

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 1/18

C07K 1/20 C07K 1/22

C07K 14/755 A61K 38/37



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94194020.9

[43] 授权公告日 2003 年 5 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1109045C

[22] 申请日 1994.9.30 [21] 申请号 94194020.9

[30] 优先权

[32] 1993.11.4 [33] DE [31] P4337573.1

[86] 国际申请 PCT/EP94/03258 1994.9.30

[87] 国际公布 WO95/12609 德 1995.5.11

[85] 进入国家阶段日期 1996.5.3

[71] 专利权人 奥克塔法马有限公司

地址 瑞士兰琴

[72] 发明人 A·斯特兰卡 M·A·斯塔德勒

D·约斯克

[56] 参考文献

EP286323A 1988.03.31 C07K3/20

审查员 刘菊芳

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 6 页

[54] 发明名称 一种通过层析法制备含因子 VIII 的病毒灭活级分的方法

[57] 摘要

一种通过层析方法制备含因子 VIII 的病毒灭活级分的方法, 其中一从冷沉淀物或血液血浆开始一可能随后用氢氧化铝处理, 在冷沉淀物溶解后至少进行使用膜层析的一个分离步骤。对该级分进行病毒灭活并优选进行附加的巴氏灭菌步骤。所述膜层析步骤在由多孔亲水聚合物制成的膜或致密盘上进行, 其中多孔亲水聚合物是聚甲基丙烯酸缩水甘油酯或亲水聚苯乙烯。

ISSN 1008-4274

1. 通过层析方法制备含因子VIII的病毒灭活级分的一种方法，其中—从冷沉淀物或血液血浆开始—可任选随后用氢氧化铝处理，在冷沉淀物溶解后通过用二或三烷基磷酸盐和非离子表面活性剂处理所述级分进行病毒灭活，随后至少采用一个膜层析分离步骤，该步骤在由多孔亲水聚合物制成的膜或致密盘上进行，其中多孔亲水聚合物是聚甲基丙烯酸缩水甘油酯或亲水聚苯乙烯。

2. 按照权利要求 1 的方法，其中所述分离步骤在膜内或膜上排列的离子交换材料，特别是阴离子交换材料的膜上发生。

3. 按照权利要求 1 和/或 2 的方法，其中病毒灭活是通过巴氏灭菌步骤进行的，任选随后进行使用膜层析的分离步骤。

4. 按照权利要求 1 的方法，其中所述膜层析在对因子VIII具有高亲和力的材料上进行。

5. 按照权利要求 1 的方法，其中对因子VIII具有高亲和力的该材料被具有高和/或低分子量的配基修饰。

6. 按照权利要求 5 的方法，其中所述材料被针对因子VIII的抗体修饰。

7. 按照权利要求 4 的方法，其中这种对因子VIII具有高亲和力的被修饰的材料带有对因子VIII具有高亲和力的固定配基。

8. 按照权利要求 1 的方法，其中该层析材料能够与待分离的因子VIII起相互疏水作用，或带有介导相互疏水作用的相关配基。

9. 按照权利要求 1 的方法，其中待提纯的该样品被以具有对应于 0 至 150mM 氯化钠的低离子强度的水溶液的形式加样至含离子交换材料的膜上，任选用具有对应于 200 至 400mM 氯化钠溶液的较高离子强度的水溶液洗涤，然后用具有对应于 500 至 1500mM 氯化钠溶液的高离子强度的水溶液洗脱，而 pH 值维持在 4 至 9。

10. 按照权利要求 1 的方法，其中待提纯的该样品溶于允许因子VIII结合于抗因子VIII的抗体的溶液而上样，上面带有被吸附的因子VIII的亲膜被任选地洗涤，然后用相当于 1 至 6M 尿素的浓度的离液剂或用相应地更高浓度的盐溶液洗脱。

11. 按照权利要求 1 方法，其中将被提纯的该样本被以具有相当于高至 4M 硫酸铵或高至 5M 氯化钠的离子强度的溶液加样至在其表面

带有疏水配基的膜上，并用具有较低离子强度的溶剂系统洗脱。

12. 按照权利要求 1 方法，其中含因子VIII的该被洗脱级分被浓缩，灌装和/或冻干。

13. 按照权利要求 1 方法，其中所述病毒灭活是通过用重量比最
5 多达 15% 的去垢剂处理进行的。

一种通过层析法制备含因子VIII的
病毒灭活级分的方法

本发明涉及一种通过层析法制备含因子VIII的一种病毒灭活级分的方法，以及一种可通过按照本发明的方法得到的含因子VIII的级分。

因子VIII是一种在血凝中起重要作用的至关重要物质。血凝疾患因此可通过施用因子VIII治疗。因而，对可施用的因子VIII制剂的需求很大。已作了很多尝试以便从自然来源分离高度富含形式的因子VIII。因此，用于从冷沉淀物提纯因子VIII的层析法已是公知的。冷沉淀物是对血浆进行冷沉淀得的一种成分。EP 367 840 B1涉及一种从血浆中分离因子VIII而不预先进行冷沉淀的层析法。在经离子交换基团修饰的亲水性材料上经层析分离法分离该含因子VIII的成分。EP 0 238 701涉及一种用于制备超纯的、易传播的抗血友病因子的方法，其中经预处理的级分是一种用乙醇沉淀法从纤维蛋白原、球蛋白、白蛋白和其它干扰成分中分离的冷沉淀物。欧洲专利申请 88 108 458.6描述了在冷沉淀物级分的病毒灭活后用离子交换器层析进行分离。EP 0 173 242 A描述了在仅基于碳水化合物阴离子交换材料上通过层析法取得因子VIII制剂的方法，该碳水化合物基质被DEAE基团修饰。特别地，DEAE sepharose和DEAE纤维素按照用途被描述。在GB - A - 1 178 958中，描述了一种使用ECTEOLA纤维素柱的因子VIII提纯法。该被修饰的纤维素包含由表氯醇和三乙醇胺反应引入的基础物质。上述先有技术应用批量层析或柱层析的形式进行层析分离。

虽然用这些方法得到了相当好的结果，为经济的和伦理的原因还希望增加有生物学上价值的因子VIII的产量。

因此，构成本发明基础的技术问题在于提供一种方法，该方法从先有技术出发，能够在使因子VIII的制备在产量和生物活性方面得到提高。

令人惊异地，该问题已得到解决。以冷沉淀物或血液血浆为出发材料，可选择随后进行氢氧化铝处理，将冷沉淀物溶解后使用膜层析法进行分离。

本发明涉及方法的实施可采用商品冷沉淀物或血液血浆。优选地，将解冻的冷沉淀物用氢氧化铝处理，目的是对样品进一步预提纯以便预浓缩因子VIII。

在实际进行层析纯化之前，对排列在膜内或膜上的材料进行病毒灭活。该病毒的灭活按照在 EP 1 317 40 A1 中描述的方法通过用生物相容的有机溶剂（去垢剂），Triton® × 100/TNBP，优选吐温®/TNBP（三 - n - 丁基磷酸盐）处理而进行。采用 Natriumcholal/TNBP 也得到很好的结果。优选地，去污剂的用量最多达 15% 重量比。

为提纯样品中的因子VIII，层析步骤可在经离子交换基团，特别是阴离子交换剂修饰的基础材料上进行，或在经免疫亲和配基修饰的材料上进行。关键的是，所述这些材料都是排列在膜上的优选地，这些膜由基底材料如经修饰的纤维素或塑料纤维制成。特别适用的是由多孔的多聚物聚甲基丙烯酸缩水甘油酯和/或其它具有类似结构的多孔亲水聚合物和亲水聚苯乙烯所制成的膜，和致密盘。

在第一种情况，适用于分离的膜或者由用纤维素或塑料纤维

制成的堆积的薄膜组成，或者在第二种情况下它由用二氧化硅凝胶或多聚物载体制成的致密盘组成。该膜或盘的基底材料提供相应的阴离子交换基团或免疫亲和配基。特别地，阴离子交换基团如季胺或二乙胺乙基基团被当作离子交换基团。阳离子交换剂一般采用弱的和强的酸性阳离子交换剂，例如被磺酸或磷酸基团修饰的材料。

该离子交换基团可结合在基底材料纤维上，带或不带所谓的隔离物。提供隔离物的材料也被称为触须材料 (Tentakelmaterial)。在 DE 42 04 694 中提到了相应的隔离物和配基。例如，一种糖胺残基也可用作一个隔离物。阴离子交换基团如 DEAE 或季胺也可结合在由多孔多聚物聚甲基丙烯酸缩水甘油酯或其它被提及的材料制成的膜上。该阴离子交换基团的结合可直接在形成膜的材料上，也可通过一个隔离物如糖胺残基发生。

在本发明涉及的方法的另一实施方案中，使用了应用具有对因子 VIII 的高度亲和性的固定物质的亲和膜层析法。特别地，可能采用单克隆和/或多克隆抗体或抗体的因子 VIII 结合片段 (免疫亲和膜层析)。优选该抗体来自人或鼠。

对因子 VIII 具亲和性的物质借助于化学性质活泼的基团被固定在载体上。优选地，该活泼的基团将攻击隔离物的末端面非直接攻击载体材料。对因子 VIII 的该物质的固定通过在活泼的基团例如甲苯磺酸，tresyl，酰肼和其它的结合而发生。相应的方法见于 T. M. philips “层析法” (E. Heftmann, 编) 第 5 版; Elsevier, 阿姆斯特丹 1992 中的“亲和层析法”。

该抗体也可在带有蛋白 A 或蛋白 G 配基的膜上被预吸附。通过随后的共价交联，可避免抗体的洗脱 (流出柱子)。为在蛋白 A

或蛋白 G 膜上交联该抗体可使用与松驰的载体类似的方法。在蛋白 A 或蛋白 G 上固定的优点是该抗体仅被固定在分子的恒定片段 (Fc)。因此, 该抗原结合部分 (Fab) 保持游离并且其与因子 VIII 的相互作用未被妨碍。

在另一项优选的实施方案中, 疏水相互反应的材料被保证用于分离因子 VIII。所使用的疏水材料为开环的和/或环烷基链, 例如 C₁ 至 C₁₈ 烷基链, 和芳香族化合物。提供疏水相互反应的合适物质优选那些具有分级的疏水性者。疏水性可通过引入极性基团, 例如质子极性或非质子极性基团, 如羟基、胺基、氰基来分级。优选地, 根据相应的分离条件选用。

也可通过热处理进行病毒灭活。优选地, 含因子 VIII 的该被洗脱样品经第一次膜层析步骤后进行巴氏消毒步骤。在 P 43 18 435.9 中已提出一个相应的步骤。其中, 富含因子 VIII 的级分在稳定剂存在下接触二或三烷基磷酸盐和可任选的湿润剂, 并同时或随后在 55 °C 至 67 °C 范围的升高的温度下被处理 5 小时至 30 小时。将两种病毒灭活的方法, 即用热和去垢剂处理, 结合起来可能是有利的。

为了去除在巴氏灭菌步骤中置入的化学物质, 可随后进行第二次膜层析。优选地, 采用经 DEAE 或季铵化合物修饰的膜分离添加的稳定剂, DEAE 和季铵化合物膜经隔离物排列在层析载体物质表面。另外, 有可能将相应配基排列在没有隔离物的载体材料表面。在选择条件下该稳定剂不被这种阴离子交换材料阻滞, 而因子 VIII 被吸附在该层析材料上。

然后用有梯度上升的盐浓度的水溶剂系统洗脱因子 VIII。

这样使用常规的方法, 将取得的含因子 VIII 的级分浓缩, 灌装必要时冻干。

优选地采用从具有低离子强度的溶液上样进行第一次膜层析分离步骤中分离得到的因子VIII。优选地，该水性系统具有相当于0至150mM氯化钠溶液的离子强度。在这样的离子强度下，因子VIII仍被吸附在层析材料上，而更弱地结合的杂质在具有相同离子强度的水性系统的洗脱下被洗掉。

本发明相关方法另一实施方案中，可使用具有相当于200至400mM氯化钠溶液的离子强度的水性系统进行被吸附的材料的提纯。然后用具有相当于500至1500mM氯化钠溶液的离子强度的水性系统进行因子VIII的解吸和该级分的洗脱，而pH维持在4至9的范围内。如果进行阳离子层析，优选在pH值小于6进行，而阴离子交换层析则宜在6以上的较高pH值下进行。

如果因子VIII的提纯是用免疫亲和膜层析法进行的，则，与使用离子交换材料的上述方法不同，洗脱是用离液剂（chaotropen reagenzien）或高浓度盐溶液进行的。优选地，在足以破坏对因子VIII具高亲和性的物质和因子VIII本身之间结合的高液剂或盐浓度下进行洗脱。在相应洗部系统中所述物质的浓度取决于因子VIII和其相应结合成分间的亲合力的强度。优选地，具有不太高的亲和力的抗体被用作免疫亲和配基。作为结果是，在具有较低变性能力的水性溶液条件下可发生洗脱。优选地，具有1至6M尿素，特别是2至4M尿素浓度的水性溶液，或相应的高浓度的盐溶液被用于从免疫亲和膜上洗脱因子VIII。

在疏水相互反应层析中，样品被加至具有很高离子强度的水性溶液中，如，高浓度的硫酸铵（高至4M的浓度）或氯化钠（高至5M的浓度）。特别地，洗脱是用较低离子强度的盐溶液梯度地或线性地进行。含有有机溶剂的水性溶液，特别是稀释的酒精溶液，也可为具有较低离子强度的溶液用于在疏水交叉反应膜层析

中样品的洗脱。

本发明相关的方法令人惊异地保证了一种因子VIII的快速和不复杂的提纯，并同时得到高纯度和高产率。另外，如此得到的因子VIII的比活很高，是因为本发明相关的方法中活性因子的低变性。因此，通过本发明相关的方法能得到的含因子VIII级分是本发明的一个目标。