（Ｕ／ｍＬ）

[0111] なお、試薬は以下のとおりである。

＜炭酸ナトリウム緩衝液＞

無水炭酸ナトリウム０．１６ｇ 及び炭酸水素ナトリウム ０．２９ｇ に水を加えて溶解し １００ｍＬとする。

＜アビジンーペルオキシダーゼ溶液＞

アビジンＤを結合した西洋わさびペルオキシダーゼ原液（米国、ベクターラボラトリーズ）を、０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで約３０，０００倍に希釈する。

＜酵素基質溶液＞

オルトーフェニレンジアミン二塩酸塩１０ｍｇをクエン酸・リン酸塩緩衝液（クエン酸一水和物２．５６ｇ及びリン酸水素二ナトリウム十二水和物９．１２ｇを水に溶解し５００ｍＬとする）２０ｍＬに加えて溶解し、使用する直前に過酸化水素水１０μＬを加える。

[0112] （参考例４）ウシ血清たん白質濃度の測定方法

ウシ血清を抗原としてウサギに感作して得た抗ウシ血清たん白質抗血清を硫安塩析及びプロテインＡカラムにより精製し、ウサギ抗ウシ血清たん白質抗体を得る。

予想されるウシ血清たん白質濃度が０～２５ｎｇ／ｍＬとなるように０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで希釈し、試料溶液とする。なお、試料溶液のウシ血清たん白質濃度が低い場合は、限外ろ過膜等を使用して適切な濃度まで濃縮する。別にウシ血清に０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳを加えて、その１ｍＬ中に２５、２０、１５、１０、５、２．５、１．２５及び０ｎｇを含む８種類の液を調製し、標準溶液とする。

[0113] ポリスチレン製９６穴プレートに、炭酸ナトリウム緩衝液で希釈した１０μｇ／ｍＬのウサギ抗ウシ血清たん白質抗体溶液を１穴当たり１００μＬずつ加えた後、２５℃で約２時間静置する。次いで２５０μＬの０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで各穴を５回洗浄し、１%ゼラチンを含むＰＢＳを２００μＬずつ加え、２５℃で約１時間静置する。２５０μＬの０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで各穴を５回洗浄した後、１００μＬの試料溶液及び標準溶液をそれぞれの穴に加え、２５℃で約１６時間静置する。次いで２５０μＬの０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで各穴を５回洗浄した後、ビオチン化したウサギ抗ウシ血清たん白質抗体溶液を１００μＬずつ加え、２５℃で約２時間静置する。２５０μＬの０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで各穴を５回洗浄した後、アビジン－ペルオキシダーゼ溶液を１００μＬずつ加え、２５℃で約２時間静置する。２５０μＬの０．０５%ポリソルベート８０を含むＰＢＳで各穴を５回洗浄した後、酵素基質溶液を１００μＬずつ加え、室温暗所に静置する。適度に発色したら、２５%硫酸を５０μＬずつ加えて反応を停止させ、９６穴プレート用吸光度計（日本国、テカンジャパン）で４９２ｎｍの吸光度を測定する。標準溶液による検量線から、試料１ｍＬ中のウシ血清たん白質含量を求める。本測定法の定量限界の一例は、１．２５ｎｇ／ｍＬである。必要に応じて次の式に従ってトロンボモジュリン１０，０００Ｕ当たりのウシ血清たん白質含量を算出する。

[0114] トロンボモジュリン１０，０００Ｕ当たりのウシ血清たん白質含量（ｎｇ／１０，０００Ｕ）

＝ａ／ｂ×１０，０００

ａ：試料１ｍＬ当たりのウシ血清たん白質含量（ｎｇ／ｍＬ）

ｂ：試料１ｍＬ当たりのトロンボモジュリンのＡＰＣ活性（Ｕ／ｍＬ）

[0115] なお、試薬は以下のとおりである。

＜炭酸ナトリウム緩衝液＞

無水炭酸ナトリウム０．１６ｇ 及び炭酸水素ナトリウム ０．２９ｇ に水

を加えて溶解し １００ｍＬとする。

＜アビジンーペルオキシダーゼ溶液＞

アビジンＤを結合した西洋わさびペルオキシダーゼ原液（米国、ベクターラボラトリーズ）を、０．０５％ポリソルベート８０を含むＰＢＳで約３０，０００倍に希釈する。

＜酵素基質溶液＞

オルトーフェニレンジアミン二塩酸塩１０ｍｇをクエン酸・リン酸塩緩衝液（クエン酸一水和物２．５６ｇ及びリン酸水素二ナトリウム十二水和物９．１２ｇを水に溶解し５００ｍＬとする）２０ｍＬに加えて溶解し、使用する直前に過酸化水素水１０μＬを加える。

[0116] （比較例１）可溶性トロンボモジュリンの製造１

特開平１１－３４１９９０号公報の実施例１に従って、配列番号９に記載のアミノ酸配列をコードするＤＮＡを遺伝子操作技術により組み込んだ遺伝子組換えＣＨＯ細胞を作製した後、１５０ｍｇ／ＬのＬ-プロリン（日本国、味の素）、６０ｍｇ／Ｌのカナマイシン硫酸塩（日本国、明治製菓）、１ｍｇ／Ｌの酒石酸タイロシン（日本国、メルシャン）、及び１０％ウシ血清（米国、ハイクロン）を含むＤＭＥＭ培地（米国、インビトロジェン）に播種し、CO_2インキュベーター内、３７℃で培養した。培養液を遠心分離して得られた細胞を１５０ｍｇ／ＬのＬ-プロリン（日本国、味の素）、６０ｍｇ／Ｌのカナマイシン硫酸塩（日本国、明治製菓）、１ｍｇ／Ｌの酒石酸タイロシン（日本国、メルシャン）、１０％ジメチルスルフォキシド（独国、メルク）、及び１０％ウシ血清（米国、ハイクロン）を含むＤＭＥＭ培地（米国、インビトロジェン）にけん濁した後、バイアルに分注し（４×１０^{7} ｃｅｌｌｓ／本）、液体窒素中に凍結保存した。

[0117] 特開平１１－３４１９９０号公報の成分表２に示された培地の$NaHCO_3$濃度を５，７００ｍｇ／Ｌに、ＮａＣｌ濃度を２，４１０ｍｇ／Ｌに改変したものを基本培地として細胞培養行った。増殖培地は基本培地に６０ｍｇ／Ｌのカナマイシン硫酸塩（米国、インビトロジェン）、１ｍｇ／Ｌの酒石酸

タイロシン（米国、シグマーアルドリッチ）、及び８％ウシ血清（米国、ハイクロン）を添加して用いた。また、生産培地は増殖培地の血清濃度を３％とした。

[0118] 細胞のバイアル１本を融解し、その細胞を１００ｍＬの増殖培地に播種し、CO_2インキュベーター内、スピナーフラスコを用いて３７℃で５日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を０．９Ｌの増殖培地に継代し、CO_2インキュベーター内、スピナーフラスコを用いて３７℃で５日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を９Ｌの増殖培地に継代し、培養槽を用いて３７℃、ｐＨ７．２、溶存酸素５０％で５日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を１２０Ｌの増殖培地に継代し、灌流培養槽を用いて３７℃、ｐＨ７．２、溶存酸素５０％で７日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、生産培地の添加と培養上清液の回収を連続的に行う灌流培養を開始した。培養条件は、３７℃、ｐＨ７．２、溶存酸素５０％、培地交換１３０～２００Ｌ／ｄａｙ、上面加圧０～０．２ＭＰａとした。生細胞密度が７．５×10^6 ｃｅｌｌｓ／ｍＬに達したから３６日間培養を継続し、培養上清液を生産液として回収した。回収した生産液はろ過フィルターのスープラディスクＩＩ（米国、ポール）、及びスーポアＥＢＶ（米国、ポール）を用いて澄明化し、ろ過後生産液として２～１０℃で保存した。

[0119] 約７００Ｌのろ過後生産液を、１５０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で平衡化したＱ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（米国、ＧＥヘルスケア）カラム（直径６３ｃｍ、高さ２５ｃｍ）に供した。次に６カラムボリューム（ＣＶ）の１８０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭ酢酸緩衝液（ｐＨ５．５）で洗浄し、更に２８０ｎｍの吸収がベースラインに戻るまで１８０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で洗浄を行ない、３００ｍＭ 塩化ナトリウムを

含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で溶出を開始し、溶出液の吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりからの０．５カラムボリューム容量の溶出液を粗精製液として取得した。同様の操作を６回繰り返し実施し、６ロットの粗精製液を取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１０９Ｌ／時で実施した。

[0120] 特開平１１－３４１９９０号公報の実施例１０に従って、ヒト肺由来トロンボモジュリンを抗原とした抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体を作製し、ＣＮＢｒ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ４Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（米国、ＧＥヘルスケア）と接触反応させ、抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体をカップリングし、抗トロンボモジュリンモノクローナル抗体結合Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ４Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗを作製し、カラムに充填してモノクローナル抗体カラムとした。約４０Ｌの粗精製液を、０．３Ｍ塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したモノクローナル抗体カラム（直径４４ｃｍ、高さ１３ｃｍ）に供した。６ＣＶの１．０Ｍ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を流し、更に３ＣＶの０．１Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ５．０）を流し洗浄し、０．３Ｍ 塩化ナトリウム含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．０）で溶出を開始した。溶出液の吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を得、溶出液に１／１０容量の０．５Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を添加して精製液１として取得した。同様の操作を６回繰り返し実施し、６ロットの精製液１を取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は４６Ｌ／時で実施した。

[0121] ６ロット分の精製液１約１７０Ｌを１．０Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ２．０）にてｐＨ３．５に調製し、０．３Ｍ ＮａＣｌを含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．５）で平衡化したＳＰ－ＳｅｐｈａｒｏｓｅＦＦ（米国 ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径４５ｃｍ、高さ１０ｃｍ）に供した。０．３Ｍ ＮａＣｌを含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．５）で洗浄を開始し、吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりから立ち下

がりまでの素通り画分を得、直ちに０．５Ｍりん酸緩衝液（ｐＨ７．３）でｐＨ７に中和し、精製液２として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１６０Ｌ／時で実施した。

[0122] 約２００Ｌの精製液２を限外ろ過膜のマイクローザＵＦモジュールＳＩＰ－２０１３（日本国、旭化成ケミカルズ）で約１０Ｌまで濃縮した後に、５０ｍＭ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したＳｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ－３００ ＨＲ（米国 ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径６３ｃｍ、高さ９４ｃｍ）に供した。２８０ｎｍにおける吸収がもっとも大きい溶出ピークを分取した後、限外ろ過膜のマイクローザＵＦモジュールＳＩＰ－１０１３（日本国、旭化成ケミカルズ）で約１２Ｌまで濃縮し、精製液３として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は６．２Ｌ／時で実施した。

[0123] 室温下で、精製液３を５０ｍＭ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したウイルス除去膜のＰＬＡＮＯＶＡ １５Ｎ（日本国、旭化成メディカル、膜面積１m^2）に圧力０．１ＭＰａ以下で通液後、さらに０．２２μｍのＰＶＤＦ製ろ過膜（米国、ミリポア）に通液し、全量を回収した。これを可溶性トロンボモジュリン精製品とした。

同様の操作により、３ロット（Ａ１、Ａ２、Ａ３）の精製品を取得した。

Ａ１、Ａ２、Ａ３のトロンボモジュリンのＡＰＣ活性は、それぞれ６９０００Ｕ／ｍＬ、６８０００Ｕ／ｍＬ、７２０００Ｕ／ｍＬであった。

Ａ１、Ａ２、Ａ３の溶液における可溶性トロンボモジュリン濃度は、それぞれ１０．５ｍｇ／ｍＬ、１０．２ｍｇ／ｍＬ、１０．３ｍｇ／ｍＬであった。

[0124] （比較例２）可溶性トロンボモジュリンの製造２

特開平１１－３４１９９０号公報の成分表２に示された培地を基本培地として使用した。増殖培地は基本培地に６０ｍｇ／Ｌのカナマイシン硫酸塩（米国、インビトロジェン）、１ｍｇ／Ｌの酒石酸タイロシン（日本国、塩野義製薬）、及び８％ウシ血清（米国、ハイクロン）を添加して用いた。また

、生産培地は増殖培地の血清濃度を４％とした。

[0125] 比較例１で作製した細胞のバイアル１本を融解し、その細胞を１００ｍＬの増殖培地に播種し、CO_2インキュベーター内、スピナーフラスコを用いて３７℃で３日間攪拌培養した。生細胞密度が５．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を４００ｍＬの増殖培地に継代し、CO_2インキュベーター内、スピナーフラスコを用いて３７℃で３日間攪拌培養した。生細胞密度が５．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を２Ｌの増殖培地に継代し、CO_2インキュベーター内、球形ボトルを用いて３７℃で３日間攪拌培養した。生細胞密度が５．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を７．５Ｌの増殖培地に継代し、CO_2インキュベーター内、球形ボトルを用いて３７℃で４日間攪拌培養した。生細胞密度が５．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、生産培地の添加と培養上清液の回収を連続的に行う灌流培養を開始した。培養条件は、３７℃、ｐＨ７．２、溶存酸素５０％、培地交換１０Ｌ／ｄａｙ、上面加圧０～０．２ＭＰａとした。生細胞密度が７．５×10^6 ｃｅｌｌｓ／ｍＬに達したから４０日間培養を継続し、培養上清液を生産液として回収した。

回収した生産液は、孔径０．７μｍ及び０．２２μｍのろ過フィルター（米国、ポール）を用いて澄明化し、ろ過後生産液として２～１０℃で保存した。

[0126] 約４００Ｌのろ過後生産液を、１５０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．４）で平衡化したＱ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（米国、ＧＥヘルスケア）カラム（直径４４ｃｍ、高さ２６ｃｍ）に供した。次に６ＣＶの１８０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭ酢酸緩衝液（ｐＨ５．５）で洗浄し、更に２８０ｎｍの吸収がベースラインに戻るまで１８０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．４）で洗浄を行ない、３００ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．４）で溶出を開始し、溶出液の吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりからの０．５カラムボリューム容量の溶出液を粗精製液として取

得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は４５Ｌ／時で実施した。

[0127] 約２０Ｌの粗精製液を、０．３Ｍ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したモノクローナル抗体カラム（直径４４ｃｍ、高さ１２ｃｍ）に供した。６ＣＶの１．０Ｍ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を流し、更に３ＣＶの０．１Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ５．０）を流し洗浄し、０．３Ｍ 塩化ナトリウム含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．０）で溶出を開始した。溶出液の吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を得、溶出液に１／１０容量の０．５Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を添加して精製液１として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は４５Ｌ／時で実施した。

[0128] 約１２Ｌの精製液１を１．０Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ２．０）にてｐＨ３．５に調製し、０．３Ｍ ＮａＣｌを含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．５）で平衡化したＳＰ－ＳｅｐｈａｒｏｓｅＦＦ（米国 ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径１４ｃｍ、高さ１３ｃｍ）に供した。０．３Ｍ ＮａＣｌを含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．５）で洗浄を開始し、吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの素通り画分を得、直ちに０．５Ｍりん酸緩衝液（ｐＨ７．３）でｐＨ７に中和し、精製液２として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１５Ｌ／時で実施した。

[0129] 約１６Ｌの精製液２を限外ろ過膜のマイクローザＵＦモジュールＳＩＰ－１０１３（日本国、旭化成ケミカルズ）で約１．２Ｌまで濃縮した後に５０ｍＭ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したＳｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ－３００ ＨＲ（米国 ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径２５ｃｍ、高さ８５ｃｍ）に供した。２８０ｎｍにおける吸収がもっとも大きい溶出ピークを分取した後、限外ろ過膜のマイクローザＵＦモジュールＳＩＰ－１０１３（日本国、旭化成ケミカルズ）で約０．８Ｌまで濃縮し、精製液３として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１Ｌ／時で実施した。

[0130] 室温下で、精製液３を５０ｍＭ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したウイルス除去膜のＰＬＡＮＯＶＡ １５Ｎ（日本国、旭化成メディカル、膜面積０．３m^2）に圧力０．１ＭＰａ以下で通液後、さらに０．２２μｍのＰＶＤＦ製ろ過膜（米国、ミリポア）に通液し、全量を回収した。これを可溶性トロンボモジュリン精製品とした（ロット：Ｂ１）。

Ｂ１のトロンボモジュリンのＡＰＣ活性は、７９０００Ｕ／ｍＬであった。

Ｂ１の溶液における可溶性トロンボモジュリン濃度は、１２．６ｍｇ／ｍＬであった。

[0131] （比較例３）可溶性トロンボモジュリンの製造３

ＤＭＥＭ培地（米国、インビトロジェン）を基本培地として使用した。増殖培地は基本培地に１５０ｍｇ／ＬのＬ-プロリン（日本国、味の素）、６０ｍｇ／Ｌのカナマイシン硫酸塩（日本国、明治製菓）、１ｍｇ／Ｌの酒石酸タイロシン（日本国、メルシャン）、及び１０％ウシ血清（米国、ハイクローン）を添加して用いた。また、生産培地は増殖培地の血清濃度を１～３％とした。

[0132] 比較例１で作製した細胞のバイアル１本を融解し、その細胞を１００ｍＬの増殖培地に播種し、CO_2インキュベーター内、スピナーフラスコを用いて３７℃で５日間攪拌培養した。培養液全量を４００ｍＬの増殖培地に継代し、CO_2インキュベーター内、スピナーフラスコを用いて３７℃で５日間攪拌培養した。培養液全量を１．６Ｌの増殖培地に継代し、エアーとCO_2を吹き込みながら球形ボトルを用いて３７℃で５日間攪拌培養した。培養液全量を６Ｌの増殖培地に継代し、エアー、CO_2及び酸素を吹き込みながら球形ボトルを用いて３７℃で５日間攪拌培養した。培養液全量を５６Ｌの増殖培地に継代し、エアー、CO_2及び酸素を吹き込みながら球形ボトルを用いて３７℃で４日間攪拌培養した。全量培地交換を行った後に３日間培養し、さらに全量培地交換した後、生細胞密度が1×10^6 ｃｅｌｌｓ／ｍＬに達してから生

産培地へと切り替えた。ＣＣ－１００連続遠心分離機（スウェーデン国、アルファーラバル）を用い、毎日生産液を回収し、新鮮培地へ交換した。生産培養は１００日間実施した。回収した生産液は、孔径０．７μｍ及び０．２２μｍのろ過フィルター（米国、ポール）を用いて澄明化し、ろ過後生産液として２～１０℃で保存した。

[0133] 約２４００Ｌのろ過後生産液を、１５０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．４）で平衡化したＱ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（米国、ＧＥヘルスケア）カラム（直径４４ｃｍ、高さ２５ｃｍ）に供した。次に６ＣＶの１８０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭ酢酸緩衝液（ｐＨ５．５）で洗浄し、更に２ＣＶの１８０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．４）で洗浄を行ない、３００ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．４）で溶出を開始し、溶出液の吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりから約１５Ｌの溶出液を粗精製液１として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は４５Ｌ／時で実施した。

[0134] 上記粗精製液１を、０．３Ｍ ＮａＣｌを含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）で平衡化したＢｕｔｙｌ－ＳｅｐｈａｒｏｓｅＦＦ（米国 ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径２５ｃｍ、高さ１０ｃｍ）に供した。０．３Ｍ ＮａＣｌを含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）で洗浄を開始し、吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの素通り画分を粗精製液２として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１３Ｌ／時で実施した。

[0135] 約２０Ｌの粗精製液を、０．３Ｍ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したモノクローナル抗体カラム（直径４４ｃｍ、高さ１８ｃｍ）に供した。６ＣＶの１．０Ｍ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を流し、更に３ＣＶの０．１Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ５．０）を流し洗浄し、０．３Ｍ 塩化ナトリウム含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．０）で溶出を開始した。溶出液の吸光度２８０ｎｍのピー

ク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を得、溶出液に１／１０容量の１Ｍグリシン－水酸化ナトリウム緩衝液（ｐＨ９．０）と１／２５容量の０．５Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を添加して精製液１として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は５０Ｌ／時で実施した。

[0136] 約１５Ｌの精製液１を限外ろ過膜のマイクローザＵＦモジュールＳＩＰ－１０１３（日本国、旭化成ケミカルズ）で約１Ｌまで濃縮した後に１５０ｍＭ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したＳｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ－３００ ＨＲ（米国 ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径２５ｃｍ、高さ８０ｃｍ）に供した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１Ｌ／時で実施した。２８０ｎｍにおける吸収がもっとも大きい溶出ピークを分取した後、０．２２μｍのＰＶＤＦ製ろ過膜（米国、ミリポア）に通液し、約３Ｌを回収した。これを可溶性トロンボモジュリン精製品とした（ロット：Ｂ２）。

Ｂ２のトロンボモジュリンのＡＰＣ活性は、２８０００Ｕ／ｍＬであった。

Ｂ２の溶液における可溶性トロンボモジュリン濃度は、３．８ｍｇ／ｍＬであった。

[0137] （比較例４）可溶性トロンボモジュリンの製造４

比較例１で凍結保存された細胞のバイアルを１本融解し、８ｍＭのＬ－グルタミン（米国、インビトロジェン）、５０μＭのヒポキサンチン（米国、インビトロジェン）、及び８μＭのチミジン（米国、インビトロジェン）を含む無血清培地ＩＳ ＣＨＯ－ＣＤ（米国、アーバイン サイエンティフィック）に播種し、CO_2インキュベーター内、３７℃で培養した。培養液を遠心分離して得られた細胞を８ｍＭのＬ－グルタミン（米国、インビトロジェン）、５０μＭのヒポキサンチン（米国、インビトロジェン）、８μＭのチミジン（米国、インビトロジェン）、及び１０％ジメチルスルフォキシド（米国、シグマーアルドリッチ）を含む無血清培地ＩＳ ＣＨＯ－ＣＤ（米国、アーバイン サイエンティフィック）にけん濁した後、バイアルに分注し（

２×１０^{7} ｃｅｌｌｓ／本）、液体窒素中に凍結保存した。

[0138] 増殖培地は１Ｌの水に対し、２０．７８ｇのＩＳ ＣＨＯ－ＣＤ－Ａ３（米国、アーバイン サイエンティフィック）、４．０６ｇの塩化ナトリウム（日本国、富田製薬）、及び２．２０ｇの炭酸水素ナトリウム（日本国、和光純薬工業）を溶解して作製した。また、生産培地は１Ｌの水に対し、２０．７８ｇのＩＳ ＣＨＯ－ＣＤ－Ａ３（米国、アーバイン サイエンティフィック）、２．６３ｇの塩化ナトリウム（日本国、富田製薬）、及び４．４０ｇの炭酸水素ナトリウム（日本国、和光純薬工業）を溶解して作製した。

[0139] 細胞のバイアル１本を融解し、その細胞を１００ｍＬの増殖培地に播種し、CO_2インキュベーター内、Ｔ－フラスコを用いて３６℃で５日間静置培養した。生細胞密度が７．０×１０^{5} ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液４０ｍＬを３６０ｍＬの増殖培地に継代し、CO_2インキュベーター内、スピナーフラスコを用いて３６℃で７日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×１０^{5} ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液８０ｍＬを７２０ｍＬの増殖培地に継代し、CO_2インキュベーター内、スピナーフラスコを用いて３６℃で６日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×１０^{5} ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を９．２Ｌの増殖培地に継代し、灌流培養槽を用いて３６℃、ｐＨ７．１、溶存酸素５０％で８日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×１０^{5} ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、生産培地の添加と培養上清液の回収を連続的に行う灌流培養を開始した。培養条件は、３６℃、ｐＨ７．１、溶存酸素５０％、培地交換１０Ｌ／ｄａｙ、上面加圧０～０．２ＭＰａとした。生細胞密度が７．５×１０^{6} ｃｅｌｌｓ／ｍＬに達したから２６日間培養を継続し、培養上清液を生産液として回収した。

[0140] 回収した生産液はろ過フィルターのスープラキャップ（米国、ポール）、及びスーポアＥＢＶ（米国、ポール）を用いて澄明化し、ろ過後生産液として２～１０℃で保存した。

約２５０Ｌのろ過後生産液を、１５０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で平衡化したＱ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａ

ｓｔ　Ｆｌｏｗ（米国、ＧＥヘルスケア）カラム（直径２５ｃｍ、高さ２５ｃｍ）に供した。次に６ＣＶの１８０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭ酢酸緩衝液（ｐＨ５．６）で洗浄し、更に４ＣＶの１８０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で洗浄を行ない、２９０ｍＭ塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で溶出を開始し、溶出液の吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりからの０．５カラムボリューム容量の溶出液を粗精製液として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１８Ｌ／時で実施した。

[0141] 約６Ｌの上記粗精製液を、０．３Ｍ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したモノクローナル抗体カラム（直径４４ｃｍ、高さ８ｃｍ）に供した。６ＣＶの１．０Ｍ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を流し、更に３ＣＶの０．１Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ５．０）を流し洗浄し、０．３Ｍ 塩化ナトリウム含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．０）で溶出を開始した。溶出液の吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を得、溶出液に１／１０容量の０．５Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を添加して精製液１として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は４６Ｌ／時で実施した。

[0142] 約１４Ｌの精製液１を１．０Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ２．０）にてｐＨ３．５に調製し、０．３Ｍ ＮａＣｌを含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．５）で平衡化したＳＰ－ＳｅｐｈａｒｏｓｅＦＦ（米国　ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径１４ｃｍ、高さ１３ｃｍ）に供した。０．３Ｍ ＮａＣｌを含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．５）で洗浄を開始し、吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの素通り画分を得、直ちに０．５Ｍりん酸緩衝液（ｐＨ７．３）でｐＨ７に中和し、精製液２として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１５Ｌ／時で実施した。

[0143] 約２０Ｌの精製液２を限外ろ過膜のマイクローザＵＦモジュールＳＩＰ－１０１３（日本国、旭化成ケミカルズ）で約１Ｌまで濃縮した後に５０ｍＭ

塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したＳｅｐｈａｃｒｙｌ　Ｓ－３００　ＨＲ（米国　ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径２５ｃｍ、高さ７９ｃｍ）に供した。２８０ｎｍにおける吸収がもっとも大きい溶出ピークを分取した後、限外ろ過膜のマイクローザＵＦモジュールＳＩＰ－１０１３（日本国、旭化成ケミカルズ）で約０．７Ｌまで濃縮し、精製液３として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１Ｌ／時で実施した。

[0144] 室温下で、精製液３全量を５０ｍＭ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したウイルス除去膜のＰＬＡＮＯＶＡ　１５Ｎ（日本国、旭化成メディカル、膜面積０．１２m^2）に圧力０．１ＭＰａ以下で通液後、さらに０．２２μｍのＰＶＤＦ製ろ過膜（米国、ミリポア）に通液し、全量を回収した。これを可溶性トロンボモジュリン精製品とした（ロット：Ｂ３）。

[0145] （実施例１）高純度可溶性トロンボモジュリンの製造１

特開平１１－３４１９９０号公報の成分表２に示された培地の$NaHCO_3$濃度を５，７００ｍｇ／Ｌに、ＮａＣｌ濃度を２，４１０ｍｇ／Ｌに改変したものを基本培地として細胞培養行った。増殖培地は基本培地に６０ｍｇ／Ｌのカナマイシン硫酸塩（米国、インビトロジェン）、１ｍｇ／Ｌの酒石酸タイロシン（米国、シグマーアルドリッチ）、及び８％ウシ血清（米国、ハイクロン）を添加して用いた。また、生産培地は増殖培地の血清濃度を３％とした。

[0146] 比較例１で作製した細胞のバイアル１本を融解し、その細胞を１００ｍＬの増殖培地に播種し、CO_2インキュベーター内、スピナーフラスコを用いて３７℃で５日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を０．９Ｌの増殖培地に継代し、CO_2インキュベーター内、スピナーフラスコを用いて３７℃で５日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を９Ｌの増殖培地に継代し、培養槽を用いて３７℃、ｐＨ７．２、溶存酸

素５０％で５日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×１０^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を１２０Ｌの増殖培地に継代し、灌流培養槽を用いて３７℃、ｐＨ７．２、溶存酸素５０％で７日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×１０^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、生産培地の添加と培養上清液の回収を連続的に行う灌流培養を開始した。培養条件は、３７℃、ｐＨ７．２、溶存酸素５０％、培地交換１３０～２００Ｌ／ｄａｙ、上面加圧０～０．２ＭＰａとした。生細胞密度が７．５×１０^6 ｃｅｌｌｓ／ｍＬに達したから４０日間培養を継続し、培養上清液を生産液として回収した。回収した生産液はろ過フィルターのスープラディスクＩＩ（米国、ポール）、及びスーポアＥＢＶ（米国、ポール）を用いて澄明化し、ろ過後生産液として２～１０℃で保存した。

[0147] 約７００Ｌのろ過後生産液を、１５０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で平衡化したＱ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（米国、ＧＥヘルスケア）カラム（直径６３ｃｍ、高さ２５ｃｍ）に供した。次に６ＣＶの１８０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭ酢酸緩衝液（ｐＨ５．５）で洗浄し、更に２８０ｎｍの吸収がベースラインに戻るまで１８０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で洗浄を行ない、３００ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で溶出を開始し、溶出液の吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりからの０．５カラムボリューム容量の溶出液を粗精製液として取得した。同様の操作を３回繰り返し実施し、３ロットの粗精製液を取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１０９Ｌ／時で実施した。

[0148] 約２０Ｌの粗精製液を、０．３Ｍ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したモノクローナル抗体カラム（直径４４ｃｍ、高さ１３ｃｍ）に供した。６ＣＶの１．０Ｍ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を流し、更に３ＣＶの０．１Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ５．０）を流し洗浄し、０．３Ｍ 塩化ナトリウム含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．０）で溶出を開始した。溶出液の吸光度２８０ｎｍのピー

ク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を得、溶出液に１／１０容量の０．５Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を添加して精製液１として取得した。同様の操作を６回繰り返し実施し、６ロットの精製液１を取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は４６Ｌ／時で実施した。

[0149] ６ロット分の精製液１約１３０Ｌをナイロン製ろ過膜（独国、ザルトリウス社、ＳＡＲＴＯＬＯＮ Ｍａｘｉ Ｃａｐｓ ５１０１３０７Ｈ３、孔径０．４μｍ＋０．２μｍ、膜面積１．８m^2）に５Ｌ／分の流速で通液した後（ＨＣＰ１ｍｇに対し約０．０７m^2膜面積を使用）、１．０Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ２．０）にてｐＨ３．５に調製し、０．３Ｍ ＮａＣｌを含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．５）で平衡化したＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ＦＦ（米国 ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径４５ｃｍ、高さ１０ｃｍ）に供した。０．３Ｍ ＮａＣｌを含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．５）で洗浄を開始し、吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの素通り画分を得、直ちに０．５Ｍりん酸緩衝液（ｐＨ７．３）でｐＨ７に中和し、精製液２として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１６０Ｌ／時で実施した。

[0150] 約１６０Ｌの精製液２を限外ろ過膜のマイクローザＵＦモジュールＳＩＰ－２０１３（日本国、旭化成ケミカルズ）で約１０Ｌまで濃縮した後に、５０ｍＭ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したＳｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ－３００ ＨＲ（米国 ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径６３ｃｍ、高さ９４ｃｍ）に供した。２８０ｎｍにおける吸収がもっとも大きい溶出ピークを分取した後、限外ろ過膜のマイクローザＵＦモジュールＳＩＰ－１０１３（日本国、旭化成ケミカルズ）で約６Ｌまで濃縮し、精製液３として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は６．２Ｌ／時で実施した。

[0151] 室温下で、精製液３を５０ｍＭ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したウイルス除去膜のＰＬＡＮＯＶＡ １５Ｎ（日本国、旭化成メディカル、膜面積１m^2）に圧力０．１ＭＰａ以下で通液後、

さらに０．２２μｍのＰＶＤＦ製ろ過膜（米国、ミリポア）に通液し、全量を回収した。これを高純度可溶性トロンボモジュリン精製品（ロット：Ａ４）とした。

Ａ４のトロンボモジュリンのＡＰＣ活性は、６００００Ｕ／ｍＬであった。

Ａ４の溶液における可溶性トロンボモジュリン濃度は、９．３ｍｇ／ｍＬであった。

[0152] （実施例２）高純度可溶性トロンボモジュリンの製造２

実施例１で取得した約２，０００Ｌのろ過後生産液を、１５０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で平衡化したＱ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（米国、ＧＥヘルスケア）カラム（直径６３ｃｍ、高さ２５ｃｍ）に供した。次に６ＣＶの１７０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭ酢酸緩衝液（ｐＨ５．４５）で洗浄し、更に４ＣＶの１７０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で洗浄を行ない、３００ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で溶出を開始し、溶出液の吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりからの０．５カラムボリューム容量の溶出液を粗精製液として取得した。同様の操作を２回繰り返し実施し、２ロットの粗精製液を取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１０９Ｌ／時で実施した。

[0153] 約１０Ｌの粗精製液を、０．３Ｍ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したモノクローナル抗体カラム（直径４４ｃｍ、高さ１３ｃｍ）に供した。６ＣＶの１．０Ｍ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を流し、更に３ＣＶの０．１Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ５．０）を流し洗浄し、０．３Ｍ 塩化ナトリウム含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．０）で溶出を開始した。溶出液の吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を得、溶出液に１／１０容量の０．５Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を添加して精製液１として取得した。同様の操作を８回繰り返し実施し、８ロットの精製液１を取得した。なお、温

度は２～１０℃、クロマト流速は４６Ｌ／時で実施した。

[0154] ６ロット分の精製液１約１８０Ｌをナイロン製ろ過膜（独国、ザルトリウス社、ＳＡＲＴＯＬＯＮ Ｍａｘｉ Ｃａｐｓ ５１０１３０７Ｈ３、孔径０．４μｍ＋０．２μｍ、膜面積１．８m^2）に５Ｌ／分の流速で通液した後（ＨＣＰ１ｍｇに対し約０．０５m^2膜面積を使用）、１．０Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ２．０）にてｐＨ３．５に調製し、０．３Ｍ ＮａＣｌを含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．５）で平衡化したＳＰ－ＳｅｐｈａｒｏｓｅＦＦ（米国 ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径４５ｃｍ、高さ１０ｃｍ）に供した。０．３Ｍ ＮａＣｌを含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．５）で洗浄を開始し、吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの素通り画分を得、直ちに０．５Ｍりん酸緩衝液（ｐＨ７．３）でｐＨ７に中和し、精製液２として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１６０Ｌ／時で実施した。

[0155] 約２２０Ｌの精製液２を限外ろ過膜のマイクローザＵＦモジュールＳＩＰ－２０１３（日本国、旭化成ケミカルズ）で約５Ｌまで濃縮した後に、５０ｍＭ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したＳｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ－３００ ＨＲ（米国 ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径６３ｃｍ、高さ９４ｃｍ）に供した。２８０ｎｍにおける吸収がもっとも大きい溶出ピークを分取した後、限外ろ過膜のマイクローザＵＦモジュールＳＩＰ－１０１３（日本国、旭化成ケミカルズ）で約１０Ｌまで濃縮し、精製液３として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は６．２Ｌ／時で実施した。

[0156] 室温下で、精製液３を５０ｍＭ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したウイルス除去膜のＰＬＡＮＯＶＡ １５Ｎ（日本国、旭化成メディカル、膜面積１m^2）に圧力０．１ＭＰａ以下で通液後、さらに０．２２μｍのＰＶＤＦ製ろ過膜（米国、ミリポア）に通液し、全量を回収した。これを高純度可溶性トロンボモジュリン精製品（ロット：Ａ５）とした。

Ａ５のトロンボモジュリンのＡＰＣ活性は、６９０００Ｕ／ｍＬであった。

Ａ５の溶液における可溶性トロンボモジュリン濃度は、１０．９ｍｇ／ｍＬであった。

[0157] （実施例３）高純度可溶性トロンボモジュリンの製造３

特開平１１－３４１９９０号公報の成分表２に示された培地の$NaHCO_3$濃度を５，７００ｍｇ／Ｌに、ＮａＣｌ濃度を２，４１０ｍｇ／Ｌに改変したものを基本培地として細胞培養行った。増殖培地は基本培地に６０ｍｇ／Ｌのカナマイシン硫酸塩（米国、インビトロジェン）、１ｍｇ／Ｌの酒石酸タイロシン（米国、シグマーアルドリッチ）、及び８％ウシ血清（米国、ハイクロン）を添加して用いた。また、生産培地は増殖培地の血清濃度を３％とした。

[0158] 比較例１で作製した細胞のバイアル１本を融解し、その細胞を１００ｍＬの増殖培地に播種し、CO_2インキュベーター内、スピナーフラスコを用いて３７℃で５日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を０．９Ｌの増殖培地に継代し、CO_2インキュベーター内、スピナーフラスコを用いて３７℃で５日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を９Ｌの増殖培地に継代し、培養槽を用いて３７℃、ｐＨ７．２、溶存酸素５０％で５日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を１２０Ｌの増殖培地に継代し、灌流培養槽を用いて３７℃、ｐＨ７．２、溶存酸素５０％で７日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、生産培地の添加と培養上清液の回収を連続的に行う灌流培養を開始した。培養条件は、３７℃、ｐＨ７．２、溶存酸素５０％、培地交換１３０～２００Ｌ／ｄａｙ、上面加圧０～０．２ＭＰａとした。生細胞密度が７．５×10^6 ｃｅｌｌｓ／ｍＬに達したから３６日間培養を継続し、培養上清液を生産液として回収した。回収した生産液はろ過フィルターのスープラディスクＩＩ（米国、

ポール）、及びスーポアＥＢＶ（米国、ポール）を用いて澄明化し、ろ過後生産液として２～１０℃で保存した。

[0159] 約７００Ｌのろ過後生産液を、１５０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で平衡化したＱ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（米国、ＧＥヘルスケア）カラム（直径６３ｃｍ、高さ２５ｃｍ）に供した。次に６ＣＶの１８０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭ酢酸緩衝液（ｐＨ５．５）で洗浄し、更に２８０ｎｍの吸収がベースラインに戻るまで１８０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で洗浄を行ない、３００ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で溶出を開始し、溶出液の吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりからの０．５カラムボリューム容量の溶出液を粗精製液として取得した。同様の操作を６回繰り返し実施し、６ロットの粗精製液を取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１０９Ｌ／時で実施した。

[0160] 約２０Ｌの粗精製液を、０．３Ｍ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したモノクローナル抗体カラム（直径４４ｃｍ、高さ１３ｃｍ）に供した。６ＣＶの１．０Ｍ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を流し、更に３ＣＶの０．１Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ５．０）を流し洗浄し、０．３Ｍ 塩化ナトリウム含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．０）で溶出を開始した。溶出液の吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を得、溶出液に１／１０容量の０．５Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を添加して精製液１として取得した。同様の操作を１２回繰り返し実施し、１２ロットの精製液１を取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は４６Ｌ／時で実施した。

[0161] １２ロット分の精製液１約２７０Ｌをナイロン製ろ過膜（独国、ザルトリウス社、ＳＡＲＴＯＬＯＮ Ｍａｘｉ Ｃａｐｓ ５１０１３０７Ｈ３、孔径０．４μｍ＋０．２μｍ、膜面積１．８m^2）に５Ｌ／分の流速で通液した後（ＨＣＰ１ｍｇに対し約０．０５m^2膜面積を使用）、１．０Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ２．０）にてｐＨ３．５に調製し、０．３Ｍ ＮａＣｌを含む

０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．５）で平衡化したＳＰ－ＳｅｐｈａｒｏｓｅＦＦ（米国　ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径４５ｃｍ、高さ１０ｃｍ）に供した。０．３Ｍ ＮａＣｌを含む０．１Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．５）で洗浄を開始し、吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの素通り画分を得、直ちに０．５Ｍりん酸緩衝液（ｐＨ７．３）でｐＨ７に中和し、精製液２として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１６０Ｌ／時で実施した。

[0162] 約３００Ｌの精製液２を限外ろ過膜のマイクローザＵＦモジュールＳＩＰ－２０１３（日本国、旭化成ケミカルズ）で約１１Ｌまで濃縮した後に、５０ｍＭ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したＳｅｐｈａｃｒｙｌ　Ｓ－３００　ＨＲ（米国　ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径６３ｃｍ、高さ９４ｃｍ）に供した。２８０ｎｍにおける吸収がもっとも大きい溶出ピークを分取した後、限外ろ過膜のマイクローザＵＦモジュールＳＩＰ－１０１３（日本国、旭化成ケミカルズ）で約１３Ｌまで濃縮し、精製液３として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は６．２Ｌ／時で実施した。

[0163] 室温下で、精製液３を５０ｍＭ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したウイルス除去膜のＰＬＡＮＯＶＡ　１５Ｎ（日本国、旭化成メディカル、膜面積１m^2）に圧力０．１ＭＰａ以下で通液後、さらに０．２２μｍのＰＶＤＦ製ろ過膜（米国、ミリポア）に通液し、全量を回収した。これを高純度可溶性トロンボモジュリン精製品（ロット：Ａ６）とした。

Ａ６のトロンボモジュリンのＡＰＣ活性は、８１０００Ｕ／ｍＬであった。

Ａ６の溶液における可溶性トロンボモジュリン濃度は、１１．９ｍｇ／ｍＬであった。

[0164] （実施例４）高純度可溶性トロンボモジュリンの製造４

増殖培地は２０．７８ｇのＩＳ　ＣＨＯ－ＣＤ－Ａ３（米国、アーバイン

サイエンティフィック）、４．０６ｇの塩化ナトリウム（日本国、富田製薬）、及び２．２０ｇの炭酸水素ナトリウム（日本国、和光純薬工業）を１Ｌの水に溶解して作製した。また、生産培地は１Ｌの水に対し、２０．７８ｇのＩＳ　ＣＨＯ－ＣＤ－Ａ３（米国、アーバイン　サイエンティフィック）、２．６３ｇの塩化ナトリウム（日本国、富田製薬）、及び４．４０ｇの炭酸水素ナトリウム（日本国、和光純薬工業）を溶解して作製した。

[0165] 比較例４で作製した細胞のバイアル１本を融解し、その細胞を１００ｍＬの増殖培地に播種し、CO_2インキュベーター内、Ｔ－フラスコを用いて３６℃で５日間静置培養した。生細胞密度が７．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を０．９Ｌの増殖培地に継代し、CO_2インキュベーター内、スピナーフラスコを用いて３６℃で５日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を９Ｌの増殖培地に継代し、培養槽を用いて３６℃、ｐＨ７．１、溶存酸素５０％で５日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、培養液全量を１２０Ｌの増殖培地に継代し、灌流培養槽を用いて３６℃、ｐＨ７．１、溶存酸素５０％で７日間攪拌培養した。生細胞密度が７．０×10^5 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ以上になった時点で、生産培地の添加と培養上清液の回収を連続的に行う灌流培養を開始した。培養条件は、３６℃、ｐＨ７．１、溶存酸素５０％、培地交換１３０Ｌ／ｄａｙ、上面加圧０～０．２ＭＰａとした。生細胞密度が７．５×10^6 ｃｅｌｌｓ／ｍＬに達したから２０日間培養を継続し、培養上清液を生産液として回収した。

[0166] 回収した生産液はろ過フィルターのスープラディスクＩＩ（米国、ポール）、及びスーポアＥＢＶ（米国、ポール）を用いて澄明化し、ろ過後生産液として２～１０℃で保存した。

約１，４００Ｌのろ過後生産液を、１５０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍＭトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で平衡化したＱ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（米国、ＧＥヘルスケア）カラム（直径６３ｃｍ、高さ２５ｃｍ）に供した。次に６ＣＶの１８０ｍＭ 塩化ナトリウムを含む２０ｍ

M酢酸緩衝液（ｐＨ５．６）で洗浄し、更に４ＣＶの１８０mM 塩化ナトリウムを含む２０mMトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で洗浄を行ない、２９０mM 塩化ナトリウムを含む２０mMトリス塩緩衝液（ｐＨ７．７）で溶出を開始し、溶出液の吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりからの０．５カラムボリューム容量の溶出液を粗精製液として取得した。約９００Ｌのろ過後生産液についても同様の操作を行い、２ロットの粗精製液を取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は１０９Ｌ／時で実施した。

[0167] 約１３Ｌの粗精製液を、０．３M 塩化ナトリウム含む２０mMリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したモノクローナル抗体カラム（直径４４ｃｍ、高さ１３ｃｍ）に供した。６ＣＶの１．０M 塩化ナトリウム含む２０mMリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を流し、更に３ＣＶの０．１M酢酸緩衝液（ｐＨ５．０）を流し洗浄し、０．３M 塩化ナトリウム含む０．１Mグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．０）で溶出を開始した。溶出液の吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの溶出液を得、溶出液に１／１０容量の０．５Mリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）を添加して精製液１として取得した。同様の操作を５回繰り返し実施し、５ロットの精製液１を取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は４６Ｌ／時で実施した。

[0168] ５ロット分の精製液１約１１０Ｌをナイロン製ろ過膜（独国、ザルトリウス社、ＳＡＲＴＯＬＯＮ Ｍａｘｉ Ｃａｐｓ ５１０１３０７Ｈ３、孔径０．４μｍ＋０．２μｍ、膜面積１．８m^2）に５Ｌ／分の流速で通液した後（ＨＣＰ１ｍｇに対し約０．０３m^2膜面積を使用）、１．０Mグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ２．０）にてｐＨ３．５に調製し、０．３M ＮａＣｌを含む０．１Mグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．５）で平衡化したＳＰ－ＳｅｐｈａｒｏｓｅＦＦ（米国 ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径４５ｃｍ、高さ１０ｃｍ）に供した。０．３M ＮａＣｌを含む０．１Mグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ３．５）で洗浄を開始し、吸光度２８０ｎｍのピーク立ち上がりから立ち下がりまでの素通り画分を得、直ちに０．５Mりん酸緩衝液（ｐＨ７．３）でｐＨ７に中和し、精製液２として取得した。なお、温度は２

～１０℃、クロマト流速は１６０Ｌ／時で実施した。

[0169] 約１２０Ｌの精製液２を限外ろ過膜のマイクローザＵＦモジュールＳＩＰ－２０１３（日本国、旭化成ケミカルズ）で約５Ｌまで濃縮した後に５０ｍＭ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したＳｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ－３００ ＨＲ（米国 ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）カラム（直径６３ｃｍ、高さ９４ｃｍ）に供した。２８０ｎｍにおける吸収がもっとも大きい溶出ピークを分取した後、限外ろ過膜のマイクローザＵＦモジュールＳＩＰ－１０１３（日本国、旭化成ケミカルズ）で約５Ｌまで濃縮し、精製液３として取得した。なお、温度は２～１０℃、クロマト流速は６．２Ｌ／時で実施した。

[0170] 室温下で、精製液３全量を５０ｍＭ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で平衡化したウイルス除去膜のＰＬＡＮＯＶＡ １５Ｎ（日本国、旭化成メディカル、膜面積１m^2）に圧力０．１ＭＰａ以下で通液後、さらに０．２２μｍのＰＶＤＦ製ろ過膜（米国、ミリポア）に通液し、全量を回収した。これを高純度可溶性トロンボモジュリン精製品（ロット：Ａ７）とした。

Ａ７のトロンボモジュリンのＡＰＣ活性は、６９０００Ｕ／ｍＬであった。

Ａ７の溶液における可溶性トロンボモジュリン濃度は、１０．４ｍｇ／ｍＬであった。

[0171] （試験例１）各種ろ過膜によるＨＣＰ除去評価

比較例１で得られた精製液１（ＨＣＰ濃度：４６２ｎｇ／ｍｌ）を異なる材質のろ過膜に通液した後のＨＣＰ濃度を比較した。すなわち、（１）ＰＶＤＦ（ポリフッ化ビニリデン）製（米国、ミリポア、Ｍｉｌｌｅｘ ＧＶ）、（２）ＣＡ（セルロースアセテート）製（独国、ザルトリウス、Ｍｉｎｉｓａｒｔ）、（３）ＰＥＳ（ポリエーテルスルホン）製（独国、ザルトリウス、Ｍｉｎｉｓａｒｔ Ｈｉｇｈ－Ｆｌｏｗ）、（４）ナイロン製（米国、サーモフィッシャサイエンティフィック、ＮＡＬＧＥＮＥ Ｓｙｒｉｎｇｅ

Ｆｉｌｔｅｒ）、（５）ＣＡ＋ＧＦ（セルロースアセテート＋グラスファイバー）製（ザルトリウス、Ｍｉｎｉｓａｒｔ　Ｐｌｕｓ）の各ろ過膜に５ｍｌの精製液１を１ｍｌ／分の流速で通液し、全量をろ過液として回収した。

[0172] ろ過前後の液について、たん白質濃度とＨＣＰ濃度の測定を行った。たん白質濃度は２８０ｎｍの吸光度から求め、ＨＣＰ濃度は参考例２に示した方法に従って測定した。その結果、すべてのろ過膜に対してろ過前後でのたん白質濃度の変化はほとんど認められなかったが、ナイロン製ろ過膜及びＰＥＳ製ろ過膜には高いＨＣＰ除去効果が認められ、それぞれＨＣＰ濃度を２８％及び３６％に減少させることがわかった（表１）。また、同じ孔径にもかかわらず、ＨＣＰ濃度の低下が膜材質によって大きく異なることから、凝集して不溶化したＨＣＰが除去されたのではなく、ＨＣＰの膜による吸着除去であると考えられた。なお、評価した各ろ過膜の径は２５ｍｍ又は２６ｍｍであり、各メーカーのデータシート記載のろ過膜の有効膜面積からＨＣＰ１ｍｇに対する膜面積は０．１７m^2又は０．２３m^2であった。

[0173] [表1]

ろ過膜	孔径（μｍ）	膜径（ｍｍ）	有効膜面積（cm^2）	ＨＣＰ１ｍｇに対する膜面積（m^2）	ＨＣＰ回収率（％）	たん白質回収率（％）
（１）ＰＶＤＦ	０．２２	２５	３．９	０．１７	９３	１０１
（２）ＣＡ	０．２	２６	５．３	０．２３	６９	１００
（３）ＰＥＳ	０．２	２６	５．３	０．２３	３６	１００
（４）ナイロン	０．２	２５	不明	不明	２８	９９
（５）ＣＡ＋ＧＦ	０．２	２６	５．３	０．２３	４４	９９

[0174] （試験例２）ナイロン製及びＰＥＳ製ろ過膜によるＨＣＰ除去能比較

試験例１において、ナイロン製ろ過膜とＰＥＳ製ろ過膜は高いＨＣＰ除去能を有することが判明したため、これらのろ過膜について通液量によるＨＣＰ除去能の変化を評価した。なお、ろ過膜は各材質について２種類のメーカーの商品を準備し、通液する精製液１については、試験例２で使用したロッ

トとは異なるロットを用いた（ＨＣＰ濃度：３０３ｎｇ／ｍｌ）。ろ過膜は、コントロールとしてＰＶＤＦ製（米国、ミリポア、Ｍｉｌｌｅｘ　ＧＶ：孔径０．２２μｍ、膜径２５ｍｍ、有効膜面積３．９ｃｍ^2）を使用し、ナイロン製として（１）米国、ポール社のＡｃｒｏｄｉｓｃ　ＡＰ－４４３６Ｔ、：孔径０．２μｍ、膜径２５ｍｍ、有効膜面積３．９ｃｍ^2、及び（２）独国、ザルトリウス社のＭｉｎｉｓａｒｔ　ＮＹ２５：孔径０．２μｍ、膜径２５ｍｍ、有効膜面積４．８ｃｍ^{2}を、ＰＥＳ製として（３）米ポール社のＡｃｒｏｄｉｓｃ　ＰＮ４６１２：孔径０．２μｍ、膜径２５ｍｍ、有効膜面積２．８ｃｍ^2、及び（４）ザルトリウス社のＭｉｎｉｓａｒｔ　Ｈｉｇｈ－Ｆｌｏｗ：孔径０．２μｍ、膜径２６ｍｍ、有効膜面積５．３ｃｍ^{2}を用いた。ろ過膜当りの精製液１の通液量は１０ｍｌ／分の流速で１００ｍｌとし、２０ｍｌ通液毎にろ過液をサンプリングして参考例２に示した方法に従ってＨＣＰ濃度を、２８０ｎｍの吸収からたん白質濃度を測定した。

[0175] その結果、すべてのサンプルにおいてたん白質濃度の変化は認められなかったが、ナイロン製及びＰＥＳ製ろ過膜共にＨＣＰ除去効果が認められた（表２）。ＨＣＰ除去効果は特にナイロン製ろ過膜が高く、ＨＣＰ濃度を最大２５%に低下させた。ろ過膜への通液量が少ないほど、すなわちＨＣＰ１ｍｇに対するろ過膜面積が大きいほどＨＣＰ除去効果が高いことがわかった。

[0176] [表2]

ろ過膜		ＨＣＰ１ｍｇに対する膜面積（ｍ^2）	ＨＣＰ回収率（%）				
			２０ｍｌ	４０ｍｌ	６０ｍｌ	８０ｍｌ	１００ｍｌ
ＰＶＤＦ		０．０１３～０．０６４	９４	９８	１０９	８９	９２
ナイロン	（１）ポール社	０．０１３～０．０６４	５０	６２	６０	６９	７５
	（２）ザルトリウス社	０．０１６～０．０７９	２５	３４	３０	４９	４７
ＰＥＳ	（３）ポール社	０．００９～０．０４６	７７	８４	９８	８８	１０７
	（４）ザルトリウス社	０．０１７～０．０８７	６８	６６	７５	６２	６３

[0177] （試験例３）異なる液組成におけるナイロン製ろ過膜のＨＣＰ除去能評価

緩衝液組成及び可溶性トロンボモジュリン濃度の違いがナイロン製ろ過膜のＨＣＰ除去能に与える影響を評価した。比較例４で得られた精製液１、精製液２、精製液２濃縮後、精製液３、及び精製品について各５ｍＬを膜径２５ｍｍ、有効膜面積４．８ｃｍ^2、孔径０．２μｍのナイロン製ろ過膜（独国、ザルトリウス社、Ｍｉｎｉｓａｒｔ　ＮＹ２５）に１ｍＬ／分の流速で通液し、全量をろ過液として回収した。各サンプルに含まれるＨＣＰ１ｍｇに対するろ過膜面積は、精製液１：０．７７ｍ^2、精製液２：１．７ｍ^2、精製液２濃縮後：０．４３ｍ^2、精製液３：０．７２ｍ^2、精製品：０．８１ｍ^{2}であった。得られたろ過液について、参考例２に示した方法に従ってＨＣＰ濃度を測定し、たん白質濃度を２８０ｎｍの吸収から求めた。その結果、ナイロン製膜は全てのサンプルに対して高いＨＣＰ除去効果が認められ、たん白質濃度回収率は９０％以上の高い値が得られた（表３）。

[0178] [表3]

サンプル	ＨＣＰ			たん白質		
	ろ過前（ｎｇ／ｍＬ）	ろ過後（ｎｇ／ｍＬ）	回収率（％）	ろ過前（ｍｇ／ｍＬ）	ろ過後（ｍｇ／ｍＬ）	回収率（％）
精製液１	１２５	６５	５２	０．４７	０．４４	９４
精製液２	５６	３５	６３	０．４０	０．３７	９３
精製液２濃縮後	２２２	１１５	５２	８．２８	８．２８	１００
精製液３	１３４	＜２５	＜１９	１１．１	１１．４	１０３
精製品	１１９	＜２５	＜２１	１０．１	１０．３	１０２

[0179] （試験例４）各種製造方法により取得した可溶性トロンボモジュリン精製品からのＨＣＰ除去評価

異なった製造方法により取得した可溶性トロンボモジュリンを、さらにナイロン製ろ過膜に通液することによりＨＣＰが除去されるかどうか検討した。比較例１～３で取得した可溶性トロンボモジュリン精製品（それぞれ、Ａ１、Ｂ１及びＢ２）について各５ｍＬを膜径２５ｍｍ、有効膜面積４．８ｃ

m^2、孔径０．２μｍのナイロン製ろ過膜（独国、ザルトリウス社、Ｍｉｎｉｓａｒｔ　ＮＹ２５）に１ｍＬ／分の流速で通液し、全量をろ過液として回収した。各可溶性トロンボモジュリン精製品に含まれるＨＣＰ１ｍｇに対するろ過膜面積は各可溶性トロンボモジュリン精製品に含まれるＨＣＰ１ｍｇに対するろ過膜面積は、Ａ１：０．３４m^2、Ｂ１：０．４６m^2、Ｂ２：１．７m^2であった。ろ過前後の液について、参考例２～４に示した方法に従ってＨＣＰ含量、マウスＩｇＧ含量及びウシ血清たん白質含量を測定した。全ての精製品においてナイロン製ろ過膜はＨＣＰに対してのみ強い除去効果が認められた（表４）。このことからナイロン製ろ過膜はたん白質を非特異的に吸着するのではなく、ＨＣＰを特異的に吸着する作用を有すると考えられた。

[0180] [表4]

精製品	ＨＣＰ含量（ｎｇ／１０，０００Ｕ）		マウスＩｇＧ含量（ｎｇ／１０，０００Ｕ）		ウシ血清たん白質含量（ｎｇ／１０，０００Ｕ）	
	ろ過前	ろ過後	ろ過前	ろ過後	ろ過前	ろ過後
比較例１（Ａ１）	４０．９	＜８．２	＜０．１８	＜０．１８	０．６７	１．０３
比較例２（Ｂ１）	２６．０	＜６．７	＜０．１６	＜０．１６	０．２４	＜０．１６
比較例３（Ｂ２）	２０．０	７．０	０．６５	０．５９	１３．５	１３．２

[0181] （試験例５）ナイロン製ろ過膜の使用の有無によるトロンボモジュリン精製品の純度の比較

ナイロン製ろ過膜未使用の工業化レベル製造（比較例１）及びナイロン製ろ過膜を使用した工業化レベル製造（実施例１～４）で得られたトロンボモジュリン精製品について、参考例２～４に示した方法に従ってＨＣＰ含量、マウスＩｇＧ含量及びウシ血清たん白質含量を測定した。

ナイロン製ろ過膜を通液していない比較例１の３ロット（Ａ１、Ａ２及びＡ３）は１０ｎｇ／１０，０００Ｕ以上の高いＨＣＰ含量を有していたが、ナイロン製ろ過膜を通液した実施例１～４の４ロット（Ａ４、Ａ５、Ａ６及

びＡ７）のＨＣＰ含量は定量限界未満であった。その他の不純物のマウスＩｇＧ含量及びウシ血清たん白質含量についてはナイロン製ろ過膜の使用の有無でその含量に際は認められなかった（表５）。このように工業化レベルでの製造においてもナイロン製ろ過膜は、ＨＣＰに特異的な除去能を有し、ＨＣＰ含量が１０ｎｇ／１０，０００Ｕ未満という高純度可溶性トロンボモジュリンの製造を可能にした。

実施例１～４で得られた高純度可溶性トロンボモジュリンの総たん白質中純度をゲルろ過液体クロマトグラフィー及びイオン交換液体クロマトグラフィーにて測定した。ゲルろ過液体クロマトグラフィーについては、ＴＯＳＯＨ　ＴＳＫｇｅｌ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ（日本国、東ソー）を用いて、０．１Ｍ硫酸ナトリウムを含む５０ｍＭリン酸塩緩衝液（ｐＨ７．３）、温度４０℃、流速０．９ｍＬ／分という条件下で測定を行った結果、全ての精製品（Ａ４、Ａ５、Ａ６及びＡ７）の純度は９９％以上であった。また、イオン交換液体クロマトグラフィーについては、ＴＯＳＯＨ　ＤＥＡＥ　５ＰＷ（日本国、東ソー）を用いて、５０ｍＭ塩化ナトリウムを含む２０ｍＭピペラジン塩酸緩衝液（ｐＨ５．６）から３５０ｍＭ塩化ナトリウムを含む２０ｍＭピペラジン塩酸緩衝液（ｐＨ５．６）への３０分間直線グラジエント溶出、温度４０℃、流速０．９ｍＬ／分という条件下で測定を行った結果、全ての精製品（Ａ４、Ａ５、Ａ６及びＡ７）の純度は９９％以上であった。

[0182] また、比較例１に準じて製造し、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ法にて分子量が６４，０００であることことが確認されている可溶性トロンボモジュリン精製品と、実施例１～４で得られた高純度可溶性トロンボモジュリン精製品の分子量をＳＤＳ－ＰＡＧＥで比較したところ、同じ位置にバンドが検出された。このことから高純度可溶性トロンボモジュリンの分子量は、６４，０００と考えられた。

さらに、日本薬局方一般試験法のエンドトキシン試験法＜４．０１＞のゲル化法に従って試験を実施した結果、エンドトキシン含量が０．００４～０．０３ＥＵ／１０，０００Ｕであり、非常に低いレベルであった（表６）

[0183] [表5]

ロット		ろ過の有無	ＨＣＰ含量（ｎｇ／１０^{4}Ｕ）	マウスＩｇＧ含量（ｎｇ／１０^{4}Ｕ）	ウシ血清たん白質含量（ｎｇ／１０^{4}Ｕ）
比較例１	Ａ１	無	４０．９	＜０．１８	０．６７
比較例１	Ａ２	無	１７．２	＜０．１９	０．２５
比較例１	Ａ３	無	２２．３	＜０．１８	＜０．２３
実施例１	Ａ４	有	＜８．３	＜０．２１	１．４２
実施例２	Ａ５	有	＜７．２	＜０．１８	０．４２
実施例３	Ａ６	有	＜６．２	＜０．１６	０．７１
実施例４	Ａ７	有	＜７．２	＜０．１８	未実施

[0184] [表6]

ロット		ろ過の有無	エンドトキシン含量（ＥＵ／１０^{4}Ｕ）
実施例１	Ａ４	有	０．００５０
実施例２	Ａ５	有	０．００４３
実施例３	Ａ６	有	０．０１０５
実施例４	Ａ７	有	０．０２４５

[0185] （試験例６）ナイロン製ろ過膜で除去されたＨＣＰの解析

実施例３と同様の方法により高純度可溶性トロンボモジュリンを製造した後、製造で使用したナイロン製ろ過膜（独国、ザルトリウス、ＳＡＲＴＯＬＯＮ　Ｍａｘｉ　Ｃａｐｓ　５１０１３０７Ｈ３、孔径０．４μｍ＋０．２μｍ、膜面積１．８m^2）をハウジングから取り出し、膜を約３ｇの断片になるように切断した。５枚の断片を５０ｍＭ 塩化ナトリウム含む２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で十分洗浄した後、４０ｍＬの０．５％ＣＨＡＰＳ、２００ｍＭ 塩化ナトリウムを含む５０ｍＭ トリス塩酸緩衝液（ｐＨ８．０）が入った試験管に断片を１枚ずつ入れた。室温で一晩振とうすることにより、膜に吸着したたん白質を緩衝液中に抽出した。抽出液全量を限外ろ過膜のＶｉｖａｓｐｉｎ２０（独国、ザルトリウス）とＡｍｉｃｏｎＵｌｔｒａ－０．５ｍＬ（米国、ミリポア）を用いて、１５μＬになるまで濃縮した。この濃縮液のうち約１／５量をＳＤＳ－ＰＡＧＥ（日本国、アトー、ｅ－ＰＡＧＥＬ５／２０）に供し、ＣＢＢ染色（日本国、和光純薬工業、Ｑｕｉｃｋ－ＣＢＢ）した。分子量１０，０００付近に認められたバンドを切り出

して、そのゲル断片をジチオトレイトールで還元後、ヨードアセトアミドによりカルバミドメチル化し、トリプシンによる酵素消化を終夜で実施した。酵素消化物をＬＣ／ＭＳ／ＭＳに供し、得られたマススペクトルデータから、ＮＣＢＩのデータベースを用いてＭａｓｃｏｔ検索を行い、酵素消化物のアミノ酸配列を解析した。

[0186] ＬＣ／ＭＳ／ＭＳの測定条件

ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ（測定装置）：

ＤｉＮａ－２Ａ多次元オートインジェクターシステム（日本国、ＫＹＡ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）

ＭＳ測定範囲：

ＭＳ１（ｍ／ｚ４００－１５００）ＭＳ２（ｍ／ｚ５０－１５００）×３（ｄａｔａ ｄｅｐｅｎｄｅｎｔスキャンモード）

イオン化モード：ｎａｎｏＥＳＩ$^{+}$

カラム：

ＰｉｃｏＦｒｉｔ Ｃｏｌｕｍｎ ＢａｔａＢａｓｉｃ Ｃ１８（米国、Ｎｅｗ Ｏｂｊｅｃｔｉｖｅ）

移動相：

移動相Ａ：０．１％ギ酸／２％アセトニトリル

移動相Ｂ：０．１％ギ酸／８０％アセトニトリル

グラジエント： ０→３０分 移動相Ｂ ５→４０％

３０→４０分 移動相Ｂ ４０→１００％

４０→６０分 移動相Ｂ １００％

流量：３００ｎＬ／分

[0187] マススペクトルデータから予想される各フラグメントのアミノ酸配列は以下の（１）～（７）に示す通りであり、以下に示すヒストンＨ２Ｂ（Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ，６１（１），６１－６９（１９７９））の部分配列と一致した。このことから、ナイロンフィルターで除去されるＨＣＰの一つは、ヒストンＨ２Ｂであることがわかった。

（１）ＫＥＳＹＳＶＹＶＹＫ

（２）ＶＬＫＱＶＨＰＤＴＧＩＳＳＫ

（３）ＳＴＩＴＳＲＥＩＱＴＡＶＲ

（４）ＥＩＱＴＡＶＲ

（５）ＥＩＱＴＡＶＲＬＬＬＰＧＥＬＡＫ

（６）ＬＬＬＰＧＥＬＡＫ

（７）ＬＬＬＰＧＥＬＡＫＨＡＶＳＥＧＴＫ

[0188] [表7]

ヒストンＨ２Ｂアミノ酸配列

ＰＥＰＡＫＳＡＰＡＰＫＫＧＳＫＫＡＶＴＫＡＱＫＫＤＧＫＫＲＫＲＳＲ[ＫＥＳＹＳＶＹＶＹ]
[ＫＶＬＫＱＶＨＰＤＴＧＩＳＳＫ]ＡＭＧＩＭＮＳＦＶＮＤＩＦＺＲＩＡＧＥＡＳＲＬＡＨＹＮ
ＫＲ[ＳＴＩＴＳＲＥＩＱＴＡＶＲＬＬＬＰＧＥＬＡＫＨＡＶＳＥＧＴＫ]ＡＶＴＫＹＴＳＳＫ

（□で囲った配列は、ヒストンＨ２Ｂアミノ酸配列中、マススペクトルデータから予想される上記（１）～（７）のアミノ酸配列と一致するアミノ酸配列範囲を示す。）

請求の範囲

[請求項1] 可溶性トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡを宿主細胞にトランスフェクトして得られた形質転換細胞にて産生される可溶性トロンボモジュリンであって、宿主細胞由来たん白質の含有率が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率である高純度可溶性トロンボモジュリン。

[請求項2] 可溶性トロンボモジュリンが該形質転換細胞を無血清培養することにより産生される可溶性トロンボモジュリンである請求項１に記載の高純度可溶性トロンボモジュリン。

[請求項3] 該宿主細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞である請求項１又は２に記載の高純度可溶性トロンボモジュリン。

[請求項4] 該可溶性トロンボモジュリンが、下記の（１）～（５）の性質を有する可溶性トロンボモジュリンである請求項１～３のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン；

（１）トロンビンと選択的に結合する作用、

（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用、

（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、

（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用、及び

（５）抗炎症作用。

[請求項5] 該可溶性トロンボモジュリンの分子量が５０，０００から８０，０００の範囲である請求項１～４のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン。

[請求項6] 該高純度可溶性トロンボモジュリンが以下の工程を含む方法により製造される請求項１～５のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン；

（ａ）可溶性トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡを宿主細胞にトランスフェクトして形質転換細胞を取得する工程、

（ｂ）該形質転換細胞を培養して可溶性トロンボモジュリンを含む溶液を取得する工程、及び

（ｃ）該可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させ、宿主細胞由来たん白質の含有率が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率である高純度可溶性トロンボモジュリンを得る工程。

[請求項7] 該可溶性トロンボモジュリンが、

（ｉ）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列における第３６７～４８０位のアミノ酸配列を含み、かつ下記（ｉｉ－１）又は（ｉｉ－２）のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであって、該ペプチドが下記の（１）～（５）の性質を有する可溶性トロンボモジュリンである請求項１～６のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン；

（ｉｉ－１）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列における第１９～２４４位のアミノ酸配列、又は

（ｉｉ－２）上記（ｉｉ－１）のアミノ酸配列の１つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列、

（１）トロンビンと選択的に結合する作用、

（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用、

（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、

（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用、及び

（５）抗炎症作用。

[請求項8] 該可溶性トロンボモジュリンが、

（ｉ－１）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列における第１９～５１６位のアミノ酸配列、又は

（ｉ－２）上記（ｉ－１）のアミノ酸配列の１つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列

のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチドであって、該ペプチドが

下記の（１）～（５）の性質を有する可溶性トロンボモジュリンである請求項１～６のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン；

（１）トロンビンと選択的に結合する作用、

（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用、

（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、

（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用、及び

（５）抗炎症作用。

[請求項9] 該可溶性トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡが、配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするＤＮＡである請求項１～６のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン。

[請求項10] 請求項１～９のいずれかに記載の高純度可溶性トロンボモジュリン及び薬学上許容される担体を含有する医薬組成物。

[請求項11] 宿主細胞由来たん白質の含有率が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率である高純度可溶性トロンボモジュリンの製造方法であって、可溶性トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡを宿主細胞にトランスフェクトして得られた形質転換細胞が産生する可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロン及び／又はポリエーテルスルホンに接触させる工程を含む製造方法。

[請求項12] 該形質転換細胞を無血清培養して可溶性トロンボモジュリンを産生する請求項１１に記載の製造方法。

[請求項13] 該可溶性トロンボモジュリンが、下記の（１）～（５）の性質を有する可溶性トロンボモジュリンである請求項１１又は１２に記載の高純度可溶性トロンボモジュリンの製造方法；

（１）トロンビンと選択的に結合する作用、

（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用、

（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、

（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用、及び

（５）抗炎症作用。

[請求項14] 該宿主細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞である請求項１１～１３のいずれかに記載の製造方法。

[請求項15] 該可溶性トロンボモジュリンの分子量が５０，０００から８０，０００である請求項１１～１４のいずれかに記載の製造方法。

[請求項16] 該可溶性トロンボモジュリンが、

（ｉ）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列における第３６７～４８０位のアミノ酸配列を含み、かつ下記（ii－１）又は（ii－２）のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであって、該ペプチドが下記の（１）～（５）の性質を有する可溶性トロンボモジュリンである請求項１１～１５のいずれかに記載の製造方法；

（ii－１）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列における第１９～２４４位のアミノ酸配列、又は

（ii－２）上記（ii－１）のアミノ酸配列の１つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列、

（１）トロンビンと選択的に結合する作用、

（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用、

（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、

（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用、及び

（５）抗炎症作用。

[請求項17] 該可溶性トロンボモジュリンが、

（ｉ－１）配列番号９又は配列番号１１のいずれかに記載のアミノ酸配列における第１９～５１６位のアミノ酸配列、又は

（ｉ－２）上記（ｉ－１）のアミノ酸配列の１つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列

のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチドであって、該ペプチドが

下記の（１）～（５）の性質を有する可溶性トロンボモジュリンである請求項１１～１５のいずれかに記載の製造方法；

（１）トロンビンと選択的に結合する作用、

（２）トロンビンによるプロテインＣの活性化を促進する作用、

（３）トロンビンによる凝固時間を延長する作用、

（４）トロンビンによる血小板凝集を抑制する作用、及び

（５）抗炎症作用。

[請求項18] 該可溶性トロンボモジュリンをコードする塩基配列を包含するＤＮＡが、配列番号９又は配列番号１１に記載のアミノ酸配列をコードするＤＮＡである請求項１１～１５のいずれかに記載の製造方法。

[請求項19] ナイロン及び／又はポリエーテルスルホンの形態がろ過膜の形態である請求項１１～１８のいずれかに記載の製造方法。

[請求項20] ろ過膜の膜面積が宿主細胞由来たん白質１ｍｇに対して０．０１から０．５m^2である請求項１９に記載の製造方法。

[請求項21] ナイロン及び／又はポリエーテルスルホンがナイロンである請求項１１～２０のいずれかに記載の製造方法。

[請求項22] 宿主細胞由来たん白質の含有率が可溶性トロンボモジュリン１０，０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率である高純度可溶性トロンボモジュリンの製造方法であって、

（ａ）配列番号９又は配列番号１１に記載のアミノ酸配列をコードするＤＮＡを宿主細胞にトランスフェクトして形質転換細胞を取得する工程、

（ｂ）該形質転換細胞を培養して可溶性トロンボモジュリンを含む溶液を取得する工程、

（ｃ）該可溶性トロンボモジュリンを含む溶液を総たん白質中トロンボモジュリン純度９９％以上に精製する工程、及び

（ｄ）該可溶性トロンボモジュリンを含む溶液をナイロンに接触させ、宿主細胞由来たん白質の含有率が可溶性トロンボモジュリン１０，

０００Ｕに対して１０ｎｇ未満の比率である高純度可溶性トロンボモジュリンを単離する工程

を含む製造方法であって、前記宿主細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞である請求項１１～２１のいずれかに記載の製造方法。