

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102459583 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 16

(21) 申请号 201080025034. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 06. 04

C12N 9/64 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 9/74 (2006. 01)

09/02723 2009. 06. 05 FR

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 12. 05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2010/052497 2010. 06. 04

(87) PCT申请的公布数据

W02010/140140 FR 2010. 12. 09

(71) 申请人 法国分馏学和生物学实验室

地址 法国雷祖里

(72) 发明人 雅克·沙巴

(74) 专利代理机构 北京邦信阳专利商标代理有

限公司 11012

代理人 黄泽雄

权利要求书 2 页 说明书 23 页 附图 5 页

(54) 发明名称

凝血酶原复合体组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于制备包含 II、VII、IX 和 X 凝血因子的凝血酶原复合体的组合物或浓缩物的方法,其中该方法包括以下步骤:提供血浆冷沉物的上清液;将该上清液应用在阴离子交换树脂上,以产生包含该复合体和具有高分子量的蛋白质的洗脱物;将该洗脱物应用在羟基磷灰石柱上,以产生包含该复合体的第二洗脱物。本发明还涉及可以通过该方法产生的组合物。

1. 用于制备凝血酶原复合体组合物的方法,其包括以下步骤:
 - a) 提供血浆冷沉物的上清液;
 - b) 将所述上清液应用在阴离子交换树脂上,并洗脱在包含所述复合体和具有高分子量的蛋白质的洗脱物中;
 - c) 将产生自步骤 b) 的洗脱物应用在羟基磷灰石柱上;
 - d) 洗脱在包含所述复合体的洗脱液中。
2. 权利要求 1 的方法,其包括附加的预洗脱步骤 c1), 优选用尤其是浓度从 0.005 ~ 0.05M、有利地从 0.01 ~ 0.05M、有利地从 0.02 ~ 0.05M 和优选为 0.03M 的磷酸钠或磷酸钾缓冲液,在包含于 6.5 和 8.5 之间、优选约为 8 的 pH 值下进行所述预洗脱,所述缓冲液还优选有利地以 0.25M 的浓度包含 NaCl。
3. 前述权利要求中任一项的方法,其中用优选 0.5M 的磷酸钾缓冲液、0.075M NaCl、pH 8 进行步骤 d) 的洗脱。
4. 前述权利要求中任一项的方法,其包括至少一个用于产生自步骤 b) 的洗脱物和 / 或产生自步骤 d) 的洗脱物的病毒灭活的附加步骤。
5. 权利要求 4 的方法,其中优选在存在吐温 (聚山梨酸酯 80)-TnBP 混合物的情况下,优选用 1% (v/v) 聚山梨酸酯 80-0.3% (v/v) TnBP 混合物,以溶剂-去垢剂处理的形式对产生自步骤 b) 的洗脱物进行所述至少一个病毒灭活步骤。
6. 权利要求 4 或 5 中任一项的方法,其包括优选在具有 15 至 100nm 孔隙度的过滤器上、优选在具有 15nm 孔隙度的过滤器上以纳米过滤的形式对产生自步骤 d) 的洗脱物进行的至少一个附加的病毒去除步骤。
7. 前述权利要求中任一项的方法,其在步骤 b) 之后和 / 或步骤 d) 之后包括至少一个附加的渗滤-超滤步骤。
8. 前述权利要求中任一项的方法,其中步骤 b) 包括在两种不同阴离子交换树脂上实施的两个亚步骤。
9. 前述权利要求中任一项的方法,其中步骤 b) 的阴离子交换树脂具有选自二乙氨基乙烷 (DEAE)、聚乙烯亚胺 (PEI) 和四级氨基乙烷 (QAE) 的带正电荷的基团,所述阴离子交换树脂优选属于 DEAE 型。
10. 前述权利要求中任一项的方法,其包括在步骤 b) 之后或步骤 d) 之后加入凝血酶抑制剂,优选抗凝血酶 III 或抗凝血酶 III 和肝素的混合物。
11. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述组合物进一步包含依赖于维生素 K 的其他蛋白质,如蛋白质 C、S 和 Z。
12. 前述权利要求中任一项的方法,其包括最终的附加配制步骤,优选通过冻干和 / 或加入佐剂或可药用载体。
13. 凝血酶原复合体组合物,其可通过权利要求 1 至 11 中任一项的方法获得,且其免疫球蛋白、优选 IgM 的浓度低于 0.1%, 和 / 或其纤维蛋白原浓度低于 0.1%, 和 / 或其纤连蛋白浓度低于 0.1%, 和 / 或其补体因子浓度低于 0.1%。
14. 权利要求 13 的凝血酶原复合体组合物,其 FIX 的平均比活性为每毫克蛋白质至少 4IU。
15. 权利要求 13 或 14 中任一项的凝血酶原复合体组合物,其进一步包含蛋白质 C、蛋

白质 S 和蛋白质 Z。

16. 权利要求 15 的凝血酶原复合体组合物,其中,由因子 II (FII)、因子 VII (FVII)、因子 IX (FIX)、因子 X (FX)、蛋白质 C、蛋白质 S 和蛋白质 Z 组成的依赖于维生素 K 的蛋白质代表了所述组合物总蛋白质的至少 80%、优选 85% 和更优选 90%。

17. 权利要求 13 至 16 中任一项的凝血酶原复合体组合物,其作为药物。

18. 权利要求 13 至 16 中任一项的凝血酶原复合体组合物,其作为用于治疗 and 预防与依赖于维生素 K 的因子的缺乏或与抗维生素 K 的超剂量相关的出血性事故的药物。

19. 权利要求 13 至 16 中任一项的凝血酶原复合体组合物,其作为用于治疗 and 预防与因子 II 或因子 X 的组成性或获得性缺乏相关的出血性事故的药物。

凝血酶原复合体组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于制备包含凝血因子 II、VII、IX 和 X 的凝血酶原复合体的组合物或浓缩物的方法。本发明还提供可通过此方法获得的组合物。

背景技术

[0002] 制备依赖于维生素 K 的蛋白质的浓缩物,更尤其是包含凝血因子 II、VII、IX 和 X 的凝血酶原复合体(也称为 PPSB)的浓缩物是在患有的一种或多种凝血因子缺乏和/或患有某些高分子量蛋白质缺乏的血友病患者中预防或治疗出血性事故的基础。

[0003] 在出血期过程中,患者经受 PPSB 治疗,并因此接受大剂量的通常与 PPSB 共纯化的血浆蛋白质,其可以导致出现继发效应,如过敏性休克、炎症型反应和耐受问题。免疫球蛋白 M 和产生自因子 C3、C4、C5 的活化的因子 C3a、C4a 或 C5a(也称为过敏毒素)的情况尤其如此。因子 C3a、C4a 和 C5a(尤其是 C3a)参与变应性炎症。补体片段 C5a 和 C3a 对肥大细胞和嗜碱性粒细胞的活化实际导致白三烯和组胺的释放,这也是毛细血管通透性增加、支气管收缩增加和血管舒张增加的起因。

[0004] 为了避免在用于纯化维生素 K 依赖性因子的方法过程中形成这些片段,因此优选去除它们各自的前体,即补体系统的因子 C3、C4 或 C5。

[0005] 除了组成 PPSB 的因子 II、VII、IX 和 X 外,至今市售的 PPSB 浓缩物,如 Kaskadil®(来自“Laboratoire **Français** du Fractionnement et des Biotechnologies”)全都包含大比例(约 80%)的污染蛋白质。浓度最大的维生素 K 依赖性蛋白质是凝血酶原或因子 II(就 Kaskadil 中约 35-45Mg/mL 的总蛋白质浓度而言,其浓度在 4.5Mg/mL 的等级)。

[0006] 因此,存在对允许更高的 PPSB 纯度,且能够保留组成它的因子 II、VII、IX 和 X 的活性和各自比例的方法的明显需要。

[0007] 文件 EP-A-0528701(“Association pour l'essor de la transfusion sanguine”)描述了用于制备预期用于治疗用途的人凝血酶,且包括在 DEAE-Sephadex® A50 树脂上纯化血浆冷沉物上清液、再钙化和病毒灭活包含 PPSB 的洗脱物的连续步骤的方法。

[0008] 文件 US-P-4411794 描述了用于纯化凝血因子 II、VII、IX 和 X 的方法,其包括在存在钙离子的情况下用羟基磷灰石型矿物支持物上的硫酸铵吸附血浆沉淀物上清液的步骤,随后是硅胶上的纯化步骤和透析。但是,由此产生的 PPSB 浓缩物似乎包含许多污染蛋白质,不具有所需要的纯度来满足关于血液衍生产品的健康安全性的现有标准。硫酸铵尤其不适合用于治疗用途,且具有相对毒性。

[0009] 文件 US-P-4272523 描述了用于从血浆冷沉物上清液分级分离血浆的方法。此专利尤其描述了通过累加硅胶上的冷沉物上清液吸附步骤、透析/超滤、羟基磷灰石型磷酸三钙上的吸附和 DEAE-Sephadex 型阴离子交换树脂上的吸附来制备 PPSB 浓缩物。但是,用来去除诸如纤维蛋白原的高分子量蛋白质的硅胶上的纯化步骤和磷酸三钙上的纯化步骤似乎以分批吸附(批次)的形式发生,该实施由于其低的可重复性及其自动化的困难而证

明难以应用在工业规模上。事实上,磷酸三钙难于控制,因为它表现为对湿度测量法敏感的粉末和包括可以取决于批次而变的内在特征。因此,文件 US-P-4272523 的方法证明不适合用于大规模制备预期用于治疗用途的 PPSB 浓缩物。

[0010] 文件 EP-A-0832200 描述了用于纯化重组 FXI 的组合物的方法,其包括在阴离子交换树脂上、在肝素树脂上和然后在羟基磷灰石树脂上的连续层析步骤。此文件未涉及凝血酶原复合体的因子,且起始产物是重组因子的组合物,且不是人来源的。

[0011] 文件 W02006/075664 描述了用于纯化重组 FVII 的方法,其包括羟基磷灰石上的层析步骤,不预处理包含重组 FVII 的组合物。

发明内容

[0012] 申请人惊奇地发现,组合了用于制备血浆冷沉物上清液、阴离子交换树脂上的层析和羟基磷灰石上的层析的步骤用于纯化依赖于维生素 K 的蛋白质,尤其是凝血酶原复合体的浓缩物的方法允许工业制备具有高纯度的 PPSB 浓缩物。通过本发明制备的 PPSB 基本上无任何污染蛋白质,且它所包含的因子 II、VII、IX 和 X 具有高比活性。本发明的方法最尤其是因所实施的纯化步骤的减少的数目和可重复性,及因用羟基磷灰石层析包含诸如纤维蛋白原、纤连蛋白、免疫球蛋白、补体蛋白质的高分子量蛋白质的洗脱物而区别于至今已知的纯化方法。

[0013] 本发明的目的是用于制备凝血酶原复合体组合物的方法,其包括以下步骤:

[0014] a) 提供血浆冷沉物的上清液;

[0015] b) 将该上清液应用在阴离子交换树脂上,并洗脱在包含该复合体和高分子量蛋白质的洗脱物中;

[0016] c) 将产生自步骤 b) 的洗脱物应用在羟基磷灰石柱上;

[0017] d) 洗脱在包含该复合体的洗脱液中。

[0018] 在优选实施方案中,本发明的方法包括附加的预洗脱步骤 c1), 优选用尤其是浓度为从 0.005 至 0.05M、有利地从 0.01 至 0.05M、有利地从 0.02 至 0.05M 和优选为 0.03M 的磷酸钠或磷酸钾缓冲液,在包含在 6.5 和 8.5 之间、优选约为 8 的 pH 值下进行该预洗脱,该缓冲液还包含 0.25M NaCl。

[0019] 更优选地,用优选 0.5M 的磷酸钾缓冲液、0.075M NaCl、pH 8 进行步骤 d) 的洗脱。

[0020] 有利地,本发明的方法包括用于产生自步骤 b) 的洗脱物和 / 或产生自步骤 d) 的洗脱物的病毒灭活的至少一个附加步骤。在优选实施方案中,优选在存在吐温 (聚山梨酸酯 80)-TnBP 混合物的情况下,优选用 1% (v/v) 聚山梨酸酯 80-0.3% (v/v) TnBP 混合物,以溶剂-去垢剂处理的形式对产生自步骤 b) 的洗脱物进行该至少一个病毒灭活步骤。在具体实施方案中,以 UV-C (紫外线 C) 处理、辛酸盐离子处理和 / 或干热处理进行该至少一个病毒灭活步骤。有利地,通过以具有包含在例如 15nm 和 100nm 之间的孔隙度的一个或几个过滤器上、优选具有例如 15nm 孔隙度的至少一个过滤器上、尤其是来自 Asahi 的 Planova 15N 过滤器上的纳米过滤,例如一次或几次纳米过滤,对产生自步骤 d) 的洗脱物进行的病毒去除步骤来完成该至少一个病毒灭活步骤,

[0021] 在具体实施方案中,本发明的方法在步骤 b) 之后和 / 或步骤 d) 之后包括至少一个附加的渗滤-超滤步骤。

[0022] 在具体实施方案中,本发明的方法的步骤 b) 包括在两种不同阴离子交换树脂上实施的两个亚步骤。

[0023] 在具体实施方案中,步骤 b) 的阴离子交换树脂具有选自二乙氨基乙烷 (DEAE)、聚乙烯亚胺 (PEI) 和四级氨基乙烷 (QAE) 的带正电荷的基团,该阴离子交换树脂优选属于 DEAE 型。

[0024] 在具体实施方案中,本发明的方法包括在步骤 b) 之后或步骤 d) 之后加入凝血酶抑制剂,优选抗凝血酶 III 或抗凝血酶 III 和肝素的混合物。

[0025] 在一个实施方案中,通过本发明的方法制备的组合物进一步包含依赖于维生素 K 的其他蛋白质,如蛋白质 C、S 和 Z。

[0026] 在具体实施方案中,本发明的方法包括最终的附加配制步骤,优选通过冻干和/或加入可药用佐剂或载体。

[0027] 本发明还涉及凝血酶原复合体的组合物,其可通过本发明的方法获得,且其免疫球蛋白浓度、优选 IgM 浓度低于 0.1%,和/或其纤维蛋白原浓度低于 0.1%,和/或其纤连蛋白浓度低于 0.1%,和/或其补体因子浓度低于 0.1%。

[0028] 在具体实施方案中,本发明的凝血酶原复合体组合物中 FIX 的平均比活性为每毫克蛋白质至少 4IU。

[0029] 在具体实施方案中,本发明的凝血酶原复合体的组合物进一步包含蛋白质 C、蛋白质 S 和蛋白质 Z。

[0030] 在具体实施方案中,由本发明的凝血酶原复合体组合物的因子 II (FII)、因子 VII (FVII)、因子 IX (FIX)、因子 X (FX)、蛋白质 C、蛋白质 S 和蛋白质 Z 组成的依赖于维生素 K 的蛋白质占该组合物总蛋白质的最大 80%、优选 85% 和更优选 90%。

[0031] 本发明还涉及本发明的凝血酶原复合体组合物作为药物、优选作为用于治疗和预防与依赖于维生素 K 的因子的缺乏或抗维生素 K 的超剂量相关的出血性事故的药物、或作为用于治疗和预防与因子 II 或因子 X 的组成性或获得性缺乏相关的出血性事故的药物用途。

附图说明

[0032] 图 1:因子 II、IX、VII 和 X 的洗脱产率对沉积在羟基磷灰石柱上的蛋白质负载。

[0033] 图 2:未保留在羟基磷灰石柱上的因子 II、IX、VII 和 X 的量对所引入的蛋白质负载。

[0034] 图 3:未结合的 FII 和 FIX 的百分比变化对沉积在羟基磷灰石柱上的蛋白质负载。

[0035] 图 4:对应于在羟基磷灰石上层析期间预洗脱过程中去除的蛋白质的量的 SDS-PAGE 凝胶。对应于来自 HA Biorad 上的层析的预洗脱物和洗脱物的 12% SDS-PAGE 凝胶——非还原——沉积物:10 μ g 蛋白质。孔 1 和 10:分子量标准。孔 2:PI-1。孔 3:测试 3 预洗脱物 0.25M NaCl。孔 4:测试 3 洗脱物。孔 5:测试 5 预洗脱物 0.25M NaCl;30mM 磷酸盐。孔 6:测试 5 洗脱物。孔 7:PI-1。孔 8:测试 6 预洗脱物 0.25M NaCl;30mM 磷酸盐。孔 9:测试 6 洗脱物。

[0036] 图 5:过滤压力对时间的变化。

[0037] 图 6:过滤流速对滤过重量的变化。

[0038] 图 7:无任何还原剂的 4-12% SDS-PAGE Novex 上的电泳——胶体考马斯蓝染色。孔 1:97E 0801-PI-1。孔 2:97E 0801-未吸附的 HA 陶瓷。孔 3:97E 0801-预洗脱。孔 4:97E 0801-洗脱。孔 5:97E 0801-透析洗脱 10kDa。孔 6:97E 0901-15nm 过滤后。孔 7:97E 1401-15nm 过滤后。孔 8:97E 1601-15nm 过滤后。孔 9:97E 1601-最终的 15nm 存留物。孔 10:Novex 分子量对照。

[0039] 图 8:因子 IX 的免疫印迹表征。孔 1:97E 1106-纳米过滤前透析的 HA 洗脱物。孔 2 和 3:97E 1106-PI-1。孔 4:97E 1504-15nm 滤过物。孔 5:因子 IX HP 对照。因子 IX HP 是高纯度的因子 IX,即具有高于 100U/mg 的比活性(表示为每毫克蛋白质的 FIX 单位)的因子 IX 浓缩物。

具体实施方式

[0040] 本发明的用于纯化依赖于维生素 K 的蛋白质,尤其是凝血酶原复合体的方法包括以下步骤:

[0041] a) 提供血浆冷沉物的上清液。在具体实施方案中,可以通过 Cohn 分级分离获得该血浆冷沉物上清液。在此具体情况下,证明有必要避免乙醇变性蛋白质,因此有必要在低温下操作或在进行到蛋白质吸附在羟基磷灰石上之前去除醇。在另一实施方案中,可以通过用硫酸铵盐分级分离来获得该血浆冷沉物上清液。在此具体情况下,证明有必要进行透析,以处于吸附在羟基磷灰石上的最适条件之下;

[0042] b) 将该上清液应用在阴离子交换树脂上,并洗脱在包含该复合体和高分子量蛋白质的洗脱物中;

[0043] c) 将产生自步骤 b) 的洗脱物应用在羟基磷灰石柱上;

[0044] d) 洗脱在包含该复合体的洗脱液中。

[0045] 高分子量蛋白质是具有超过 300、优选超过 200、尤其是超过 160 或甚至超过 100 的以 kDa 表示的 MW 的蛋白质。

[0046] 用于本发明中的羟基磷灰石树脂可以是例如陶瓷-羟基磷灰石(陶瓷 HA)、Biogel HT 等。

[0047] 在优选实施方案中,本发明的方法包括附加的预洗脱步骤 c1), 优选 0.01M 磷酸钾缓冲液、0.25M NaCl、pH 8.0 或 0.03M 磷酸钾缓冲液、0.25M NaCl、pH 8.0 在室温下进行该预洗脱。预洗脱缓冲液的磷酸钾浓度优选从 0.02 至 0.05M 变动,且优选等于 0.03M。预洗脱缓冲液的 pH 值优选从 pH 6.5 至 pH 8.5 变动,且优选等于 pH 8。

[0048] 优选地,用 0.5M 磷酸钾缓冲液、0.075M NaCl、pH 8 进行步骤 d) 的洗脱。洗脱缓冲液的 pH 值优选从 pH 6.5 至 pH 8.5 变动,且优选等于 pH 8。洗脱缓冲液的磷酸钾浓度优选从 0.1M 至 0.5M 变动,且优选等于 0.25M。

[0049] 通过羟基磷灰石柱上,且优选陶瓷羟基磷灰石柱(HA-Biorad)上的层析,有可能去除阴离子交换树脂上的层析步骤 b) 过程中随依赖于维生素 K 的蛋白质(尤其是凝血酶原复合体)洗脱的高分子量蛋白质。通过去除这些高分子量蛋白质,有可能降低或优选去除一般产生自凝血酶原复合体溶液的治疗用途的继发效应。事实上,在羟基磷灰石上的层析过程中去除的高分子量污染蛋白质例如包含补体的某些因子(如 C4),其直接或间接(例如在以过敏毒素的形式切割后)降低患者对目前市售凝血酶原复合体溶液的耐受。申请人

惊奇地发现,通过羟基磷灰石上的单个层析步骤,有可能在无需诸如硅胶上的纯化的预先实施的情况下去除包含在血浆冷沉物上清液中的大部分高分子量污染蛋白质,例如,还去除了诸如纤维蛋白原、纤连蛋白、Ig 的蛋白质。

[0050] 羟基磷灰石上的层析还提供了在它们的纯化过程中不改变依赖于维生素 K 的因子各自的比例的可能性,因为通过本发明的方法获得的凝血酶原复合体浓缩物中因子 II、VII、IX 或 X 之间的比值与见于天然血浆中的比值极其可比。

[0051] 结果是,产生自羟基磷灰石上的层析的凝血酶原复合体组合物(依赖于维生素 K 的蛋白质的浓缩物)被显著富集。相对于蛋白质含量,此凝血酶原复合体组合物或蛋白质浓缩物的含量是约 60%、优选约 70%和更优选约 80%,且因子 II、VII、IX、X 的比活性相对于市售凝血酶原浓缩物,例如 Kaskadil®显著提高(高 4 至 8 倍,优选高 5 倍)。

[0052] 此外,在羟基磷灰石上的层析过程中去除高分子量蛋白质是工业优势,因为从此以后,它允许通过具有 15nm 等级孔隙度的滤器上的纳米过滤来对依赖于维生素 K 的蛋白质的浓缩物进行病毒灭活。否则滤器将由于这类高分子量蛋白质在待过滤的溶液中的存在而快速堵塞。最后,在步骤 b) 的阴离子交换树脂上的层析和步骤 d) 的羟基磷灰石上的层析之间进行通过溶剂-去垢剂处理的病毒灭活时,通过羟基磷灰石上的纯化,有可能基本上去除存在于负载在羟基磷灰石上的蛋白质浓缩物中的全部溶剂和去垢剂。

[0053] 在优选实施方案中,本发明的方法包括用于产生自步骤 b) 的洗脱物和/或产生自步骤 d) 的洗脱物的病毒灭活的至少一个附加步骤。优选地,对产生自步骤 b) 的洗脱物进行的病毒灭活步骤对应优选存在吐温(聚山梨酸酯 80)-TnBP 混合物的情况下、优选使用 1% (v/v) 聚山梨酸酯 80-0.3% (v/v) TnBP 混合物的溶剂-去垢剂处理。在具体实施方案中,以 UV-C(紫外线 C) 处理、辛酸盐离子处理的形式和/或通过干热来进行该至少一个病毒灭活步骤。优选地,本发明的方法可以包括对产生自步骤 d) 的洗脱物进行,且对应于优选至少在具有 15nm 孔隙度的滤器上、优选 Planova15N 滤器(Asahi) 上的至少一次纳米过滤的用于病毒去除的第二步骤。

[0054] 可以藉此去除有包膜病毒和无包膜病毒。

[0055] 因此,本发明的方法可以包括至少一个病毒灭活步骤,该步骤旨在从病毒学的观点保障预期用于治疗性施用的终产物的安全。

[0056] 可以在该方法的任意阶段、且优选在阴离子交换树脂上的纯化后实施用溶剂-去垢剂混合物处理、且允许灭活有包膜病毒的第一病毒灭活步骤。所使用的溶剂-去垢剂混合物可以对应于本领域技术人员已知的任意适宜的混合物,且优选按上文所示组成。溶剂-去垢剂病毒灭活处理一般在基本上为室温的温度(例如 $25 \pm 1^\circ\text{C}$) 下进行几小时(例如 7 小时)的时间。

[0057] 此外,本发明的方法还可以包括通过至少一个具有低孔隙度的滤器上,例如至少一个具有包含在 15nm 和 100nm 之间的孔隙度的滤器上的纳米过滤的至少一个病毒去除步骤。通过这种纳米过滤步骤,更尤其可能就无包膜病毒(脊髓灰质炎病毒或细小病毒类型的病毒)和非常规感染性物质(阮病毒类型)保障终产物的安全。在本发明的方法的范围内,在至少一个具有 15nm 孔隙度的滤器上、优选在至少一个 Planova 15N 滤器(Asahi) 上进行纳米过滤。在具体实施方案中,在至少两个具有不同孔隙度、优选递减孔隙度的滤器上进行纳米过滤。优选在羟基磷灰石上的层析后进行此纳米过滤,因为显著浓度的高分子量

蛋白质（例如纤维蛋白原、纤连蛋白或 IgM）在待过滤的蛋白质提取物中的存在一般导致滤器的堵塞，在工业规模上实施该方法时更甚。

[0058] 产生自包括前述两个病毒灭活步骤的方法的 PPSB 浓缩物证明符合 EMEA 或 FDA 就血浆和生物技术制品提出的国际建议，因为它符合无包膜病毒和裸病毒二者所需的安全性条件。

[0059] 在优选实施方案中，本发明的方法在步骤 b) 之后和 / 或步骤 d) 之后包括至少一个附加的渗滤 - 超滤步骤。

[0060] 在优选实施方案中，本发明的方法包括阴离子交换树脂上的两个层析亚步骤。然后存在附加的步骤 b2)，该步骤包括将步骤 b) 的洗脱物应用于第二阴离子交换树脂上，并洗脱包含高分子量蛋白质的依赖于维生素 K 的蛋白质的浓缩物。优选地，该第二阴离子交换树脂是 DEAE-Sepharose 型树脂，且优选 DEAE-Sepharose FF (Amersham)。DEAE-Sepharose 树脂具有耐受压力以及通常用来消毒和再生凝胶的氢氧化钠处理的优点。

[0061] 在优选实施方案中，本发明的方法包括最终的附加配制步骤，其优选通过冻干和 / 或加入可药用佐剂或载体。在一个实施方案中，配制后获得的产物包含 0.13M NaCl、2g/L 精氨酸、2g/L 赖氨酸、3g/L 柠檬酸钠，且具有从 6.9 至 7.1 的 pH 值。在另一实施方案中，配制后获得的产物包含 10g/L 精氨酸、35g/L 甘露醇，且具有从 6.9 至 7.1 的 pH 值。在另一实施方案中，配制后获得的产物包含 45g/L 甘露醇，且具有从 6.9 至 7.1 的 pH 值。在另一实施方案中，配制后获得的产物包含 1g/L 柠檬酸钠、35g/L 甘露醇，且具有从 6.9 至 7.1 的 pH 值。

[0062] 在优选实施方案中，本发明的方法包括加入凝血酶抑制剂，优选抗凝血酶 III 或抗凝血酶 III 和肝素的混合物的步骤。抗凝血酶可以来源于人血浆或具有重组人来源，例如由 GTC Biotherapeutics 销售的 Atryn[®]。可以在步骤 b) 之后和 / 或步骤 d) 之后进行此加入。优选地，在产生自步骤 b) 的洗脱物的溶剂 - 去垢剂处理之后，或在产生自步骤 d) 的洗脱物的纳米过滤之前进行凝血酶抑制剂的加入。还可以以与针对抗凝血酶提出的那些相同的浓度将肝素的辅因子 II 用作凝血酶抑制剂。

[0063] 通过加入凝血酶抑制剂，有利地有可能防止或限制凝血酶原 (FII) 在本发明的方法过程中实施的纯化步骤中活化为凝血酶。通过本发明的方法获得的依赖于维生素 K 的蛋白质的浓缩物中凝血酶活性的缺乏使得它与在人类中用作治疗性或预防性药物相容，且允许令人满意地保存此浓缩物。

[0064] 优选地，本发明的方法的步骤 b) 的阴离子交换树脂具有选自二乙氨基乙烷 (DEAE)、聚乙烯亚胺 (PEI) 和四级氨基乙烷 (QAE) 的带正电荷的基团。此阴离子交换树脂更优选是由 GE Healthcare 销售的 DEAE-Sephadex A-50[®]。通过步骤 b) 的层析，有可能去除由清蛋白、免疫球蛋白（在某种程度上除了某些 Ig，如 IgM）、抗凝血酶 III 和 α -抗胰蛋白酶组成的蛋白质的一部分（其可以是显著的）。通过逐渐增加离子力来进行吸附在阴离子交换树脂上的血浆蛋白质的回收。

[0065] 在具体实施方案中，然后可以用本领域技术人员熟知的技术，例如在亲和凝胶上独立纯化步骤 d) 之后获得的维生素 K 依赖性蛋白质。

[0066] 本发明还涉及凝血酶原因子（可通过上文所述的方法获得的依赖于维生素 K 的蛋白质）的浓缩物。此蛋白质浓缩物优选包含因子 II、VII、IX 和 X，且具有低于 0.1%（基于

浓缩物总蛋白质水平的百分比)的 IgM 浓度、低于 0.1% (基于浓缩物总蛋白质水平的百分比)的纤维蛋白原浓度、低于 0.1%的纤连蛋白浓度和低于 0.1%的补体因子浓度。优选地,本发明的浓缩物还包含蛋白质 C、S 和 Z,且具有至少 4IU/毫克蛋白质的平均 FIX 比活性。

[0067] 最后,本发明涉及可通过本发明的方法获得的凝血酶原因子的浓缩物作为药物,且更尤其是作为用于治疗 and 预防与依赖于维生素 K 的因子的缺乏,如因子 II 或因子 X 的组成性缺乏,或抗维生素 K 的超剂量相关的出血性事故的药物的用途。

[0068] 通过以下实施例以更详细的方式阐述本发明的方法。这些实施例描述本发明的具体实施方案,不能认为其限制本发明的范围。

[0069] 实施例

[0070] 实施例 1:纯化依赖于维生素 K 的蛋白质的浓缩物所实施的实验条件。

[0071] A- 血浆冷沉物上清液的制备

[0072] 作为起始材料,使用了血浆冷沉物上清液,其是通过在 0-3°C 下冷冻-解冻和离心冷冻的新鲜血浆获得的。

[0073] 为了在低于 4° 的温度下分离主要由因子 VIII、纤连蛋白和纤维蛋白原组成的不可溶性冷沉物,在低于 2°C 的温度下在血浆分级分离上游完成冷沉。

[0074] 通过在接近 +4°C 的温度下连续离心来从上清液分离冷沉物。将离心上清液称为冷上清液 (cryosupernatant)。

[0075] 冷上清液基本上包含清蛋白、免疫球蛋白以及包括由凝血酶原 (因子 II)、因子 VII、因子 IX、因子 X、蛋白质 C、蛋白质 S 和蛋白质 Z 组成的维生素 K 依赖性因子的其他凝血因子。

[0076] B- 阴离子交换树脂上的层析

[0077] 以下步骤包括在吸附在弱阴离子交换凝胶 DEAE Sephadex A-50 (二乙氨基 Sephadex) 上后制备富集维生素 K 依赖性因子的级分。

[0078] 将冷上清液加热至 +10°C 的最低温度 (+16 至 18°C 最佳)。在 DEAE-Sephadex 凝胶上纯化此冷上清液之前,若有必要,可以在 1 μm 过滤器上和然后在 0.5 μm 过滤器上对其进行澄清过滤。

[0079] 纯化的冷上清液的体积通常从 2,000 至 3,000 升。每升纯化的冷上清液使用约 1.5g 干 DEAE-Sephadex。

[0080] 纯化前,膨胀 DEAE-Sephadex 粉末 (3 次洗涤),每次洗涤后在不锈钢网上筛选凝胶。在具有搅拌桨和可以使流体逃逸但保留 DEAE-Sephadex 球珠的罐底删档 (筛) 的容器中,在 0.075M 氯化钠溶液中进行 DEAE-Sephadex 的制备、膨胀和平衡。在室温 (15-25°C) 下进行 DEAE-Sephadex 的膨胀操作。

[0081] 通过测量流出物的重量摩尔渗透压浓度来控制最终的凝胶平衡。

[0082] 在平衡所提供的流速后,以 400kg/小时的流速将 17±1°C 的优选温度下的冷上清液连续送至经膨胀和平衡的 DEAE-Sephadex 上。

[0083] 从而伴随连续搅拌,使全部冷上清液与 DEAE-Sephadex 接触,允许依赖于维生素 K 的因子在凝胶上不断结合。

[0084] 然后以每 2,200 升纯化的冷上清液 140 升缓冲液的量用包含 0.2MNaCl、10mM 柠檬

酸, pH 7 的缓冲液洗涤凝胶 3 次。

[0085] 以每 2, 200 升纯化的冷上清液 75 升缓冲液量, 利用 2M NaCl、10mM 柠檬酸、pH 7 的缓冲液完成依赖于维生素 K 的蛋白质 (和与它们共纯化的高分子量蛋白质) 的洗脱。

[0086] 然后通过常规手段脱盐洗脱过程中获得的蛋白质级分, 即通过用具有 10kDa 和可选地 30kDa 截留阈值的盒超滤, 并对 pH 7 的 0.15M NaCl、10mM 柠檬酸缓冲液透析。

[0087] 在本申请的范围内, 将产生自 DEAE-Sephadex 上的纯化的蛋白质洗脱物称为“PPSB 中间产物 1”或“PPSB-PI-1”。

[0088] 在纯化方法的此阶段, 证明有可能冷冻 PPSB-PI-1, 同时等待此阶段的产生自 DEAE-Sephadex 的洗脱物的其他纯化步骤的实施。

[0089] C- 溶剂 - 去垢剂处理病毒灭活

[0090] 然后通过用溶剂 - 去垢剂混合物处理, 更具体而言, 通过用 (1% v/v) 聚山梨酸酯 80-(0.3% v/v) 磷酸三正丁酯 (TnBP) 处理来对 PPSB-PI-1 进行病毒灭活。在从 24 至 25°C 的温度下进行病毒灭活处理至少 6 小时的时间。

[0091] 在 15 ~ 30°C 但优选约 25°C 的温度下, 在存在 TnBP 的情况下, 可以将其他去垢剂用作聚山梨酸酯的替代物, 如浓度在 0.5 ~ 2% 的范围内的胆酸酯或辛苯聚醇 (Triton X100)。进行病毒灭活的最少孵育时间是 4 小时, 但此孵育可以延长至 12 小时。一般应用的 pH 值在 6 ~ 8 的范围内, 总蛋白质浓度在 10 ~ 40g/L 的范围内。

[0092] D- 羟基磷灰石 HA 上的层析

[0093] D. 1- 凝胶的填充

[0094] 所使用的层析凝胶是具有 40 微米的粒径的大量制备陶瓷羟基磷灰石 (Biorad)。将干凝胶悬浮在 pH 6.8 的 0.4M 磷酸盐缓冲液中, 然后转入 Pharmacia K50/30 柱。以 100cm/h 的流速完成填充。所使用的量是 30g 干凝胶, 其提供 50mL 填充凝胶的柱。用 5 个柱体积的 2M NaOH 漂洗柱, 并保存在 2M NaOH 中。

[0095] D. 2- 待注射至柱上的 PPSB-PI-1 的制备

[0096] 若有必要, 解冻 PPSB-PI-1, 并在存在 1% 聚山梨酸酯 80 和 0.3% TnBP 的情况下进行 3 小时的病毒灭活。然后可选地用 20mM 苄脒溶液 1/2 稀释经病毒灭活的 PPSB-PI-1; 用 0.1M NaOH 调节溶液 pH 值至 8。

[0097] D. 3- 层析:

[0098] 将柱连接至具有工业检测单元的 Pharmacia UV 检测器, 并在 280nm 记录流出物的光密度。用 5 体积的预平衡缓冲液 (0.4M 磷酸钾、pH 6.8) 洗涤保存在 2M NaOH 中的凝胶。

[0099] 然后用 15 体积的平衡缓冲液 (0.01M 磷酸钾、0.075M NaCl、10mM 苄脒 (可选)、pH 8) 平衡柱。然后以 100cm/h 的流速注入 PPSB 溶液, 并用平衡缓冲液洗涤柱, 直至回到基线。

[0100] 用预洗脱缓冲液 (0.01M 磷酸钾、0.25M NaCl、10mM 苄脒、pH 8 或 0.03M 磷酸钾、0.25M NaCl、苄脒 10mM (可选)、pH 8) 以相同的流速进行预洗脱, 并收集 5 个柱体积的预洗脱物。然后用 15 体积的相同缓冲液洗涤凝胶。

[0101] 用洗脱缓冲液 (0.5M 磷酸钾、0.075M NaCl、10mM 苄脒 (可选)、pH 8) 以相同的流速进行洗脱, 并收集 5 个柱体积的洗脱物。用 5 个柱体积的 2M NaOH 再生凝胶, 并保存在 2M NaOH 中。

[0102] E- 超滤和透析

[0103] 对产生自羟基磷灰石上的层析的洗脱物进行在具有 10kDa 截留阈值的 0.1m² Sartorius ultrasart slice 聚砜盒上完成的超滤。

[0104] 将洗脱物浓缩 3 倍,并以恒定体积对纯化注射用水 (pwi) 透析,直至获得 70 欧姆的电阻率 (盒上的入口压力为 0.5 巴,超滤流速为 45mL/分钟),然后以恒定体积对 5 体积的透析缓冲液 (3g/L 柠檬酸三钠、0.13MNaCl、2g/L 赖氨酸、2g/L 精氨酸、pH 7) 透析。然后再浓缩产物两次,并用透析缓冲液漂洗盒,以获得等于起始体积的 80% 的终体积。最后冷冻产物并保存在 -40°C,若需要,随后可以在具有 15nm 孔隙度的滤器上过滤。

[0105] F- 测定

[0106] 测定 (通过测量诱导凝固的能力) 组成凝血酶原复合体 (或 PPSB) 的凝血因子 II (FII)、因子 VII (FVII)、因子 IX (FIX) 和因子 X (FX) 的量和 / 或浓度,并测量凝血酶活性。

[0107] 还利用由 Stago 销售的试剂盒 Asserachrom[®] Total Protein S 和 Asserachrom[®] Protein C 测定了 C、S 蛋白质的量和 / 或浓度。

[0108] 利用由 Stago 销售的试剂盒 Asserachrom[®] VII:Ag、Asserachrom[®] IX:Ag、Asserachrom[®] X:Ag、Asserachrom[®] Protein Z, 通过 ELISA 完成因子 VII、IX、X 和蛋白质 Z 的抗原测定。

[0109] 测量了聚山梨酸酯 80 和 TnBP 的量和 / 或浓度。

[0110] 实施例 2 : 实验结果

[0111] A : 柱容量的研究

[0112] 在与上文所述的那些相同的实验条件下,用每毫升凝胶 3、5、7 和 9mL 经病毒灭活的 PPSB-PI-1 的剂量测试了羟基磷灰石柱的容量。未进行预洗脱。

[0113] 针对各因子计算的产率对应于产生自羟基磷灰石的洗脱物中的凝固单位总量与 PPSB-PI-1 中的凝固单位总量之比。按照负载获得的产率详述于以下表 I 中 :

[0114] 表 I- 因子 II、IX、VII 和 X 取决于凝胶上的负载的洗脱产率

[0115]

柱负载 mL PPSB-PI-1/mL 凝胶	FII 产率 (%)	FVII 产率 (%)	FIX 产率 (%)	FX 产率 (%)
3	88	103	112	92
5	91	111	111	79
7	108	88	106	69
9	93	85	96	57

[0116] 这些数据图示在图 1 中。观察到了 FX 的结合对负载的明显减少。

[0117] 针对各因子计算的未结合的因子的百分比对应于未结合级分中的凝固单位总量与起始 PPSB-PI-1 中的凝固单位总量之比。未结合的因子的百分比总结在表 II 中。

[0118] 表 II : 未保留在凝胶上的因子 II、IX、VII 和 X 的量对负载。

[0119]

柱负载 mL PPSB-PI-1/mL 凝胶	未结合的 FII (%)	未结合的 FVII (%)	未结合的 FIX (%)	未结合的 FX (%)
3	<1	<1	<1	5
5	3	<1	<1	14
7	11	5	<1	26
9	18	8	<1	35

[0120] 这些数据图示在图 2 中。在此图中, FII 和 FX 是在羟基磷灰石柱上结合较少的因子似乎更明显。

[0121] 此外, 图 3 显示, 对于这两种因子 (FII 和 FX), 未结合的因子的百分比随负载线性变化。保留了 FII 和 FX 的结合仍可接受的每毫升凝胶 5mL PPSB-PI-1 负载。

[0122] B- 预洗脱的影响

[0123] 以去除尽可能多的污染蛋白质为目的, 测试了 30mM 磷酸盐缓冲液的预洗脱。优选 20 ~ 40mM、更优选 30mM 的磷酸盐缓冲液进行这种预洗脱, 以至于已从 50mM 的磷酸盐浓度观察到了因子 II 和 VII 的洗脱。操作条件与上文所述的那些一致, 所使用的蛋白质负载是每毫升凝胶 5mL PPSB-PI-1。

[0124] 在预洗脱物中未能检测到凝血因子。因此, 如以下结果所示, 产率不受此预洗脱影响。

[0125] 表 III: 洗脱物中因子 II、XII、VII 和 X 的量对所完成的预洗脱的类型

[0126]

测试号	预洗脱	FII:C(%)	FVII:C(%)	FIX:C(%)	FX:C(%)
3	0.25 M NaCl	83	86	86	68
4	0.25 M NaCl	88	103	112	92
5	0.25 M NaCl、30 mM 磷酸盐	95	80	93	69
6	0.25 M NaCl、30 mM 磷酸盐	80	81	79	72

[0127] 表 IV: 磷酸盐预洗脱过程中去除的共纯化蛋白质的量。

[0128]

测试号	30 mM 磷酸盐预洗脱物 中的总蛋白质 (mg)	洗脱物中的总 蛋白质 (mg)
3 (无磷酸盐预洗脱)	5	1218
4 (无磷酸盐预洗脱)	0	916
5	44	964
6	68	897
7	52	1078
8	58	1013
9	57	1061
10	62	1061
11	62	1125
12	68	1166

[0129]

[0130] 如 SDS-PAGE 凝胶 (见图 4) 所示,用 30mM 磷酸盐缓冲液进行的预洗脱进一步允许去除大量伴随蛋白质,尤其是高分子量 (100 ~ 200kD) 蛋白质。

[0131] E- 加入抗凝血酶和肝素的影响

[0132] 为了在纯化过程中保持蛋白质提取物中的低凝血酶活性,超滤前向羟基磷灰石层析洗脱物中加入浓度为 0.5U/mL (优选浓度为 0.1-0.04 单位抗凝血酶 / 单位 FIX) 的纯化的抗凝血酶和 2U/mL 的肝素。实验条件与上文所述的条件相同,在 30mM 磷酸盐缓冲液中进行预洗脱。柱负载为每毫升凝胶 5mL PPSB。

[0133] E1- 羟基磷灰石上纯化后透析的洗脱物中的 FII、FX、FVII 和 X 活性

[0134] 表 V:羟基磷灰石上纯化后的洗脱物中因子 II、IX、VII 和 X 的活性及凝血酶活性。

[0135]

测试号	FII:C	FVII:C	FIX:C	FX:C	凝血酶活性	
	U/mL	U/mL	U/mL	U/mL	6 小时 37°C	25 小时 20°C
25	19	8.4	23	19	>6 小时	>24 小时
26	19	8.5	22	19	>6 小时	>24 小时
27	21	8.5	17	21	>6 小时	>24 小时
28	20	9.5	17	22	>6 小时	>24 小时

平均	20	9	20	20		
标准差	1.0	0.5	3.2	1.5		
C.V.	4.8	5.9	16.2	7.4		
PI-1	35	16	27	48	>6 小时	>24 小时

[0136] 所进行的测试在它们之间是可重复的,在6小时和24小时测量的凝血酶活性几乎为零,因此顺应依赖于维生素K的蛋白质的浓缩物随后的治疗用途(6小时及以上的凝血酶活性对应于非常小的凝血酶量,少于0.001NIH单位)。

[0137] E2-羟基磷灰石上纯化后透析的洗脱物中FII、FX、FVII和X的产率

[0138] 表VI:羟基磷灰石上纯化后透析或超滤的洗脱物中因子II、IX、VII和X的产率及凝血酶活性。

[0139]

测试号	FII:C %	FVII:C %	FIX:C %	FX:C %
25	57	59	72	59
26	64	63	63	60
27	76	57	77	65
28	85	60	70	71
平均	71	60	71	64
标准差	12.4	2.5	5.8	5.5
C.V.	17.7	4.2	8.2	8.6

[0140] 对于因子II和IX,产率在70%的等级,对于因子VII和X,产率平均在60%和64%的等级。

[0141] 表VII:超滤产生自羟基磷灰石的洗脱物后因子II、IX、VII和X的产率。

[0142]

测试号	FII:C %	FVII:C %	FIX:C %	FX:C %
25	66	74	77	77
26	-	-	-	-
27	97	79	72	89
28	85	60	70	71

平均	83	71	73	79
标准差	15.6	9.8	3.6	9.2
C.V,	18.9	13.9	4.9	11.6

[0143]

[0144] 超滤后所有因子的产率在 70 ~ 80% 的等级。

[0145] 表 VIII : 羟基磷灰石后透析的洗脱物中特异性因子 II、X、VII 和 IX 的活性。

[0146]

测试号	FII:C U/mg	FVII:C U/mg	FIX:C U/mg	FX:C U/mg	总蛋白质 mg/mL
25	6.3	2.8	7.7	6.8	3
26	5.7	2.7	4.9	6.3	2.9
27	6.8	2.7	5.5	6.8	3.1
28	5.7	2.7	4.9	6.3	3.5

平均	6.1	2.7	5.8	6.6	3.1
标准差	0.5	0.1	1.3	0.3	0.3
C.V.	8.7	1.8	23.1	4.4	8.4
PPSB-PI-1	1.2	0.6	1	1.2	35

[0147] 相对于通过应用阴离子交换树脂上的层析替代本发明的羟基磷灰石获得的 FII、FVII、FIX 和 FX 的浓缩物, 针对各因子计算的比活性提高了约 5 倍。

[0148] F- 关于羟基磷灰石上的纯化步骤的结论

[0149] 与离子交换凝胶相比, 依赖于维生素 K 的凝血因子在基于磷酸钙 (羟基磷灰石型) 的表面上的结合似乎更特异, 这解释了所获得的产物的纯度。在羟基磷灰石凝胶上洗脱后回收的蛋白质的分析显示, 包含在目的蛋白质浓缩物中的蛋白质具有包含在 75 ~ 50kDa 之间的分子量, 这对应于依赖于维生素 K 的蛋白质的分子量, 尤其是对应于组成凝血酶原复

合体的不同凝血因子的分子量。

[0150] 以下表 IX 显示存在于病毒灭活后通过阴离子交换树脂上的纯化（作为本发明的羟基磷灰石上的纯化的替代）获得的蛋白质浓缩物中的蛋白质列表。应注意，在这种浓缩物中，依赖于维生素 K 的蛋白质（FII、FVII、FIX、FX、蛋白质 C、蛋白质 S、蛋白质 Z）的总量代表了总蛋白质的 17%。

[0151] 表 IX：存在于产生自阴离子交换树脂上的单次纯化或产生自包括第一阴离子交换树脂和第二阴离子交换树脂作为本发明的羟基磷灰石上的层析的替代的纯化的浓缩物中的蛋白质列表和相对比例。

[0152]

蛋白质	%	MW
IgM	0.30 至 0.40	900
C4bp	1.60 至 2	590
纤连蛋白	0.45 至 0.65	440
纤维蛋白原	0.65 至 1	330
C4	9 至 13	206
C3	0.55 至 0.75	180
C3c	0.45 至 0.65	180
C5	0.05 至 0.1	180
蛋白质 S	0.90 至 1.15	75
凝血酶原 (FII)	12 至 15	68.7
清蛋白	2.10 至 2.5	68
抗凝血酶 III	0.05 至 1.5	65
因子 X	1.25 至 1.75	59
蛋白质 C	0.20 至 0.50	57
因子 IX	0.15 至 0.45	55.4
蛋白质 Z	0.05 至 0.20	55
因子 VII	0.01 至 0.05	50

[0153] 相反，产生自本发明的方法，尤其是羟基磷灰石上的纯化步骤后获得的蛋白质浓

缩物包含比例在总蛋白质的 90 ~ 95% 等级的依赖于维生素 K 的蛋白质 (FII、FVII、FIX、FX、蛋白质 C、蛋白质 S、蛋白质 Z)。

[0154] 相对于产生自阴离子交换树脂上的层析的中间产物 1, 产生自此羟基磷灰石上的层析的浓缩物具有提高了 5 至 7 倍的比活性。此外, 其他测量显示, 羟基磷灰石上的层析还允许有效去除病毒灭活步骤过程中使用的聚山梨酸酯 80 和 TnBP。

[0155] 最后, 在羟基磷灰石层析洗脱物中加入抗凝血酶 III 和肝素提供了系统获得在 24 小时时无任何凝血酶活性的产物的可能性。

[0156] 最后, 大部分污染蛋白质、尤其是高分子量污染蛋白质的去除允许通过使用可接受的过滤表面来在具有 15nm 孔隙度的膜上过滤产物 (每平方米膜约 10 升产物)。

[0157] G- 羟基磷灰石上层析后获得的浓缩物的纳米过滤

[0158] G. 1- 纳米过滤的实验实施

[0159] 所使用的滤器是具有参考的滤器 Planova 15N (Asahi)。所使用的滤器由亲水性纤维素铜铵中的中空纤维组成, 其孔额定尺寸为 15 ± 2 nm。

[0160] 滤器的平衡缓冲液由 0.13M 氯化钠、3g/L 二水合柠檬酸三钠、2g/L 赖氨酸盐酸盐、2g/L 精氨酸盐酸盐和纯化注射用水 (pwi) 组成。在 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 的温度下将缓冲液调节至 7.0 ± 0.05 的 pH 值、 $75 \Omega \cdot \text{cm}$ 的电阻率和 $314 \text{ mosmol/kg H}_2\text{O}$ 的重量摩尔渗透压浓度。

[0161] 单独制备滤器, 在 500 毫巴等级的压力下用纯化注射用水 (pwi) 漂洗。用纯化注射用水 (pwi) 漂洗后在使用前控制滤器的完整性。通过进行空气渗漏试验或“密封性试验”, 在 $1,000 \pm 50$ 毫巴的空气压力下在外套中检查无空气穿过纤维。(Asahi Planova 滤器完整性试验 SOP)。过滤溶液前, 利用配制缓冲液平衡滤器。在具体实施方案中, 配制缓冲液由 0.13M NaCl、2g/L 精氨酸、2g/L 赖氨酸、3g/L 柠檬酸钠组成, 且具有从 6.9 至 7.1 的 pH 值。在另一实施方案中, 配制缓冲液由 10g/L 精氨酸、35g/L 甘露醇组成, 且具有 6.9 至 7.1 的 pH 值。在另一实施方案中, 配制缓冲液由 45g/L 甘露醇组成, 且具有 6.9 至 7.1 的 pH 值。在另一实施方案中, 配制缓冲液由 1g/L 柠檬酸钠、35g/L 甘露醇组成, 且具有从 6.9 至 7.1 的 pH 值。

[0162] 检查 15nm 滤过物的 pH 值和电阻率 ($\text{pH } 7.0 \pm 0.1$ ——重量摩尔渗透压浓度 $314 \pm 10 \text{ mosmol/kg H}_2\text{O}$)。

[0163] 在 $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 的水浴中解冻产生自上文所述的陶瓷羟基磷灰石上的纯化, 并可选地透析的一瓶洗脱物。在 Planova 15N 15nm 滤器上过滤之前, 可选地在 $0.2 \mu\text{m}$ 三醋酸纤维素滤器 (Sartolab P-Sartorius) 上完成预过滤。

[0164] 在 500 ± 50 毫巴的恒定压缩空气压力下进行洗脱物的过滤。利用数字压力计在 15nm 滤器入口处进行压力测量。在滤器的下部出口处将产生自 15nm 滤器上的过滤的洗脱物收集在置于天平上的瓶中。按固定的时间间隔进行滤过重量的读数, 以测定过滤流速。所完成的过滤是正面的 (frontal), 无任何再循环。

[0165] 过滤结束时, 在填充滤器的外套后进行空气渗漏试验 (“气密性试验”), 以检查膜的完整性和验证过滤步骤。

[0166] 为了测试纳米过滤步骤的可重复性, 通过应用表 X 中详述的标准化操作条件来进行测试。

[0167] 表 X: 15nm 纳米过滤过程中应用的操作条件和参数。

[0168]

操作参数	值
温度℃	20±2
应用压力毫巴	500±50
总蛋白质 g/L	5.0±1.0
因子 IX:C 总 IU	约 3,200
平均蛋白质负载 g/m ²	50±10
体积负载 l/m ²	10.0±1

[0169] 纳米过滤后,通过本领域技术人员已知的常规技术测量凝血因子 FII、FVII、FIX 和 FX 的量和 / 或浓度。相同的情况也适用于总蛋白质水平的测定。

[0170] G. 2- 产生自羟基磷灰石的洗脱物的纳米过滤后获得的结果

[0171] G. 2. 1- 跟踪纳米过滤参数

[0172] 在过滤测试过程中维持过滤压力在平均为 500±100 毫巴的范围内 (见图 5)。

[0173] 在纳米过滤过程中测量过滤流速的变化 (见图 6)。观察到了过滤流速取决于滤过重量的有规律降低。就所进行的所有测试获得了类似的谱。

[0174] 表 XI :跟踪纳米过滤流速

纳米过滤测试号	起始流速 g/分钟	最终流速 g/分钟	比值 %
97 E 2703	2.3	0.4	17.4
97 E 0204	3.0	0.9	30.0
97 E 0804	2.0	0.6	30.0
97 E 0904	1.8	0.6	33.3
97 E 1504	1.8	0.3	16.7

[0175]

[0176] 按照 Asahi 滤器供应商的建议,最终过滤流速应大于起始流速的 10%。对于小于 10% 的流速比,认为滤器堵塞,尤其是对于直径较小的孔。过滤的继续实际上可以促进潜在的病毒穿过膜的较宽的孔。

[0177] 进行的所有测试的最终 / 起始纳米过滤流速比是顺应的。

[0178] 表 XII :跟踪过滤参数

[0179]

纳米过滤 测试号	过滤时间 分钟	容量 L/m ²	平均流速 L/小时/m ²	容量 g/m ²
97 E 2703	138	11.4	4.9	50.2
97 E 0204	70	9.7	8.0	42.7
97 E 0804	89	10.0	6.8	49.0
97 E 0904	99	10.5	6.4	52.5
97 E 1504	148	10.7	4.3	51.4

[0180] 平均过滤时间在 2 小时的等级。平均体积容量在 10L/m² 膜的等级, 这对应于约 47.9±4.7g 蛋白质 /m² 的容量。

[0181] G. 2. 2- 纳米过滤后总蛋白质和凝血因子的结余

[0182] 表 XIII : 总蛋白质结余

[0183]

纳米过滤测试号	体积 V ₀ mL	总蛋白质		15 N 透过物 mL	总蛋白质		产率 %
		g/L	mg		g/L	mg	
97 E 2703	120.0	4.6	552	114.6	4.4	504	95.7
97 E 0204	102.0	4.8	490	108.7	4.4	478	97.7
97 E 0804	112.0	6.4	717	116.7	5.9	689	96.0
97 E 0904	110.0	5.5	605	121.4	5.0	607	100.3
97 E 1504	112.0	4.8	538	112.0	4.8	538	94.0
平均值/标准差	111.2±6.4	5.2±0.7	580±86	114.7±4.8	4.9±0.6	563±85	96.7±2.4

[0184]

[0185] 注意到值超过 90% 的良好的总蛋白质纳米过滤产率。

[0186] 来自不同批次的原料进行了测试, 并证明完美地可重复。

[0187] 表 XIV : 15nm 纳米过滤步骤过程中的凝血因子结余。

[0188]

纳米过滤 测试号	FII:C IU/mL		FVII:C IU/mL		FIX:C IU/mL		FX:C IU/mL	
	15 N 之前	15 N 之后	15 N 之前	15 N 之后	15 N 之前	15 N 滤过物	15 N 之前	15 N 滤过物
97 E 2703	30	36	16.0	15.0	25	23	24	22
97 E 0204	32	28	19.0	18.0	27	25	30	27
97 E 0804	39	39	30.0	26.0	32	35	39	36
97 E 0904	34	39	20.0	17.0	31	26	32	29
97 E 1504	30	30	19.0	19.0	29	29	29	29
平均值/标 准差	33±3.7	34.4±5.1	20.8±5.4	19.0±4.2	28.8±2.9	27.6±4.7	30.8±5.4	28.6±5.0

[0189] 针对所有凝血因子注意到不同测试的良好的可重复性。

[0190] 陶瓷羟基磷灰石上的层析步骤允许良好地回收依赖于维生素 K 的所有因子。注意到 15nm 纳米过滤之前和之后的浓度非常接近,从而显示四种凝血因子的高过滤产率。

[0191] 表 XV :15nm 纳米过滤过程中比活性的时间依赖性变化。

[0192]

纳米过 滤测试 号	S.A. FII IU/mg		S.A. FVII IU/mg		S.A. FIX IU/mg		S.A. FX IU/mg	
	15 N 之前	15 N 之后	15 N 之前	15 N 之后	15 N 之前	15 N 之后	15 N 之前	15 N 之后
97 E 2703	6.5	8.2	3.5	3.4	5.4	5.2	5.2	5.0

[0193]

97 E 0204	6.7	6.4	4.0	4.1	5.6	5.7	6.3	6.1
97 E 0804	6.1	6.6	4.7	4.4	5.0	5.9	6.1	6.1
97 E 0904	6.2	7.8	3.6	3.4	5.6	5.2	5.8	5.8
97 E 1504	6.3	6.3	4.0	4.0	6.0	6.0	6.0	6.0
平均值/ 标准差	6.4±0.24	7.1±0.88	4.0±0.47	3.9±0.44	5.5±0.36	5.6±0.38	5.9±0.42	5.8±0.46

[0194] 对于纳米过滤之前和之后进行的所有测试,针对所有凝血因子测定的比活性在相同的等级。对于所进行的所有测试,相对于因子 IX 测定的比活性大于 5。

[0195] 表 XVI :15nm 纳米过滤后的凝血因子产率。

纳米过滤测试号	FII:C %	FVII:C %	FIX:C %	FX:C %
97 E 2703	120.0	100.0	104.5	95.7
97 E 0204	93.2	101.0	98.7	95.9
97 E 0804	104.2	90.3	114.0	96.2
97 E 0904	126.6	93.8	92.6	100.0
97 E 1504	84.8	107.5	98.4	95.2
平均值/标准差	105.8±17.6	98.5±6.7	101.6±8.1	96.6±1.9

[0197] 对于所进行的各测试,针对所有凝血因子观察到了相同等级(且大于 90%)的产率。

[0198] G. 2. 3- 凝血酶活性的测定

[0199] 在通过样品的浑浊化来检测凝块的存在自动化仪器上完成凝血酶活性的测定。

[0200] 所进行的分析对应于凝固试验,其敏感性允许检测样品中的小量残余凝血酶。如果在 37°C 下 6 小时后和在 24°C 下 24 小时后获得凝固的缺乏,则结果是顺应的。

[0201] 在产生自羟基磷灰石的洗脱物的纳米过滤过程中未观察到凝血酶产生。凝血酶活性的测定显示在 37°C 下 6 小时后凝固的缺乏。但是,所进行的测试显示,在 24 小时时可以观察到凝块形成的起始,通过通常在水浴中进行的测试确认了此结果。

[0202] 进行了实验来确定诸如例如抗凝血酶 III 的蛋白酶抑制剂的加入是否导致在 24 小时时观察到的残余凝血酶活性的消失。

[0203] 通过使用特异性生色底物,通过分光光度法完成蛋白酶活性的测定。蛋白酶水解特异性生色底物实际上伴随着在 405nm 下检测的黄色分子的释放,其发生率与所测试的溶液的酶浓度成比例。

[0204] 表 XVII :用生色底物 S2238 测定凝血酶活性

[0205]

步骤	S2238 U OD	S2238+i2581 U OD	活性 IIa Δ U OD	S2238+AT-III+肝素
PPSB-PI-1 97 E 1106	0.0172	0.0142	0.0030	0.0149
透析 HA 洗脱物 97 E 1106	0.0314	0.0200	0.0114	0.0339
15 nm 滤过物				
97 E 2506	0.0065	0.0020	0.0045	0.0014
97 E 1007	0.0075	0.0015	0.0060	0.0021
97 E 1607	0.0090	0.0021	0.0069	0.0017
97 E 1707	0.0103	0.0018	0.0085	0.0018

[0206] 底物 S2238 是凝血酶的特异性底物。注意到在缺乏抑制剂的情况下,在所测试的所有样品中观察到了凝血酶类型的残余活性。凝血酶抑制剂 i2581 的加入和同等地在抗凝血酶 III (AT-III) 和肝素的混合物的存在下基本上抑制了此活性。因此,可以在存在肝素的情况下通过它的生理抑制剂 AT-III 来有效中和凝血酶。

[0207] 通过使用生色底物的凝血酶活性测试测量的残余凝血酶活性对应于 15nm 滤过物中低于 0.1IU/mL 的活性。

[0208] 抑酶肽也显示抑制残余蛋白酶的良好效率。但是,此抑制剂的牛来源不允许它在预期在人类中用于治疗用途的产物的纯化范围内使用。

[0209] G. 2. 4- 蛋白质浓缩物的 SDS-PAGE 电泳表征

[0210] 如图 7 中可见,已在来自 HA 陶瓷羟基磷灰石上的层析的未吸附级分中去除了大多数高分子量蛋白质。在 15nm 纳米过滤步骤中未注意到显著的组成差异,15nm 滤过物证明在每一点上都与纳米过滤前的蛋白质浓缩物类似。

[0211] 66kDa 的主条带基本上对应于凝血酶原,其本身代表了蛋白质浓缩物总蛋白质的约 60%。

[0212] G. 2. 5- 因子 IX 的免疫印迹表征

[0213] 在无任何还原剂的均质 10% SDS-PAGE 凝胶上电泳后产生免疫印迹。转移至硝酸纤维素上并用清蛋白饱和后,完成与抗因子 IX 单克隆第一抗体 (Sigma Ref. F1020) 的接触。在通过 ECL 技术在放射自显影胶片 (Pierce) 上显色前,进行过氧化物酶标记的抗小鼠第二抗体 (BioRad) 标记。结果显示在图 8 中。在对应于 PI-1 的孔中观察到了非特异性条带的存在。

[0214] 相反,来自陶瓷羟基磷灰石柱的透析洗脱物仅显示单个均质条带。此外,15nm 纳米

过滤后未注意到可见的差异,用因子 IX HP 作为对照也未注意到。

[0215] G. 2. 6- 结论

[0216] 通过按照标准化操作条件来以可重复的方式进行产生自陶瓷羟基磷灰石上的层析的透析洗脱物在 Planova Asahi 15nm 滤器上的纳米过滤。

[0217] 以可重复的方式注意到与滤过重量成比例的流速降低。滤器的平均体积容量在 10L/m² 膜的等级,对于所进行的测试,其对应于 47.9±4.7g 蛋白质的平均容量。

[0218] 总蛋白质结余提供 91.1±14.0% 的平均产率,这与 FII:C 的 99.4±22.2、因子 VII:C 的 91.5±18.2、因子 IX:C 的 95.8±16.1 和因子 X:C 的 90.5±15.1 的凝血因子产率相当。

[0219] 纳米过滤之前和之后,各种因子的比活性在相同的等级。

[0220] 通过用 SDS-PAGE 电泳表征未注意到 15nm 过滤之前和之后的显著差异。

[0221] H- 用于在生产过程中优化溶液的稳定性的测试

[0222] 以获得可以在 15nm 上过滤,且具有非常低或不存在的凝血酶活性含量的产生自羟基磷灰石的洗脱物为目的,通过改变不同参数来进行了互补测试。

[0223] 表 XVIII :为稳定陶瓷羟基磷灰石洗脱物而进行的测试的列表。

[0224]

测试号	配方号	原料	苄脒 mmol/L	AT III U/mL	肝素 IU/mL	凝血酶活性
97 E 1806	a	冷冻	50	-	2.0	顺应
97 E 1007	a	新鲜	-	2.0 *	5.0	顺应
97 E 2312 97 E 3012	b	新鲜	-	0.5 **	2.0	顺应
98 E 0801 98 E 1301	b	新鲜	-	0.5 **	-	顺应

[0225] * 在层析前的溶剂-去垢剂处理时加入的 AT-III。

[0226] ** 超滤前加入的 AT-III。

[0227] 配方 a :0.13M NaCl-0.010M 柠檬酸钠、2.0g/L 赖氨酸盐酸盐、2.0g/L 精氨酸盐酸盐、pH 7.0±0.1。

[0228] 配方 b :0.13M NaCl、0.010M 柠檬酸钠、pH 7.0±0.1。

[0229] 为了能够将测试的结果相互比较,未改变进行纳米过滤步骤的参数。

[0230] 在 97E 1806 测试中,在缓冲液中加入 50mM 苄脒,并在 15nm 纳米过滤步骤前加入 2IU/mL 肝素。产生自具有 15nm 孔隙度的滤器上的纳米过滤的蛋白质浓缩物不具有任何凝血酶活性。

[0231] 在测试 97E 1007 过程中,在溶剂-去垢剂处理时和羟基磷灰石上的层析步骤前加入 5IU/mL 肝素和 2U/mL AT-III,观察到 12.5L/m² 的良好过滤能力和凝固(因此凝血酶活性)的缺乏。

[0232] 在 97E 2312 和 97E 3012 测试中,在超滤步骤前直接将 2IU/mL 肝素和 0.5IU/mL AT-III 加入产生自羟基磷灰石上的层析的洗脱物中。产生自具有 15nm 孔隙度的过滤器上的纳米过滤的蛋白质浓缩物不具有任何凝血酶活性。

[0233] 在 98E 0801 和 98E 1301 测试中,超滤前在缺乏肝素的情况下将 0.5IU/mL AT-III 加入产生自羟基磷灰石上的层析的洗脱物中。在这两种情况下,产生自具有 15nm 孔隙度的过滤器上的纳米过滤的蛋白质浓缩物都不显示任何凝血酶活性。

[0234] 因此,抗凝血酶 III 形成本发明的包含凝血酶原复合体的蛋白质浓缩物的凝血酶活性的良好抑制剂。肝素似乎还作为 AT-III 的辅因子起作用,增强后者的抑制活性。从而在将后者加入羟基磷灰石层析洗脱物中获得抗凝血酶的最佳效率。事实上,抗凝血酶似乎只非常少量地结合至羟基磷灰石上。

[0235] I- 通过本发明的方法获得的蛋白质浓缩物和通过包括离子交换树脂上的层析作为羟基磷灰石上的层析的替代的方法获得的浓缩物之间的比较。

[0236] 表 XIX :用离子交换层析作为羟基磷灰石上的层析的替代纯化的 PPSB 的组合物和本发明的经 15N 纳米过滤的浓缩物的比较。

[0237]

特征	通过包括阴离子交换层析作为羟基磷灰石的替代的方法获得的浓缩物	通过本发明的方法获得的经纳米过滤的浓缩物
总蛋白质 mg/mL	32.0±7.5	5.0±0.6
SA IU FIX/mg	0.8±0.2	5.9±0.4
FII IU/mL	40.0±8	35.0±4.8
FVII IU/mL	26.5±8.5	19.0±3.8
FIX IU/mL	25.5±5.5	27.8±4.2
FX IU/mL	40±8	29.2±4.7
37°C 下 6 小时的凝血酶活性	缺乏	缺乏
25°C 下 24 小时的凝血酶活性	缺乏	缺乏
肝素 IU/IU FIX	0.1-0.25	0.1-0.25
抗凝血酶 IU/mL	缺乏	0.5-1

[0238]

[0239] 表 XIX 的结果显示,在本发明的范围内进行的陶瓷羟基磷灰石上的层析提供了获得比用第二阴离子交换树脂作为本发明的羟基磷灰石的替代获得的水平大得多的依赖于维生素 K 的蛋白质的纯化水平。此外,与可通过用第二阴离子交换树脂作为羟基磷灰石的替代产生的浓缩物的仅 15%至 17%相对,依赖于维生素 K 的全部因子代表了通过本发明的方法获得的经纳米过滤的浓缩物的总蛋白质的 70 ~ 80%。

[0240] 还注意到,组成凝血酶原复合体的凝血因子各自的比值在通过前述两种方法获得的浓缩物中是可比的。

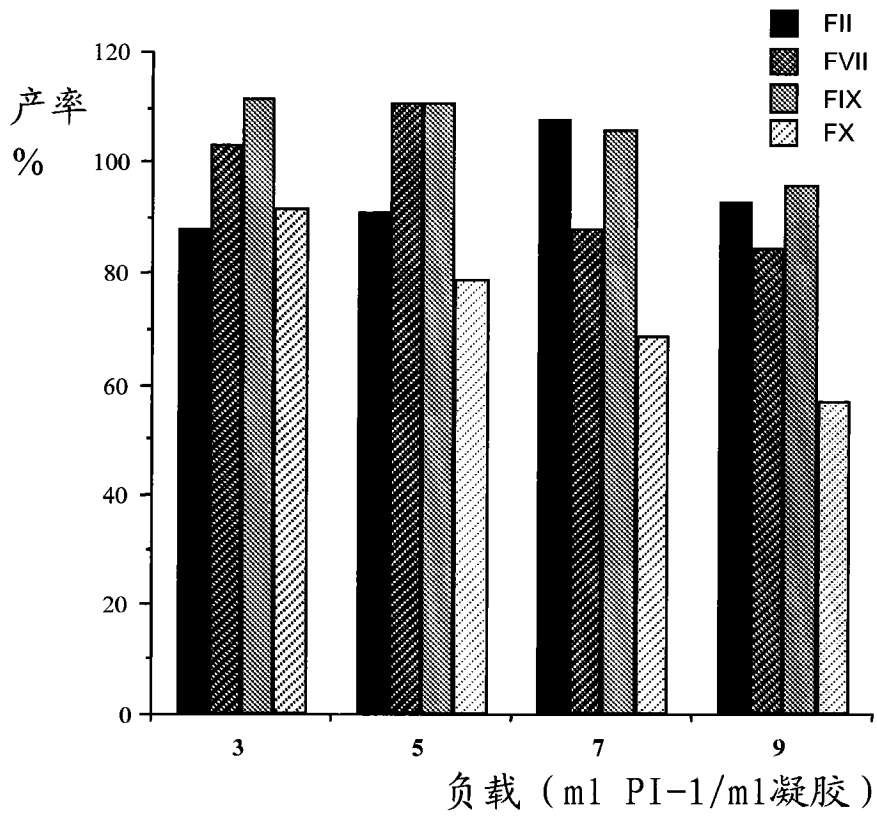


图 1

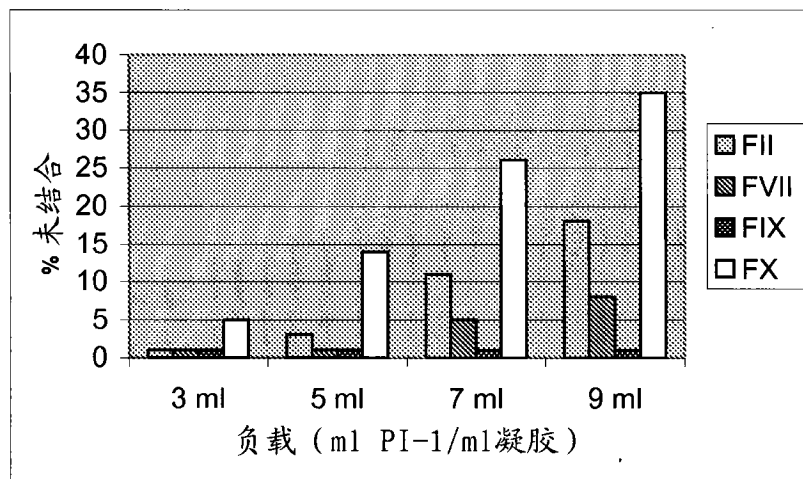


图 2

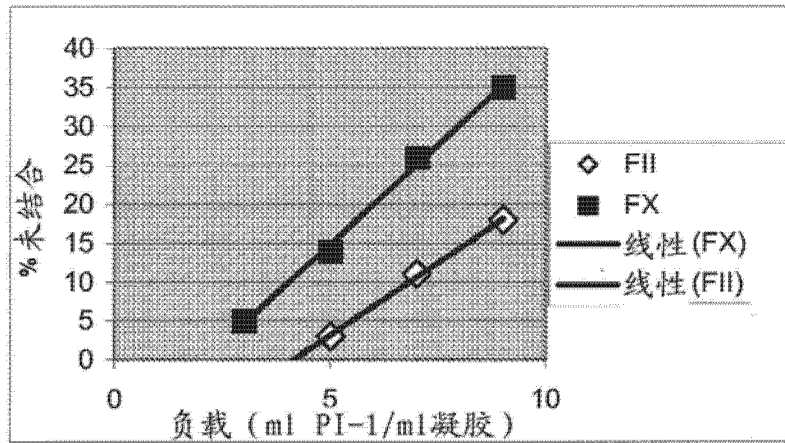


图 3

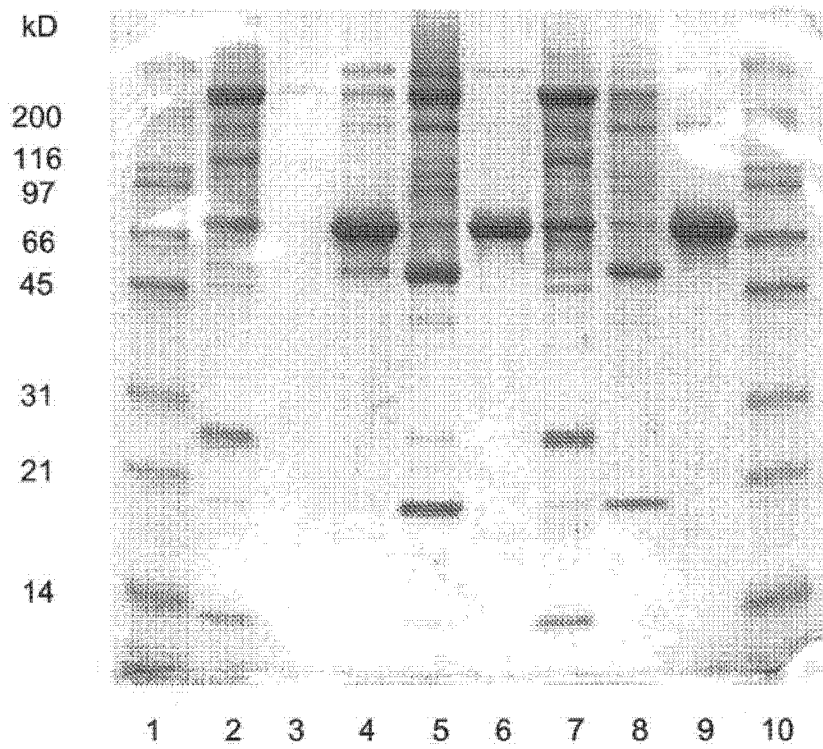


图 4

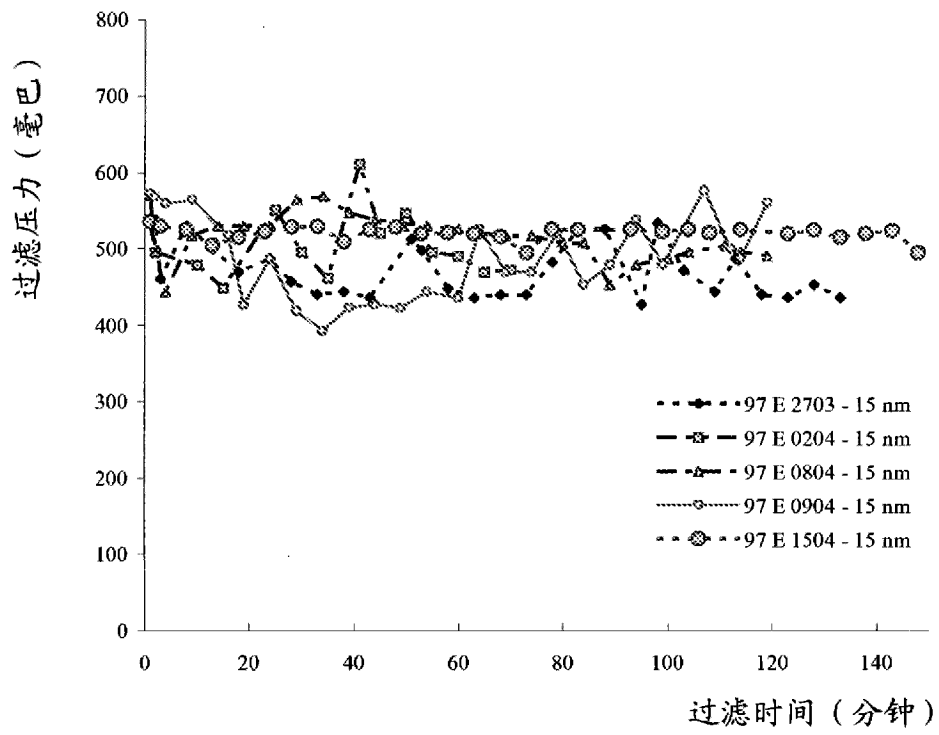


图 5

过滤流速对滤过重量的变化

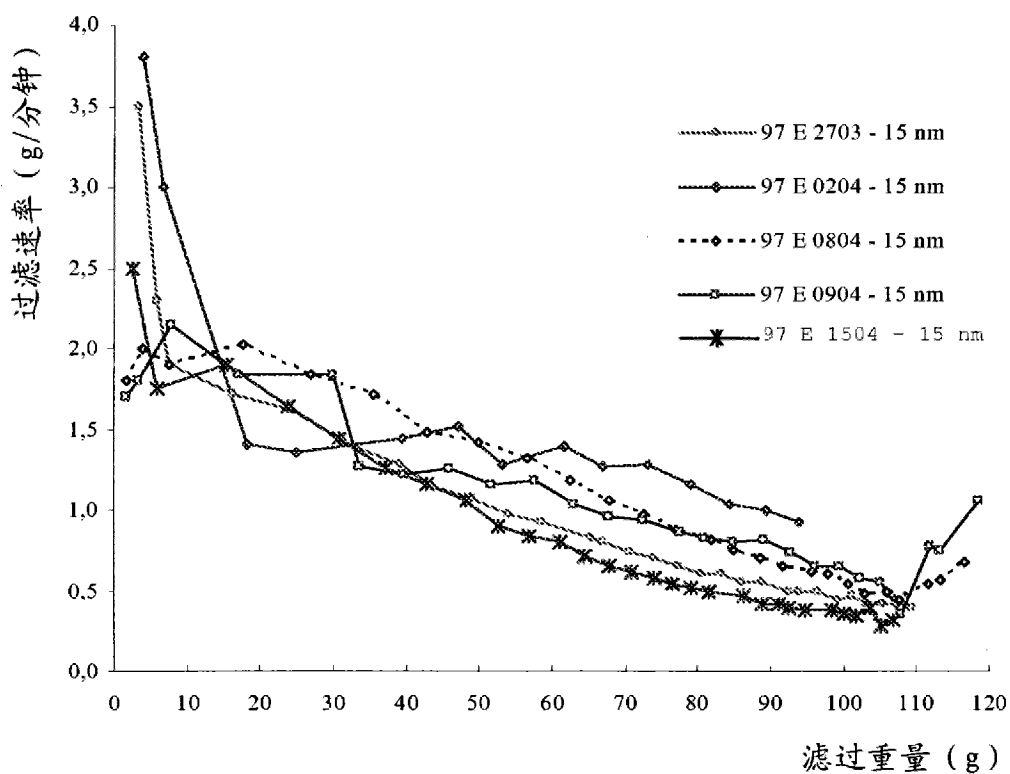


图 6

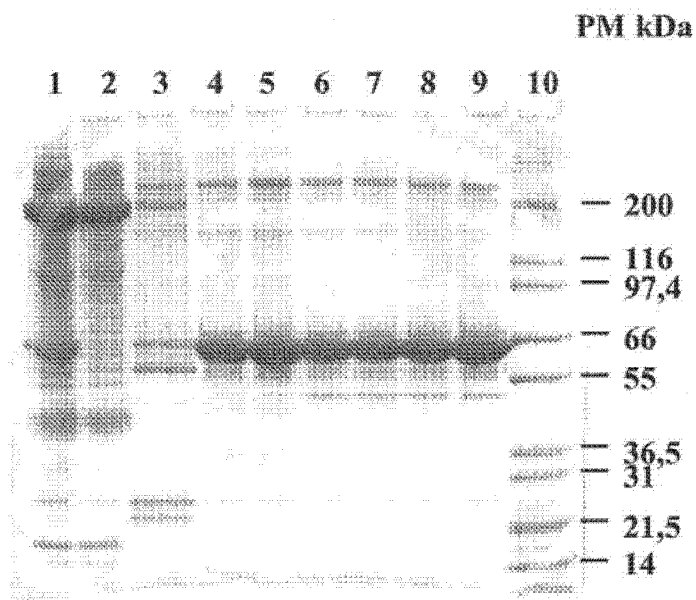


图 7

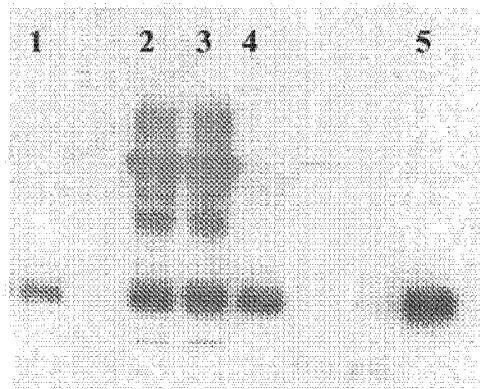


图 8