



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111500563 A

(43)申请公布日 2020.08.07

(21)申请号 202010383496.0

(22)申请日 2020.05.08

(71)申请人 华兰生物工程重庆有限公司
地址 408000 重庆市涪陵区鹤凤大道66号

(72)发明人 肖岚 张海梦 李凯旋 滕世超
张宝献 张建瑾 刘余江

(74)专利代理机构 重庆信航知识产权代理有限公司 50218

代理人 胡蓉

(51)Int.Cl.

C12N 9/64(2006.01)

权利要求书2页 说明书3页

(54)发明名称

一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法

(57)摘要

本发明公开了一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法,包括以下步骤:(1)去冷胶血浆;(2)第一次阴离子交换层析;(3)洗脱液过滤、调节制品电导率、pH值;(4)第二次离子交换层析。本方法经过第一次离子交换层析采用谷氨酸钠作为洗脱液能从去冷胶血浆中将人凝血因子VII分离,经过两次层析能将人凝血因子VII进一步纯化,大大提高血浆的利用率且人凝血因子VII能达到较高比活。

1. 一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 去冷胶血浆

将新鲜冰冻血浆融化,在0-3℃的温度环境下连续离心,去除冷胶,上清即为去冷胶血浆,然后对去冷胶血浆进行过滤,得到澄清的去冷胶血浆;

(2) 第一次阴离子交换层析

将过滤后得到的去冷胶血浆进行第一次阴离子交换层析,使含VII因子的目的蛋白吸附在阴离子凝胶填料柱中,用谷氨酸钠洗脱液将吸附在凝胶填料中的含VII因子的目的蛋白解吸附,得到含人凝血因子VII粗品,再用盐洗去除结合在填料上的非目的VII因子蛋白质,得到洗脱收集液;

(3) 洗脱液过滤、调节制品电导率、pH值

将第一次阴离子交换层析得到的含人凝血因子VII洗脱液的pH值调整为6.50~7.50,电导率值调整为12~17mS/cm,并且进行过滤,过滤后得到第二次阴离子交换层析样品;

(4) 第二次离子交换层析

将第二次阴离子交换层析样品进行TMAE凝胶层析,使含VII因子的蛋白吸附在TMAE凝胶填料柱中,用不同离子强度溶液洗脱下来。

2. 根据权利要求1所述的一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法,其特征在于,所述步骤(1)和步骤(3)中,过滤时用孔径为0.22um的滤芯进行过滤。

3. 根据权利要求1所述的一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法,其特征在于,所述步骤(2)中,第一次阴离子交换层析用的交换凝胶为UniGel-80Q。

4. 根据权利要求1所述的一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法,其特征在于,所述步骤(2)包括第一次阴离子交换层析的层析前准备:用含0.01mol/L~0.02mol/L枸橼酸钠和0.1mol/L~0.15mol/L氯化钠的缓冲液平衡凝胶填料,缓冲液的pH为6.80~7.80,处理后,待上样。

5. 根据权利要求1所述的一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法,其特征在于,所述步骤(2)中,在层析前,对过滤后的血浆进行处理,调整血浆电导率10~13mS/cm、pH值为7.00~8.00、蛋白质含量为45g/L±5g/L。

6. 根据权利要求1所述的一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法,其特征在于,所述步骤(2)中,在层析时,将过滤后调节好的去冷胶血浆上样凝胶填料,使目的蛋白质吸附于凝胶填料中,非目的蛋白被流穿而废弃,以线性流速1-3cm/min收集流穿液,再用含0.01mol/L~0.02mol/L枸橼酸钠和0.1mol/L~0.15mol/L氯化钠的缓冲液后平衡凝胶填料5CV。

7. 根据权利要求1所述的一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法,其特征在于,所述步骤(2)中,用0.3~0.5mol/L谷氨酸钠溶液为洗脱液。

8. 根据权利要求1所述的一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法,其特征在于,所述步骤(4)包括第二次离子交换层析的层析前准备:用含0.01mol/L~0.02mol/L枸橼酸钠和0.1mol/L~0.15mol/L氯化钠的缓冲液平衡凝胶填料,缓冲液的pH为6.80~7.80,处理后,待上样。

9. 根据权利要求1所述的一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法,其特征在于,所述步骤(4)中,在层析时,将过滤后调节好的洗脱收集液上样TMAE凝胶填料,使目的蛋白质吸

附于TMAE凝胶填料中,非目的蛋白被流穿而废弃,以线性流速1-3cm/min收集流穿液,再用含0.01mol/L~0.02mol/L枸橼酸钠和0.1mol/L~0.15mol/L氯化钠的缓冲液后平衡凝胶填料5CV。

10. 根据权利要求1所述的一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法,其特征在于,所述步骤(4)中,在层析后,先用含0.01mol/L~0.02mol/L枸橼酸钠和0.1mol/L~0.15mol/L氯化钠的溶液为洗涤液洗涤凝胶填料结合能力较弱的非目的蛋白,弃去洗涤液,再用含0.01mol/L~0.02mol/L枸橼酸钠和0.1mol/L~0.5mol/L氯化钠的溶液为洗脱液将吸附在凝胶填料中的含VII因子的目的蛋白解吸附,收集洗脱液。

一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程技术领域,尤其涉及一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法。

背景技术

[0002] 凝血因子是参与血液凝固过程的蛋白质组分,血浆中参与血液凝固的凝血因子有十几种,其中,人凝血因子VII是外源性凝血途径中引发凝血联级反应的起始因子,是由肝细胞合成的维生素K依赖性具有丝氨酸蛋白酶水解作用的酶原。人凝血因子VII除治疗凝血因子VII缺乏症之外在血友病患者治疗中也被广泛研究应用,目前,血友病患者治疗正面临严峻的挑战,由于长期输注凝血因子产品的患者中高达20%患者对凝血因子VIII或凝血因子IX产生凝血因子抑制物。从上世纪临床研究发现,以血浆为原料的人凝血酶原复合物(PCC)能有效治疗产生抑制物的患者;1996年由NOVO NordiskA/B推出了活化重组凝血因子VII在欧洲上市,用于产生凝血因子VII或凝血因子IX抑制物的血友病患者及出血紊乱症患者的治疗,两种药物在临床应用上具有良好的治疗效果且副作用极低。

[0003] 人凝血因子VII临床上常用于血友病人及创伤性出血患者,随着医保范围的逐渐扩大,凝血因子VII药物用量将不断增长,人凝血因子VII较稳定,但在制备过程中,又包括病毒灭活或去除的方法,导致凝血因子VII的效价下降。因此,如何提供一种能够提高人凝血因子VII比活,提高血浆利用率,降低污染的人凝血因子VII制备工艺,成为本领域技术人员首要解决的技术问题。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种人凝血因子VII制备工艺,提高人凝血因子VII比活,提高血浆利用率,降低污染,以更好的解决背景技术指出的问题。

[0005] 为了实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0006] 一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 去冷胶血浆

[0008] 将新鲜冰冻血浆融化,在0-3℃的温度环境下连续离心,去除冷胶,上清即为去冷胶血浆,然后对去冷胶血浆进行过滤,得到澄清的去冷胶血浆;

[0009] (2) 第一次阴离子交换层析

[0010] 将过滤后得到的去冷胶血浆进行第一次阴离子交换层析,使含VII因子的目的蛋白吸附在阴离子凝胶填料柱中,用谷氨酸钠洗脱液将吸附在凝胶填料中的含VII因子的目的蛋白解吸附,得到含人凝血因子VII粗品,再用盐洗去除结合在填料上的非目的VII因子蛋白质,得到洗脱收集液;

[0011] (3) 洗脱液过滤、调节制品电导率、pH值

[0012] 将第一次阴离子交换层析得到的含人凝血因子VII洗脱液的pH值调整为6.50~7.50,电导率值调整为12~17mS/cm,并且进行过滤,过滤后得到第二次阴离子交换层析样

品；

[0013] (4) 第二次离子交换层析

[0014] 将第二次阴离子交换层析样品进行TMAE凝胶层析,使含VII因子的蛋白吸附在TMAE凝胶填料柱中,用不同离子强度溶液洗脱下来。

[0015] 综上所述,本发明具有以下有益效果:

[0016] 1. 本方法经过两次离子交换层析能将人凝血因子VII从血浆中分离,大大提高血浆的利用率,且人凝血因子VII能达到较高比活。

[0017] 2. 本方法采用柱层析,改变了传统固定床模式,减少了样品在空气中的暴露,降低了污染。

[0018] 3. 谷氨酸钠作为洗脱液从第一次离子交换层析填料中将人凝血因子VII解吸附得到含有人凝血因子VII粗品,谷氨酸钠具有蛋白保护剂的作用,有利于蛋白质活性保护。

具体实施方式

[0019] 下面将结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件。除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0020] 实施例一:

[0021] 一种从人血浆中纯化人凝血因子VII的方法,包括以下步骤:

[0022] S1-去冷胶血浆:

[0023] 将新鲜冰冻血浆融化,在0-3℃的温度环境下连续离心,去除冷胶,上清即为去冷胶血浆,然后用孔径为0.22um的滤芯对去冷胶血浆进行过滤,得到澄清的去冷胶血浆;

[0024] S2-第一次层析前准备:

[0025] UniGel-80Q离子交换填料层析柱准备,用含0.01mol/L~0.02mol/L枸橼酸钠和0.1mol/L~0.15mol/L氯化钠的缓冲液平衡UniGel-80Q凝胶填料,缓冲液的pH为6.80~7.80,处理后,待上样。

[0026] S3-第一次阴离子交换层析:

[0027] 调整血浆电导率10~13mS/cm、pH值为7.00~8.00、蛋白质含量为45g/L±5g/L,将调整的去冷胶血浆上样UniGel-80Q凝胶层析柱,使含有凝血因子VII的目的蛋白质吸附于UniGel-80Q凝胶填料中,非目的蛋白被流穿而废弃,以线性流速1-3cm/min收集流穿液,再用含0.01mol/L~0.02mol/L枸橼酸钠和0.1mol/L~0.15mol/L氯化钠的缓冲液后平衡凝胶填料5CV;用0.3~0.5mol/L谷氨酸钠洗脱液将吸附在凝胶填料中的含VII因子的目的蛋白解吸附,得到含人凝血因子VII粗品,再用盐洗去除结合在填料上的非目的VII因子蛋白质,得到洗脱收集液;

[0028] S4-第二次层析前准备:

[0029] TMAE离子交换填料层析柱准备,用含0.01mol/L~0.02mol/L枸橼酸钠和0.1mol/L~0.15mol/L氯化钠的缓冲液平衡TMAE凝胶填料,缓冲液的pH为6.80~7.80,处理后,待上样;

[0030] S5-第二次离子交换层析：

[0031] 将第一次阴离子交换层析得到的含人凝血因子VII洗脱液的pH值调整为6.50~7.50,电导率值调整为12~17mS/cm,并且进行过滤,将过滤后调节好的洗脱收集液上样TMAE凝胶层析柱,使目的蛋白质吸附于TMAE凝胶填料中,非目的蛋白被流穿而废弃,以线性流速1-3cm/min收集流穿液,再用含0.01mol/L~0.02mol/L枸橼酸钠和0.1mol/L~0.15mol/L氯化钠的缓冲液后平衡凝胶填料5CV;先用含0.01mol/L~0.02mol/L枸橼酸钠和0.1mol/L~0.15mol/L氯化钠的溶液为洗涤液洗涤凝胶填料结合能力较弱的非目的蛋白,弃去洗涤液,再用含0.01mol/L~0.02mol/L枸橼酸钠和0.1mol/L~0.5mol/L氯化钠的溶液为洗脱液将吸附在凝胶填料中的含VII因子的目的蛋白解吸附,收集洗脱液。

[0032] 本实施例经两次层析得到的VII因子洗脱液数据如下表：

[0033]	去冷胶血浆 VII因子比活 (IU/mg)	一次层析VII因 子洗脱液比活 (IU/mg)	两次层析后VII 因子洗脱液效 价 (IU/ml)	两次层析后VII 因子洗脱液比 活 (IU/mg)
	0.019	0.92	43.5	12.43

[0034] 结论：

[0035] 将收集的 plasma 样品及流穿液、洗涤液、洗脱液送样检测凝血因子VII效价及蛋白质含量,最后计算VII因子比活。本方法经过两步离子交换层析能人凝血因子VII从血浆中分离,大大提高了血浆的利用率,人凝血因子VII能达到较高的比活,高于《欧洲药典》规定的VII因子比活不低于2IU/mg蛋白。

[0036] 本方法采用柱层析(从血浆中用柱层析纯化人凝血因子VII目前未见报道),改变了传统固定床模式,减少了样品在空气中的暴露,降低了污染;谷氨酸钠作为洗脱液从第一次离子交换层析填料中将人凝血因子VII解吸附得到含有人凝血因子VII,同时谷氨酸钠还具有蛋白质保护剂的作用,有利于蛋白质活性保护。

[0037] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。