



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114438061 A

(43) 申请公布日 2022.05.06

(21) 申请号 202011197342.9

(22) 申请日 2020.10.30

(71) 申请人 北京双鹭立生医药科技有限公司
地址 102202 北京市昌平区科技园区利祥路2号

申请人 北京双鹭药业股份有限公司
北京双鹭生物技术有限公司

(72) 发明人 周凯强 朱红雨 岳永峰 杨仲璠
王红丽 徐明波

(74) 专利代理机构 北京知呱呱知识产权代理有限公司 11577
专利代理师 孙志一

(51) Int.Cl.
G12N 9/64 (2006.01)

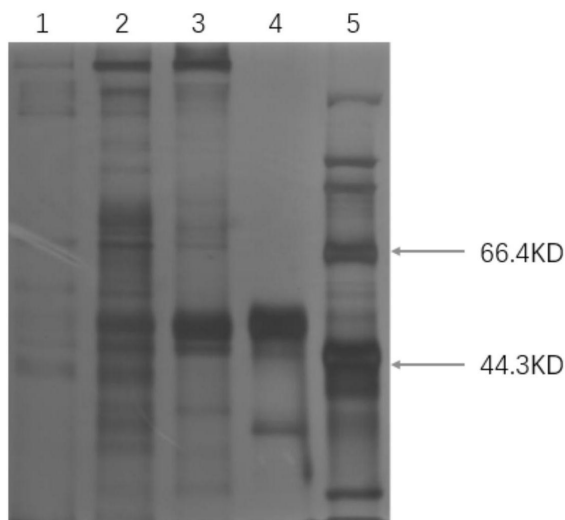
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

用于纯化凝血因子VII的方法

(57) 摘要

本发明实施例公开了一种用于纯化凝血因子VII的方法包括:对凝血因子VII转基因兔的兔乳进行脱脂,得到脱脂兔乳;将所述脱脂兔乳经SP Fast Flow阳离子层析,获得含凝血因子VII的第一纯化液;将所述第一纯化液经Heparin Bestarose HP层析柱层析,得到含凝血因子VII的第二纯化液;将所述第二纯化液经Butyl-650M层析得到含凝血因子VII的第三纯化液。本发明用于纯化凝血因子VII的方法,利用SP Fast Flow填料对凝血因子VII进行粗纯,以去除兔奶中大部分的杂蛋白,随后用Heparin Bestarose HP层析柱对SP Fast Flow洗脱样品进行纯化,最后用Butyl-650M层析对Heparin Bestarose HP洗脱样品进行纯化,这样就减少了兔乳中大量的酪蛋白对亲和填料载量与纯化效果的影响,可有效提高凝血因子纯度,降低成本,提高经济效益。



1. 一种用于纯化凝血因子VII的方法,其特征在于包括:
对稀释后的凝血因子VII转基因兔的兔乳进行脱脂,得到脱脂兔乳;
将所述脱脂兔乳经阳离子层析,获得含凝血因子VII的第一纯化液;
将所述第一纯化液经肝素亲和层析柱层析,得到含凝血因子VII的第二纯化液;
将所述第二纯化液经疏水柱层析得到含凝血因子VII的第三纯化液。
2. 如权利要求1所述的用于纯化凝血因子VII的方法,其特征在于,
所述兔乳与稀释液按照1:9稀释后,用带正电过滤器Supra cap 50P080过滤,得到稀释过滤的兔乳;其中,所述稀释液为pH 5.0 20mM醋酸-醋酸钠缓冲液。
3. 如权利要求1所述的用于纯化凝血因子VII的方法,其特征在于,
所述阳离子层析采用SP Fast Flow柱层析纯化,层析过程中,先经除杂液先后两次除杂,再用pH 10.0,20mM甘氨酸-NaOH缓冲液洗脱,收集含有凝血因子VII的第一纯化液。
4. 如权利要求3所述的用于纯化凝血因子VII的方法,其特征在于,
所述两次洗脱的除杂液分别为pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠-0.30M NaCl和pH 9.0,20mM甘氨酸-NaOH缓冲液。
5. 如权利要求1所述的用于纯化凝血因子VII的方法,其特征在于,
所述疏水层析采用Butyl-650M层析,调节所述第二纯化液的电导率与Butyl-650M柱层析平衡液在 ± 5 ms/cm内。
6. 如权利要求1所述的用于纯化凝血因子VII的方法,其特征在于,
所述肝素亲和层析柱层析,先经pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠-0.20M NaCl缓冲液除杂,再经pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠-0.30M NaCl缓冲液洗脱,收集含有凝血因子VII的第二纯化液。
7. 如权利要求1所述的用于纯化凝血因子VII的方法,其特征在于,
所述疏水柱层析过程中,先经pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠-0.70M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 缓冲液除杂,再经pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠-0.30M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 缓冲液洗脱,收集含有凝血因子VII的第三纯化液。

用于纯化凝血因子VII的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白质纯化技术领域,具体涉及一种用于纯化凝血因子VII的方法。

背景技术

[0002] 血友病是一种遗传性凝血功能障碍的出血性疾病,也是人类中最常见的一种出血性疾病。其特征是活性凝血活酶生成障碍,凝血时间延长,终身具有轻微创伤后出血倾向,重症患者没有明显外伤也可发生出血现象,血友病具有终身性。血友病是由于血液中某些功能性凝血因子的缺失而造成的。通常的最快速有效的治疗方法是注射凝血因子。现在最常见的治疗用凝血因子为凝血因子VIII。但是临床研究显示,大约5%的血友病患者注射凝血因子VIII后可能出现包括寒颤、恶心、呕吐、头晕头痛等副作用,而大量长期使用凝血因子VIII,还会导致机体中产生免疫抑制物,诱导中和抗体的生成。与此同时还可能诱发过敏反应、溶血反应、肺水肿等不良反应。当外科手术需要大量输注凝血因子VIII的时候,如果制剂内含有红细胞凝集素,可能会产生溶血,导致患者发生血管内溶血的风险增加。凝血因子VII因其更小的副作用,更好的疗效,使其成为对凝血因子VIII产生抗性的遗传性血友病患者的首选替代药物。

[0003] 目前,凝血因子VII主要有两种生产方式:一种是从血浆中分离提取,此种方法产量很低,且存在一定的安全风险。另一种方法采用的是BHK细胞发酵的方式生产凝血因子VII,代表药物为诺其,也是目前全球最早批准上市的重组凝血因子VII制剂,但其缺点是表达量不高,制备成本高。

[0004] 近年来,利用兔乳腺发生器进行凝血因子VII生产的研究进展迅速。但是由于兔乳中蛋白质成分复杂,从兔乳中纯化目的蛋白的难度较大。例如在专利103484497A中,采集好的兔奶通过离心和超微过滤的方法提取FVII,但是此方法经实践发现离心对兔奶中酪蛋白的去除效果并不明显,如图1所示;

[0005] 在专利EP 2687595A1中,从兔乳中纯化凝血因子VII的过程包括,兔乳的澄清与过滤,FVII特异性亲和层析,羟基磷灰石色谱,分子筛以及阴离子交换色谱激活FVII,在此方案中,FVII特异性亲和层析填料价格昂贵,且在兔乳澄清过程中,兔乳中加入0.25M,pH 8的柠檬酸盐,25℃静置半小时,兔乳与处理前没有明显变化,并不能得到乳清,如图2所示。

[0006] 综上所述,凝血因子VII制备过程中存在着表达量不高、除杂效果差、制备成本高的缺点。

发明内容

[0007] 为此,本发明实施例提供一种用于纯化凝血因子VII的方法,以解决现有技术中无法从兔乳中有效去除杂蛋白,或虽然获得高纯度凝血因子VII,但纯化成本过高的问题。

[0008] 为了实现上述目的,本发明实施例提供如下技术方案:

[0009] 本发明提供一种用于纯化凝血因子VII的方法,其包括:对稀释后的凝血因子VII转基因兔的兔乳进行脱脂,得到脱脂兔乳;

- [0010] 将所述脱脂兔乳经阳离子层析,获得含凝血因子VII的第一纯化液;
- [0011] 将所述第一纯化液经肝素亲和层析柱层析,得到含凝血因子VII的第二纯化液;
- [0012] 将所述第二纯化液经疏水柱层析得到含凝血因子VII的第三纯化液。
- [0013] 本发明的一个实施例中,所述兔乳与稀释液按照1:9稀释后,用带正电过滤器Supra cap 50 P080过滤,得到稀释过滤的兔乳;其中,所述稀释液为pH 5.0 20mM醋酸-醋酸钠缓冲液。
- [0014] 本发明的一个实施例中,所述阳离子层析采用SP Fast Flow柱层析纯化,层析过程中,先经除杂液先后两次除杂,再用pH 10.0,20mM甘氨酸-NaOH缓冲液洗脱,收集含有凝血因子VII的第一纯化液。
- [0015] 本发明的一个实施例中,所述两次洗脱的除杂液分别为pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠-0.3M NaCl和pH 9.0,20mM甘氨酸-NaOH缓冲液。
- [0016] 本发明的一个实施例中,所述疏水层析采用Butyl-650M层析,调节所述第二纯化液的电导率与Butyl-650M柱层析平衡液在 ± 5 ms/cm内。
- [0017] 本发明的一个实施例中,所述肝素亲和层析柱层析,先经pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠-0.20M NaCl缓冲液除杂,再经pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠-0.3M NaCl缓冲液洗脱,收集含有凝血因子VII的第二纯化液。
- [0018] 本发明的一个实施例中,所述疏水柱层析过程中,先经pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠-0.7M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 缓冲液除杂,再经pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠-0.3M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 缓冲液洗脱,收集含有凝血因子VII的第三纯化液。
- [0019] 本发明实施例具有如下优点:
- [0020] 本发明用于纯化凝血因子VII的方法中,利用SP Fast Flow填料对凝血因子VII进行粗纯,以去除兔奶中大部分的杂蛋白,随后用肝素亲和层析柱对SPFF洗脱样品进行纯化,最后,用疏水层析对肝素亲和洗脱样品进行纯化,减少了兔乳中大量的酪蛋白对亲和填料载量与纯化效果的影响,且操作简单、耗时短、成功率高,可有效提高凝血因子纯度,降低成本,提高经济效益。

附图说明

- [0021] 为了更清楚地说明本发明的实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。显而易见地,下面描述中的附图仅仅是示例性的,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图引伸获得其它的实施附图。
- [0022] 图1为本发明实施例提供的离心去除酪蛋白效果的前后对比照片图,其中,A-离心前兔乳;B-离心后的兔乳;
- [0023] 图2为本发明实施例提供的兔乳中加入柠檬酸盐效果的前后对比图,其中,A-加入柠檬酸钠之前的兔乳;B-加入柠檬酸钠之后的兔乳;
- [0024] 图3为本发明实施例提供的SP FF各组分SDS-PAGE电泳图,其中,1-第一除杂液;2-第二除杂液;3-第一纯化液;4-诺其;5-Marker;
- [0025] 图4为本发明实施例提供的肝素亲和层析各组分SDS-PAGE的电泳图,其中,1-第三除杂液;2-第二纯化液;3-诺其;4-Marker;

[0026] 图5为本发明实施例提供的疏水层析各组分SDS-PAGE的电泳图,其中,1-第三纯化液;2-第四除杂液;3-Marker;

[0027] 图6为本发明实施例提供的FVII激活后与诺其SDS-PAGE电泳对比图,其中,1-第三纯化液;2-激活后的FVIIa;3-诺其;4-Marker。

具体实施方式

[0028] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0029] 实施例1、本发明的凝血因子VII的纯化

[0030] 本发明中,转基因兔的制备方法,具体参照专利申请号:2017800817940中记载的技术方案,采用显微注射技术得到FVII转基因种兔,通过交配、繁殖、鉴定、筛选最终得到纯合FVII转基因母兔,用于FVII转基因兔兔乳的获取。

[0031] 1、凝血因子VII转基因兔的兔乳脱脂

[0032] 使用具有滤膜Supra cap 50 P080(Pa11)的过滤器对稀释的兔乳进行脱脂处理,其中,兔乳室温融化后,按1:9(v/v)比例将兔乳与兔乳稀释液混匀,其中,兔乳稀释液成分为pH 5.0,20mM醋酸盐缓冲液。连接蠕动泵,压力表等;以大量水冲洗管路;以兔乳稀释液冲洗管路,检测流出液体的pH值以及电导率值,直至与兔乳稀释液一致为止;连接过滤器,并对过滤器进行排气,润洗;将稀释兔乳样品以恒定流速通过过滤器,监测压力变化,压力 \leq 30Psi,收集过滤样品,得到含有凝血因子VII的脱脂兔乳。

[0033] 2、含有凝血因子VII的脱脂兔乳的SP FF(SP Fast Flow,GE)层析

[0034] 本步骤中,所采用的填料SP Fast Flow,即SP **Sepharose**[®] Fast Flow。利用SP FF柱对脱脂兔乳进行初步纯化,以获得含有凝血因子VII的第一纯化液。具体步骤如下:

[0035] 使用平衡液(pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠缓冲液)对SP FF柱进行平衡,,平衡体积 \geq 5CV,直至电导率值及UV₂₈₀值平稳;脱脂兔乳进行上样;使用平衡液对SP FF柱进行淋洗,淋洗体积 \geq 5CV,直至电导率及UV₂₈₀平稳;利用除杂液进行除杂,除杂液成分为pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠缓冲液-0.3M NaCl,当UV₂₈₀开始抬升时进行收集,UV₂₈₀回落至基线后停止收集,得到第一除杂液;使用平衡液(pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠缓冲液)对SP FF柱进行淋洗,,淋洗体积 \geq 5CV,直至电导率值及UV₂₈₀值平稳;再次利用除杂液进行除杂,此处除杂液成分为pH 9.0,20mM甘氨酸-NaOH缓冲液,当UV₂₈₀开始抬升时进行收集,UV₂₈₀回落至基线后停止收集,得到第二除杂液;利用洗脱液进行洗脱,洗脱液成分为pH 10.0,20mM甘氨酸-NaOH缓冲液,当UV₂₈₀开始抬升时进行收集,UV₂₈₀回落至基线后停止收集,用pH 3.6,1M甘氨酸-HCl缓冲液迅速将收集到的洗脱液的pH值调至5.0,得到第一纯化液。

[0036] 对收集的第一纯化液样品进行SDS-PAGE纯度检测,其中,平衡液为pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠;除杂液为pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠-0.3M NaCl,与pH 9.0,20mM甘氨酸-NaOH缓冲液,洗脱液为pH 10.0,20mM甘氨酸-NaOH缓冲液,洗脱液pH值调节液为pH3.6,1M甘氨酸-HCl缓冲液。如图3所示,为本实施例的SP FF各组分SDS-PAGE电泳图,说明脱脂后的兔乳经SP-FF层析纯化后,第一纯化液中含有凝血因子VII目的蛋白,纯度约为60%,大量杂蛋白被

除去。

[0037] 3、含凝血因子VII的第一纯化液的肝素亲和层析柱层析(博格隆, Heparin Bestarose FF)

[0038] 本步骤利用肝素亲和层析对SP FF层析获得的第一纯化液进行纯化,具体步骤如下:

[0039] 首先使用平衡液对肝素亲和层析柱进行平衡,平衡体积 $\geq 5CV$,直至电导率及 UV_{280} 平稳;平衡液成分为pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠缓冲液;使用平衡液对凝血因子VII亲和柱进行淋洗,淋洗体积 $\geq 5CV$,直至电导率及 UV_{280} 值平稳;利用除杂液进行除杂,其中,除杂液成分为pH 5.0 20mM醋酸-醋酸钠缓冲液-0.20M NaCl,当 UV_{280} 开始抬升时进行收集, UV_{280} 回落至基线后停止收集,得到第三除杂液;利用洗脱液进行洗脱,洗脱液成分为pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠缓冲液-0.30M NaCl,当 UV_{280} 开始抬升时进行收集, UV_{280} 回落至基线后停止收集,得到第二纯化液。

[0040] 对收集的第二纯化液样品进行SDS-PAGE纯度检测,其中,平衡液为pH5.0,20mM醋酸-醋酸钠;除杂液为pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠-0.2M NaCl,洗脱液为pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠-0.30M NaCl。如图4所示,肝素亲和层析各组分SDS-PAGE的电泳图,结果显示,第一纯化液经肝素亲和层析纯化后,得到的第二纯化液中目的蛋白的纯度约为95%,证明肝素亲和填料对凝血因子VII具有很好的纯化效果。

[0041] 4、含凝血因子VII的第二纯化液的疏水层析纯化(TOSOH、Butyl-650M)

[0042] 具体步骤如下:使用平衡液对疏水层析柱进行平衡,平衡体积 $\geq 5CV$,直至电导率及 UV_{280} 值平稳;平衡液成分为pH5.0 20mM醋酸-醋酸钠-1M $(NH_4)_2SO_4$;以pH 5.0,20mM醋酸-醋酸钠-4M $(NH_4)_2SO_4$ 对样品进行稀释至电导率与平衡液在 $\pm 5ms/cm$ 内;进行上样;使用平衡液对疏水柱进行淋洗,淋洗体积 $\geq 5CV$,直至电导率及 UV_{280} 值平稳;利用PH5.0 20mM醋酸-醋酸钠-0.70M $(NH_4)_2SO_4$ 除杂液进行除杂,当 UV_{280} 值开始抬升时进行收集, UV_{280} 值回落至基线后停止收集,得到第四除杂液;洗脱液进行洗脱,洗脱液成分为20mM醋酸-醋酸钠-0.30M $(NH_4)_2SO_4$;当 UV_{280} 值开始抬升时进行收集, UV_{280} 值回落至基线后停止收集,得到含凝血因子VII的第三纯化液。

[0043] 对收集第三纯化液样品进行SDS-PAGE纯度检测,如图5所示,疏水层析各组分SDS-PAGE的电泳图,结果显示,第二纯化液经疏水层析纯化后,目的蛋白的纯度在99%以上,证明疏水层析可以进一步提高目的蛋白的纯度。

[0044] 试验实施例1、凝血因子VII的体外激活

[0045] 本发明实施例参照专利US2007 0129298,通过溶液孵育自激活法对凝血因子VII进行激活。将凝血因子VII加载于3kDa超滤浓缩管,然后以台式高速低温离心机离心,更换缓冲液为20mM PB,0.3M NaCl,5mM $CaCl_2$,pH 7.0-7.2,并浓缩至蛋白浓度为3-5mg/ml,采用消光系数法定量测定蛋白浓度,置于4℃进行激活,激活时间24~40小时。激活结束利用G-25脱盐柱,将其置换到20mM PB,pH7.0中,得到激活后的FVIIa,-80℃冻存备用。

[0046] 经测定,40h激活后凝血因子VII的生物学活性为51462IU/mL,与诺其凝血因子VII生物学活性50000IU/mL相当。如图6所示,为FVII激活后与诺其SDS-PAGE电泳对比图,结果显示,第三纯化液经40h激活后,激活效果与诺其FVIIa效果类似。

[0047] 试验实施例2、生色底物法间接测定凝血因子VII的生物学活性

[0048] 本发明实施例采用HYPHEN BioMed公司生产的BIOPHEN凝血因子VII生色试剂盒测定由试验实施例1所示方法激活的凝血因子VII的体外酶活性。该试剂盒测定原理为生色底物法,凝血因子VIIa是一种在外源性凝血途径起作用的丝氨酸蛋白酶,当凝血因子VIIa与组织因子结合后,在磷脂和Ca²⁺存在条件下,可激活凝血因子FX,使其转变为活性形式FXa。待测定的融合蛋白首先与来源于兔的促凝血酶原激酶的组织因子形成酶复合物,然后激活反应体系中一定浓度的(过量)凝血因子FX,使其转化为活性形式FXa,FXa作用于反应体系中特异性显色底物Sxa-11,使底物裂解并产生pNA,所产生pNA量直接与FXa的活性成正相关性。在405nm处用比色计测定所释放的pNA浓度,即可知测试样本中凝血因子VIIa以及FXa活性之间的对应关系,以此计算出凝血因子VIIa的活性大小,用正常人的血浆作为标准品。

[0049] 试验实施例3、凝血法直接测定凝血因子VII的生物学活性

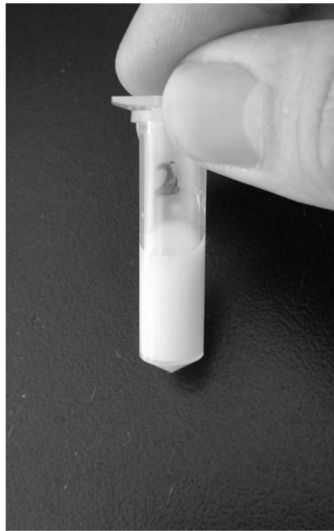
[0050] 凝血法测定凝血因子VIIa生物学活性是通过纠正凝血因子VIIa因子缺乏血浆所导致凝固时间延长的能力而获得的。本法系用人凝血因子VII缺乏血浆为基质血浆,采用一期法测定供试品人凝血因子VII效价。

[0051] 检测方法:用人凝血因子VII缺乏血浆或生理氯化钠溶液将标准品(诺其)和供试品稀释成每1ml含1IU凝血因子VII,再用稀释液分别做10倍、20倍、40倍和80倍稀释,置冰浴备用。量取供试品溶液0.1ml,加入凝血因子VII缺乏血浆0.1ml,混匀,置37℃水浴保温3分钟,然后加入已预热至37℃的含钙促凝血酶原激酶溶液0.2ml,记录凝固时间。以人凝血因子VII标准品溶液效价(IU/ml)的对数对其相应的凝固时间(秒)的对数作直线回归,求得直线回归方程,计算供试品溶液人凝血因子VII效价,再乘以稀释倍数,即为供试品人凝血因子VII效价(IU/ml)。如表1所示,为含凝血因子VII的第三纯化液激活不同时间生物学活性检测结果。

[0052] 表1

[0053] 激活时间(h)	0	12	24	40
比活(IU/mL)	6098	35482	43522	51462

[0054] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范畴。



A



B

图1



A



B

图2

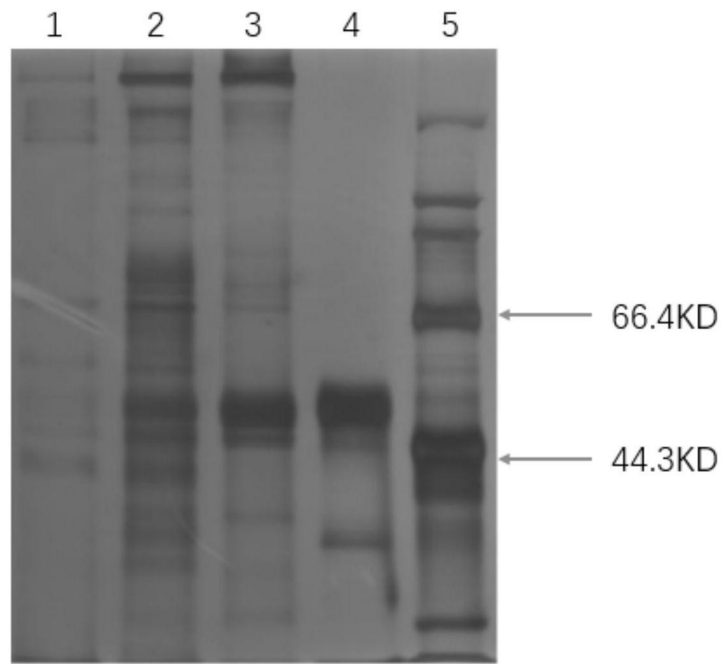


图3

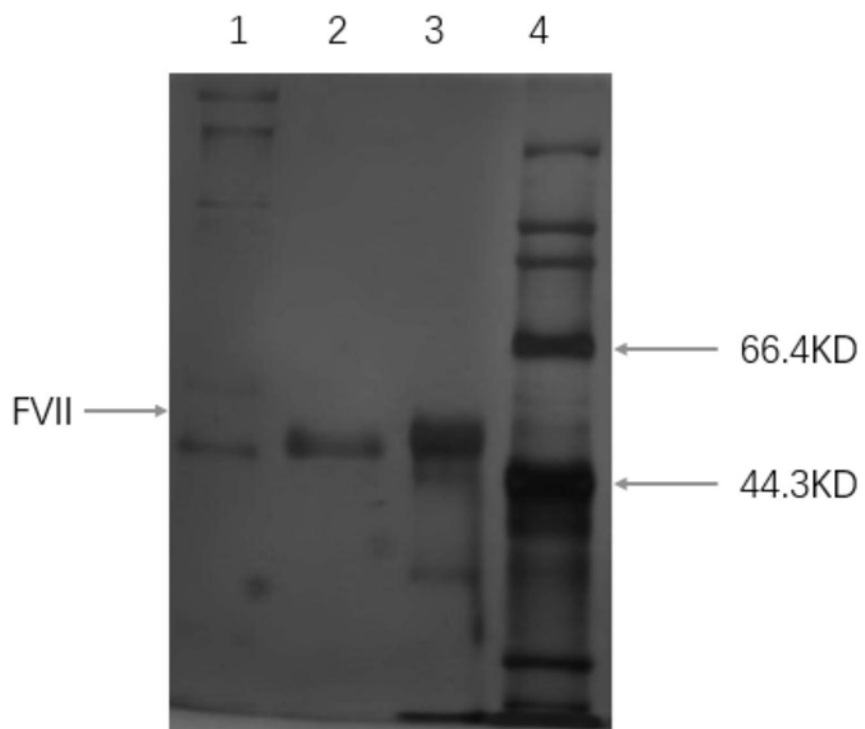


图4

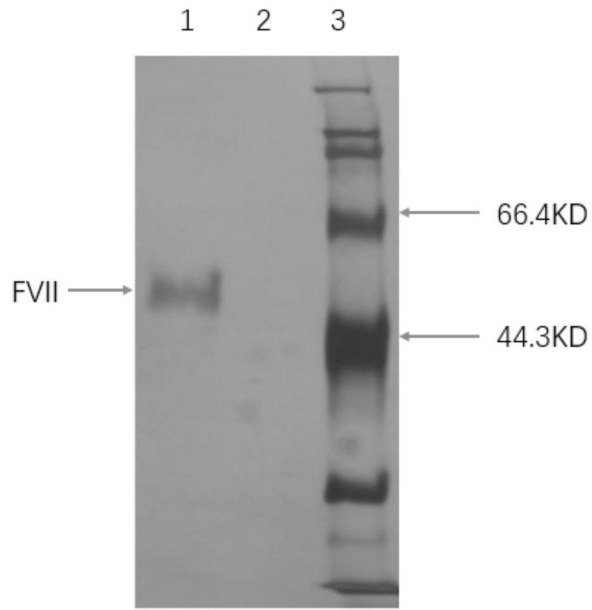


图5

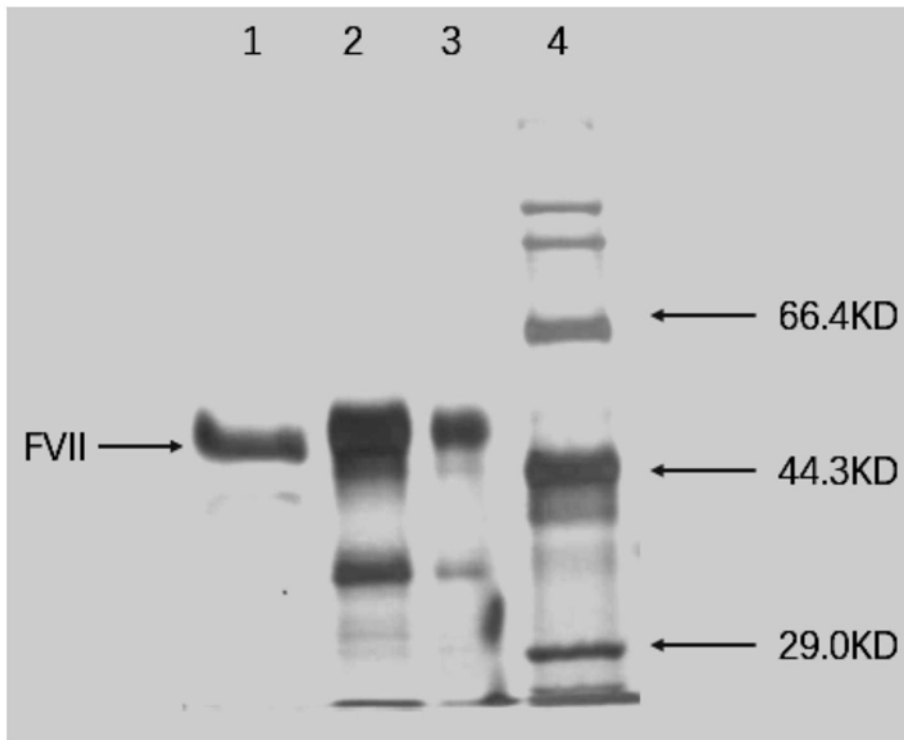


图6