

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/00

[12] 发明专利申请公开说明书

A61K 38/58 C07K 14/47

C07K 14/745 C07K 14/81

C07K 1/14 C07K 1/36

[21] 申请号 98812944.2

[43] 公开日 2001 年 2 月 21 日

[11] 公开号 CN 1284881A

[22] 申请日 1998.10.30 [21] 申请号 98812944.2

[30] 优先权

[32] 1997.11.5 [33] JP [31] 320349/1997

[86] 国际申请 PCT/JP98/04939 1998.10.30

[87] 国际公布 WO99/22753 日 1999.5.14

[85] 进入国家阶段日期 2000.7.5

[71] 申请人 吉富制药株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 后藤节 浅原尚美

大水章正 上村八寻

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 杨丽琴

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图页数 3 页

[54] 发明名称 肝素辅助因子 II 制剂及其制备方法

[57] 摘要

含有肝素辅助因子 II (HC II) 的制剂,其中基本上不含选自低分子化因子、低分子化肝素辅助因子 II (HC II)、多聚化 HC II 及着色物中的至少一种杂质,特别是一种基本上不含低分子化因子及低分子化 HC II 的制剂。基本上不含有感染力病毒的上述任一制剂。以及上述制剂的制备方法。该方法包括选自如下步骤:疏水性分析法、用水溶性多聚物进行的分级分离、盐析及用碱的氨基酸作酸体的亲和性层析法,优选还有用多孔性中空纤维进行的过滤的步骤。

ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

5 2. 基本上不含低分子化因子及低分子化肝素辅助因子 II 的含肝素辅助因子 II 的制剂。

4. 含肝素辅助因子 II 的制剂, 其中在制剂中所含有的肝素辅助因子的纯度在 98% 以上。

6. 含肝素辅助因子 II 的制剂的制备方法, 其中该制法包含从含有肝素辅助因子 II 及低分子化因子的溶液中分离两者的步骤。

8. 权利要求 6 或 7 的方法, 它包括能进一步除去低分子化肝素辅助因子 II 及/或着色物的步骤。

10. 权利要求 6~9 中的任一项的方法, 它包括选自过滤处理, 加热处理及表面活性剂处理中至少一种除病毒或灭活病毒的步骤。

1

说明书

肝素辅助因子 II 制剂及其制备方法

技术领域

5 本发明涉及高纯度肝素辅助因子 II（以下称作“HCII”）制剂及其制备方法。更详细地说，本发明涉及基本上不含低分子化因子特别是蛋白酶，进而不含低分子化 HCII 的含高纯度 HCII 的制剂及其制备方法。

技术背景

10 HCII 是由 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS - PAGE）得到的分子量约 72 KDa 的单链血浆糖蛋白，其 cDNA 的碱基序列也已经鉴定（J. Biol. Chem., 257, 2162 - 2169, 1982; Nucleic Acids Res., 14, 1073 ~ 1088, 1986）。HCII 的生理功能尚未完全阐明，但它是一种特异性抑制凝血酶的抗凝物质。在血中具有抗凝血酶作用的蛋白质人们知道的主要是抗凝血酶 III（以下称作“ATIII”）。但认为 HCII 与 ATIII 的作用部位不同，作为血管内皮细胞下的血管中膜的凝血酶抑制物质起作用，而非存在于血管内皮细胞上。
15 （Thromb. Res., 62, 409 - 419, 1991）HCII 可用于预防及治疗引起血流异常的各种疾病、败血症和各种脏器功能损害及各种炎症等（特开平 9 - 176040 号公报）。

20 HCII 是从全血浆、血浆级分或重组宿主细胞培养物等纯化而成。在纯化时除去其中的杂物，例如 HCII 以外的血浆成分和宿主细胞内成分。除此之外还有多聚化及片段化（低分子化）HCII。多聚化 HCII 没有活性，而且一般情况下，施用蛋白多聚体时能引起休克，血压降低等不希望出现的副作用。据报道，低分子化的 HCII 是在以人血浆为原料纯化时混入的（J. Biol. Chem., 260, 2218 ~ 2225, 1985）。而且，在肝素或硫酸皮肤素存在下，缺少 N 末端 67 残基的 HCII 可大幅度降低凝血酶抑制速度（Thromb. Haemost., 74, 1209 - 1214, 1995）。也就是说，低分子化的 HCII 活性低。进而就低分子化蛋白的一般性质来看，低分子化 HCII 可能具有抗原性，并且因为其半衰期短，不可能显示长期效果。

25 30

基于以上报道及发明人的预备知识，导致 HCII 低分子化的最重

要因素（即低分子化因子），是血浆或宿主细胞内的蛋白酶。例如，从人血浆的 Cohn's 乙醇分级分离法得到级分 I 上清液和级分 II+III 上清液，以此为原料纯化 HCII 时，除 72 KDa 分子之外混入了 66 KDa 和 60 KDa 的低分子化 HCII 片段。因为是 HCII 分子内赖氨酸残基的羧基侧肽键被切断，所以推断这些低分子化 HCII 片段是由于血浆中特异性肽链内切酶的作用生成的。

即使将低分子化 HCII 从完整 HCII 中分离除去，如果在最后的制剂中夹杂了蛋白酶的话，在保存期间也会进一步发生 HCII 的低分子化。也有在制剂中添加蛋白酶抑制剂的手段，但是，从临床使用的角度考虑，还是希望尽可能将蛋白酶除掉。而且，从抗原性这一因素考虑，也有必要把来自于重组宿主细胞的蛋白酶除掉。然而，以往的 HCII 纯化法是不能够将 HCII 与蛋白酶完全分离的。

因此，本发明的目的就是提供基本上不含蛋白酶等低分子化因子的 HCII 制剂及其制备方法。进而提供基本上不含低分子化 HCII 的 HCII 制剂及其制备方法。本发明的另一个目的是提供基本上不含多聚化 HCII 或着色剂的 HCII 制剂。进而，本发明的另一个目的是提供纯度在 98% 以上。优选超过 99% 的纯化 HCII 制剂及其制备方法。另外，本发明的另一个目的是提供基本上不含具有感染力病毒的上述各 HCII 制剂及其制备方法。

发明公开

本发明基于以下的发现，即使用疏水性层析分离、水溶性多聚体处理、盐析以及用碱性氨基酸为配体的亲和性层析分离技术中的一种或两种以上的处理法，处理含 HCII 和蛋白酶等低分子化因子的溶液，能高效率地分离 HCII 和低分子因子。进而，在上述步骤前或后，进行经肝素固定的亲和性层析分离及阴离子交换层析分离，并接着进行超微过滤及/或凝胶过滤层析分离等项处理，能够得到基本上不含低分子化因子、多聚化或低分子化 HCII 及着色剂并且纯度超过 98%，最优选为超过 99% 的 HCII 溶液。该 HCII 溶液经除病毒或灭活处理能够制备出对制剂中 HCII 无不良影响并且不含具有感染力病毒的 HCII 制剂。

也就是说，本发明提供基本上不含低分子化因子、低分子化 HCII、多聚化 HCII 及着色剂中至少一种的 HCII 制剂。优选基本上不

含有低分子化因子及低分子化 HCII 的 HCII 制剂，更优选基本上不含多聚化 HCII 及/或着色剂的 HCII 制剂。而且，本发明提供 HCII 纯度超过 98%；优选超过 99% 的 HCII 制剂。进而，本发明提供基本上不含具有感染力病毒的上述各 HCII 制剂。

5 另外，本发明的其他部分是 HCII 制剂的制备方法。这种造法包含由 HCII 及低分子因子的溶液中分离 HCII 和低分子因子的步骤，特别是由下述一种或两种以上处理法组成的步骤。这种处理法包括疏水性层析分离处理、水溶性多聚物分离处理、盐析及以碱性氨基酸为配体的亲和性层析分离处理。本发明还包括除去低分子化 HCII 的步骤，
10 特别是包括凝胶过滤处理步骤的 HCII 制备法。另外，本发明是上述 HCII 制剂的制备方法。它包括通过过滤处理，加热处理或表面活性剂处理中至少一种方法除去病毒或失活处理的步骤，优选包含用多孔性中空纤维进行过滤处理的步骤。

附图简述

15 图 1 显示的是含有 HCII 级分的凝胶过滤层析图。其中该 HCII 级分是经固相化肝素处理及阴离子交换层析分离得到的。

图 2 显示的是凝胶层析分离设计的有效 HCII 纯化部分的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图（1，3 道：分子量标记，2 道：非还原 HCII，道 4：还原 HCII）。

20 图 3 显示的是凝胶层析分离得到的有效 HCII 纯化级分的高效液相层析分析图。

实施发明的最佳方式

本发明 HCII 制剂中所含的 HCII 指的是一种蛋白质。该蛋白质须 SDS-PAGE 分离时，在分子量 72 KDa 的位置上用肉眼观察显示一个
25 单一的条带，并且在高效液相层析图中给出一个单一的峰，等电点约为 5，具有抑制凝血酶、糜蛋白酶及组织蛋白酶的作用。因此，本发明的 HCII（以下为区分多聚化及低分子化 HCII，有时特意称作“有效 HCII”）只需满足上述各性质即可，而并不限定于具有全长的氨基酸序列的分子（完整分子）。

30 本发明的 HCII 制剂的原料—含有 HCII 的溶液，只要是含有适当量的与上述各项性质相符的 HCII 即可，而并不特殊限定其来源，可以包括来自于天然血浆的或经基因技术重组宿主细胞产生的 HCII。作

为来源于血浆的 HCII，例如从全血浆、高活性 HCII 的血浆级分得到。优选 Cohn's 乙醇分级分离上清液 I、上清液 II+III 或上清液 IV 得到。而且，对于血浆的生物起源也不作限制，例如从人或牛得到，但最好使用人的血浆。

- 5 来源于重组宿主细胞的 HCII 溶液，可以从培养宿主细胞的培养物中获得，例如，培养液、细胞提取液、培养液上清部分。上述培养宿主细胞已经用编码天然血浆中 HCII 的基因进行转化得到的。宿主细胞没有特别限制。较优选的有大肠杆菌、枯草杆菌、乳酸菌等细菌、酵母等真菌、动植物细胞、昆虫细胞等。另外，也有以自组入编码 HCII
- 10 基因的转基因动物的体液得到。

在本发明中，低分子化因子指的是能引起 HCII 片段化的化学及酶的因素，而不包括高温、低温、物理性切割力等物理性因素。具体而言，如蛋白酶、糖链或者是唾液酸分解酶及强酸，强碱等。在以含 HCII 溶液作为原料来源时，主要的低分子化因子是蛋白酶。

- 15 本发明的制备方法的特点是包含一种从 HCII 及低分子化因子混合液中分离该两者的步骤。该步骤包括疏水性层析分离、水溶性多聚物分离处理、盐析或以碱性氨基酸为配体的亲和性层析分离。这些方法既可单独使用，也可组合起来使用。

- 疏水性层析分离处理是在 pH6~9 的条件下，将含有 HCII 及低分子化因子的溶液与疏水性层析用载体接触，进行分离。疏水性层析用载体典型例子有碳数为 4~18 的烷基型（例如，丁基型、辛基型、辛癸基型等）、苯基型。丁基型有丁基琼脂糖、丁基聚乙烯（商品名：Bytyl - Toyopearl, Tosoh 产）等。辛基癸基型有辛基癸基琼脂糖。苯基型有苯基纤维素（商品名：Phenyl celofine, 生化学株式会社）等。
- 25 使用该处理法，HCII 在未吸附部分被回收，低分子化因子则吸附到载体上。

- 水溶性多聚分离处理是将水溶性多聚物加入到 HCII 及低分子化因子的混合液中，进行分离处理。其中水溶性多聚物的浓度为 1~30 % (w/v)，优选浓度为 3~20 % (w/v)，更优选的浓度为 6~12 % (w/v)。通过该法处理，HCII 留在溶液中，低分子化因子被沉淀。
- 30 将处理液离心分离或过滤，回收上清液，即可将低分子化因子从 HCII 中分离除去。在此所指的水溶性多聚物是指聚乙二醇（PEG）和非离

子性表面活性剂。PEG 的平均分子量以 4000~6000 为好。另外表面活性剂有聚氧乙烯(160)聚丙(30)二醇、聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯等。

盐析处理是将 0.05M~0.25M 的盐类加入到 HCII 及低分子化因子的混合液中进行处理。其中盐类为钠、钾、钡、铵等的盐类,例如:盐酸盐、硫酸盐、磷酸盐等。优选盐析处理法可举例表示为加入 0.05~0.2M 的氯化钡溶液。通过该法处理,HCII 留在溶液中,低分子化因子被沉淀。经离心分离或过滤该处理液,回收上清液,可将低分子化因子从 HCII 中分离除去。

以碱性氨基酸为配体的亲和性解说分离是在 pH 6~9 的条件下,将 HCII 及低分子化因子的混合液与固相化的解说载体接触进行的分离方法。其中,固相化的层析载体是以赖氨酸、精氨酸等碱性氨基酸作配体,但是,最好用赖氨酸、该载体为多糖类、硅胶、纤维等构成的不溶性支持物。详细地讲它们为琼脂、琼脂糖、交联琼脂糖,纤维素、二氧化硅、尼龙、亲水性乙烯聚合物等。通过该处理,HCII 在未吸附级分被回收,低分子化因子吸附到载体上。

为使低分子化 HCII 的生成限制在最小程度,并使其后的纯化更容易进行。同时提高 HCII 的回收率,分离 HCII 与低分子化因子的步骤在纯化的早期阶段进行最优选。

本发明的优选实施方案为,HCII 及低分子化因子的混合液先接触固相化肝素。使 HCII 结合到肝素上。固相化肝素是结合到固相上的单体肝素。其中,固相为多糖类、硅胶、纤维素等不溶性支持物。举例说明有琼脂、琼脂糖、交联琼脂糖、纤维素、二氧化硅、尼龙、亲水性乙烯聚合体以及在该领域内众所周知的其他物质。进行固相化肝素处理并不限于分离 HCII 与低分子化因子的步骤之前,在分离之后也可以进行。经该项处理,一部分多聚体 HCII 及低分子化 HCII 可与单体 HCII(有效 HCII)分级分离并被除去。在本发明中,多聚化 HCII 指的是无生理活性、对肝素的亲和力低的 HCII 的聚合体。更具体地说,是二聚体或多聚体。

HCII 先用盐浓度 0.05~0.2M 的缓冲溶液清洗后,再用不同浓度的缓冲溶液将 HCII 从固相化肝素中洗脱出。其中盐的浓度为 0.05~1.0M,优选为 0.1~0.5M,更优选为 0.1~0.2M。另外,用缓冲溶液

清洗 HCII 时, 较优选的是逐级提高盐浓度, 反复清洗几次。用于配制离子强度的盐的成分有氯化钠、氯化钾、硫酸铵、硫氰酸钠、硫酸钠等。优选的是氯化钠。另外, 该缓冲溶液的 pH 调整到 6~9。

本发明更优选的实施方案是将含有 HCII 的溶液进一步用阴离子交换层析分离进行处理。所用的阴离子交换体可举例说明为 DEAE 系列 [DEAE-Sephadex、DEAE-纤维素、DEAE-Sephacrose、DEAE-聚乙烯 (例如 DEAE-Toyopearl)], QAE 系列 [QAE-Sephacrose、QAE-纤维素、QAE-Sephacrose、QAE-聚乙烯 (例如: QAE-Toyopearl) 等]。

在用阴离子交换层析分离处理时, 阴离子交换体的平衡及清洗用缓冲液进行。该缓冲液为 0.005~0.1M 的柠檬酸缓冲液 (pH 6~8)、0.005~0.1M 的磷酸缓冲液 (pH 6~8)、0.005~0.1M 的 Tris 盐酸缓冲液 (pH 7~9)。另外, HCII 从阴离子交换物中的洗脱使用含 0.05~0.5M。优选为 0.2~0.25M 的氯化钠进行。其中该缓冲液也被用于阴离子交换物的平衡及清洗。

上述进行的 HCII 与低分子化因子的分离处理, 使用固化肝素处理及阴离子交换层析分离处理二种方法, 无顺序上的限制, 可任意选择。另外, 在纯化步骤中为防止 HCII 的多聚化及低分子化, 只要没有特别的条件限制, 上述各项处理均在 pH 6~9、4~20℃ 的条件下进行。另外为防止多聚物的生成, 上述各步骤中使用的全缓冲溶液中, 最好都含有 0.001%~1.0% (w/v) 的水溶性多聚物 (例如 PEG4000 等)。

在上述各纯化处理中得到的 HCII 活性部分有可能混入低分子化 HCII。在本发明中, 低分子化 HCII 指的是用高效液相层析法分离时出现一个有别于有效 HCII 峰的片段化 HCII 肩峰 (HPLC 的分离条件在后提到)。因此, 为分离除去低分子化 HCII, 上面得到的 HCII 活性部分需进一步进行超微过滤及/或凝胶过滤层析分离等分离步骤。其中这种分离是基于分子量的大小进行的。

对于超滤的滤膜的孔径大小不作特别限制, 只要能使有效 HCII 通不过, 而只让低分子化 HCII 通过即可。例如常用的有乙酰纤维素、丙烯腈共聚物、芳香族尼龙、聚砒、聚氯化乙烯、聚亚胺、树脂膜等。其形状可选择使用管状膜、扁平膜、螺旋组件 (module)、中空纤维

组件等。由于超滤膜的孔径不是某一固定的值，当被除去的低分子化 HCII 与有效 HCII 分子量相差不大时，最好先通过超滤将 HCII 浓缩后，再进行凝胶层析分离。

用于凝胶层析分离的凝胶有交联葡聚糖珠（例如，交联葡聚糖）、
5 交联聚丙烯酰胺珠（如：BioGel）、琼脂糖胶（例：Sephacryl）、
葡聚糖聚丙烯酰胺（例如：Sephacryl）等。在进行凝胶过滤时，使用
柠檬酸缓冲液或磷酸缓冲液（pH 6~9）洗脱。其中缓冲液中含有 0~
0.5M 最好为 0.1~0.2M 的氯化钠。

为尽可能防止 HCII 的多聚化及低分子化、上述超滤及凝胶过滤
10 希望在 pH6~9，4-20℃ 进行。另外，上述各步骤中使用的所有缓冲
液最好都含有 0.001%~1.0% (w/v) 的水溶性多聚物（例如：PEG 4000
等），以预防多聚体的生成。

在上述各项处理后得到的 HCII，其纯化程度，以蛋白量及 HCII
的比活性为指标进行监测。其中蛋白量是在波长 280 nm 测得的吸光
15 度（ A_{280} ）。HCII 的活性是以抑制凝血酶的活性作用为指标进行测定的。
其方法在下文的实施例中详述。

经上述各处理得到的纯化 HCII 溶液，通过制剂，可以制备出高
纯度的 HCII 制剂。制剂时，根据需要可添加药学上可接受的载体、
添加剂的及通过加热、灭菌、除菌过滤、病毒灭活，分散、冷冻干燥
20 等进行制剂。这些制剂方法均为药学上可接受的常规方法。

本发明的纯化 HCII 溶液为了达到基本上不含有感染力病毒的这
一目的，希望进一步进行病毒灭活及/或除病毒的处理步骤。这里的
“基本上不含病毒”指的是灭活病毒使病毒感染效价（TCID₅₀）控制
在检出界限以下或者是除去病毒使病毒基因量限制在 1 PCR 单位以下
25 （按照 Transfusion, 32, 824~828, 1992 报道的 PCR 测定法，检出的
最小核酸量）。

病毒灭活法，可使用众所周知的任何一种方法。例如：液体加热
处理、干燥加热处理、表面活性剂处理等。不过希望选择一种方法尽
可能对 HCII 的生理活性无不利影响。其中不利影响物有 HCII 的变
30 性、低分子化、多聚化等。由于 HCII 对热不稳定、希望在有适当稳
定剂（例如酸性氨基酸等）存在的条件下，进行液体加热处理、干燥
加热处理、表面活性剂处理。病毒除去方法，最好用病毒除去滤膜进

行滤过处理。这种滤膜的孔径大小能使 HCII 分子通过，但病毒粒子通不过。该病毒除去膜的开头有管状膜、扁平膜、中空纤维等各种形状。最好使用多孔性中空纤维的那种。

5 多孔性中空纤维是管状丝、在其周壁自由向外有许多贯通的孔，该同壁可作为过滤膜。在本发明中使用的多孔性中空纤维的周壁孔径是 $1\text{nm} \sim 100\text{nm}$ 。优选为 $10\text{nm} \sim 50\text{nm}$ ，最优选为 $15 \pm 2\text{nm}$ 。在此范围内，可以从 HCII 溶液中将夹杂的病毒除去。另外，多孔性中空纤维的内径，优选为 $330 \pm 30\mu\text{m}$ 。周壁厚度优选为 $27 \pm 3\mu\text{m}$ 。

10 多孔性中空纤维的制备原料没有特别限制，但希望使用再生纤维素。由再生纤维素构成的多孔中空纤维希望在纤维素铜氨溶液中，用微相分离法 (Am. Chem. Soc., 9, 197 - 228, 1985) 进行制备。

多孔中空纤维优选以组件形式使用。例如，很多多孔中空纤维平行捆在一起，包在一个盒子中 (cartridge) 通过粘合剂形成载体。

15 过滤时，HCII 溶液的温度是 $4^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ 。优选温度为 $4^\circ\text{C} \sim 20^\circ\text{C}$ 。滤过压力是 $0.1 \text{ kgf/cm}^2 \sim 1 \text{ kgf/cm}^2$ ，优选 $0.4 \text{ kgf/cm}^2 \sim 0.9 \text{ kgf/cm}^2$ 。HCII 的浓度优选为 $0.01 \sim 10\%$ (w/v)，更优选为 $0.1 \sim 4\%$ (w/v)，在此浓度时 HCII 溶液的过滤效率高。

20 过滤法有循环式过滤与非循环式过滤，均在加压空气下进行。前者是在给溶液一个倾斜速度下进行的过滤。后者则不给予倾斜速度。

上述病毒灭活处理和除病毒处理，分别单独使用就可以达到除去有感染力病毒的目的，但最好还是将两种方法组合使用。其应用顺序无特别限制但优选病毒灭活处理后进行除病毒处理。

25 经上述步骤制备的循环式过滤制剂中，基本上至少不含低分子化因子、低分子化 HCII、多聚化 HCII 及着色剂中的一种，这是该制剂的特征。本发明所指的着色剂是指在 410nm 处显示特异吸收的夹杂物，例如可举出转铁蛋白、触珠蛋白等物质。这里所说的“基本上不含低分子因子”指的是在 0.1M 磷酸钠缓冲溶液以 $\text{pH } 8$ 、 25°C 的条件下培养 $48 \sim 120$ 小时后，用 HPLC (G 3000 SW_{XL}) 检测时也检不出低分子化 HCII。
30 “基本上不含低分子化 (或多聚化) HCII”指的是用 HPLC (G 3000 W_{XL}) 检不出低分子化 (或多聚化) HCII 的峰 (这里的 HPLC 条件如下所示)。

分离柱: G 3000 S W_{XL} (中 7.8mm × 30cm; TOSOH 公司制备)

流动相: 0.1M 醋酸钠, 0.3M 氯化钠, 0.1% 叠氮化钠 (pH 6.5)

流速: 1.0 mL/分

检出波长: 280nm

5 样品进样量: 50μl (A_{280} = 约为 1 (在最小 0.2 ~ 最大 2 的范围内))。

进而, 基本上不含着色物质 “指的是着色度 (C.I.) 为 50 以下。着色度在后记的实例中加以定义。

本发明的 HCII 制剂, 优选为不含低分子化因子及低分子化 HCII, 更优选为进一步不含多聚化 HCII 及着色物质中的一种或两种者不含的制剂。

特别优选的实施方案为, 本发明的 HCII 制剂含有纯化到 98% 以上, 最好 99.9%, 以上的有效 HCII。其中该纯度百分率是 HCII 对于总蛋白量的百分率。

15 通过以下实施例, 详述本发明。但本发明并不限于实施例。并且, 为防止 HCII 的多聚化, 在以下实施例中各纯化步骤所用的全部缓冲液的含有 0.01 或 0.1% (w/v) 的水溶性多聚物 (例如 PEG 4000 等)。

比较例 1. 从人血浆中纯化 HCII (I)

(1) 固相化肝素处理

20 Cohn's 分级分离的上清液 II + III 加到使用了肝素凝胶亲和性层析分离柱, 再用含 0.4M NaCl 的缓冲液洗脱, 得到纯度约 1% 的 HCII 部分 (以下称作粗制品), 将此部分在 4℃ 条件下通过用 20mM 磷酸缓冲液 (pH 8.0) 洗净的肝素凝胶柱 (φ 5 × 2.5cm), 接着用含有 0.1 ~ 0.15M NaCl 的 20mM 磷酸缓冲液 (pH 8.0) 洗脱吸附到柱上的部分,

25 可以得到比粗制品的比活性高 7.5 ~ 9.6 倍的 HCII 级分。HCII 的活性按下述方法测定。即, 在被检样品稀释液中加入 50μL 含有 60mM EDTA、0.2% HSA 及 50μl 0.1 mg/ml 硫酸皮肤素的 Tris 缓冲液 (pH 8.56)、另外再加入 100μL 0.93 mg/ml 二盐酸 H-D-苯丙氨酰基-L-甲基哌啶-L-精氨酰基-对硝基苯甲酰胺, 在 37℃ 培养 5 分钟。

30 加入 1 mL 柠檬酸使反应停止, 测定 405 nm 处的吸光度 (A_{405})、按照以往的方法, 将制备的部分纯化品作为标准品 [由吸收系数: $E^{1\%} = 5.93$ (Arch. Biochem. Biophys., 259, 331-340, 1997) 和吸光

度 A_{280} 求出的蛋白浓度 0.1 mg/ml ，作为 1 U 作标准曲线，算出 HCII 的活性。

(2) 阴离子交换层析

在 (1) 中得到的含 HCII 的级分，在 4°C 通过 ($12[A_{280}]/\text{ml}$ 胶) QAE-聚乙炔柱 ($\phi 5 \times 2.5 \text{ cm}$)，其中该柱预先用 40 mM 磷酸缓冲液 ($\text{pH } 8.0$) 平衡，接着用含有 $0.15 \sim 0.4 \text{ M}$ NaCl 的 40 mM 磷酸缓冲液洗脱。其中 NaCl 的浓度的 0.05 M 的速度逐级升高。最终，在含 $0.20 \sim 0.25 \text{ M}$ NaCl 的缓冲液洗脱部分得到比活性为 $15.4 \text{ U}/A_{280}$ 的 HCII，收率为 92% 。

按粗纯化品计算，回收部分 HCII 的比活性上升到 $69 \sim 91$ 倍，收率为 71% 。将得到的含 HCII 的部分，用 $10 \sim 20\%$ 梯度凝胶（第一化学制）以及 SDS-PAGE ($20 \text{ mA}/\text{凝胶}$ ，约 1.5 小时) 进行分析。凝胶的染色用快速染色盒（和光纯药制）进行。结果在相当于有效 HCII 的 72 KDa 位置检出了主带，此外还检出了 66 KDa 及未知的 35 KDa 的两个带。其中 66 KDa 相当于 N 末端缺少 42 个氨基酸的低分子化 HCII。将该含 HCII 的级分置于冷室时，HCII 的低分子化会进一步进行，最终将检不出 72 KDa 的分子。由此可知，依靠固相化肝素处理及阴离子交换层析分离处理不能够除去 HCII 低分子化因子，特别是蛋白酶。

(3) 凝胶过滤层析

将 (2) 得到的含 HCII 的部分用 10 KDa 截断超滤膜进行浓缩。浓缩后的蛋白浓度为 20 mg/ml ，将该浓缩蛋白加到凝胶过滤层析柱 Superdex 200 pg ($\phi 1.6 \times 60 \text{ cm}$; Pharmacia 制备) 上。所加体积约为柱体积的 1% (1.2 ml)，按下述条件洗脱。

缓冲液：含 0.15 M NaCl 的 20 mM 磷酸缓冲液 ($\text{pH } 8.0$)

流速： 10 小时/柱

温度： 4°C

其结果，HCII 活性峰出现在相当于 72 KDa 分子的主要级分（有效 HCII 级分），并且与低分子级分（低分子化 HCII 级分）得到分离。有效 HCII 纯化部分的比活性是 $11.1 \text{ U}/A_{280}$ 。SDS-PAGE 分析的结果，在 72 KDa 位置给出了一个单一的带，进而用 HPLC ($\text{G } 3000 \text{ SW}_{\text{XL}}$) 进行分离，也检出一个单一的峰。由此可知，该纯化级分基本上不含低

分子化及多聚化 HCII 分子。另外，该纯化级分的着色度〔定义为 $C.I. = A_{410}/A_{280} \times 1000$ 〕是 12.3。并且基本上不含触珠蛋白与转铁蛋白。然而，当该有效 HCII 纯化级分在冷室或室温放置时，与上述（2）的情况相同会发生低分子化。由此可知，低分子化因子（蛋白酶）用
5 凝胶过滤也不能除去。

比较例 2. 从人血浆纯化 HCII（II）

（1）固相化肝素处理

按比较例 1 - （I）同样的方法，进行固相化肝素处理。只需将该法中的缓冲液变为 20mM Tris-HCl 缓冲液（pH 8.5），加到柱上的
10 粗纯化品量变为 $30 [A_{280}] / \text{mL}$ 凝胶，将洗脱液改为含 0.1M NaCl 的 20mM Tris- 盐酸缓冲液（pH 8.5）即可。结果，与粗纯化品相比，经过上述处理，HCII 级分的比活性升高了 13.6 ~ 19.3 倍。

（2）阴离子交换层析层析

用含有 0.15 ~ 0.45M NaCl 的 40mM 磷酸缓冲液（pH 8.0）洗脱吸
15 附在载体上的部分，其中，NaCl 的浓度以每次 0.05M 的速度逐级升高。其他操作均与比较例 1 - （2）相同。其结果，在含有 0.20 ~ 0.25M NaCl 的缓冲液洗脱部分，得到了比活性为 $17.4 \text{ U}/A_{280}$ 的 HCII，回收率为 95%。

由粗纯化品计算，含 HCII 级分的比活性上升了 76 ~ 102 倍，回
20 收率为 66%。将此含有 HCII 的级分按比较例 1 - （2）的方法进行 SDS - PAGE 分析，在相当于有效 HCII 的 72 KDa 的位置检出了主带，但除此之外，在 66 KDa 及未知的 35 KDa 处还检出两个带。其中 66 KDa 相当于 N 末端缺少 42 个氨基酸残基的低分子化 HCII。当把该含有 HCII 的级分放置于冷室时，也发生 HCII 的低分子化最终将检不出 72
25 KDa 的分子。

（3）凝胶过滤层析

在（2）中得到的含有 HCII 的部分，进一步用截断量为 10 KDa 超滤膜使蛋白质浓缩至 20 mg/ml，将浓缩部分加至凝胶过滤层析 Superdex 200 pg（ $\phi 1.6 \times 60\text{cm}$ ）上，按下述条件洗脱。其中加样量
30 约为柱体积的 1%（1.2 mL）。

缓冲液： 含 0.15M NaCl 的 20mM 磷酸缓冲液（pH 8.0）

流速： 10 小时/柱

温度: 4℃

结果, HCII 活性峰出现在相当于 72 KDa 分子的主要分离部分(有效 HCII 纯化级分), 与低分子分离部分(低分子化 HCII 级分)得以分离。有效 HCII 纯化级分与 A_{280} 的最大峰一致(图 1)。有效 HCII 纯化级分的比活性是 $17.1 \text{ U}/A_{280}$ 、在 SDS - PAGE 的分析结果中, 72 KDa 处给出了单一的带。由此表明, 该纯化级分基本上不含低分子化及多聚化 HCII 分子。另外, 该纯化级分的着色度〔定义为 $C. I. = A_{410}/A_{280} \times 1000$ 〕是 4.2, 基本上不含触珠蛋白与转铁蛋白。另外在获得的 HCII 纯化级分中, HCII 占总蛋白量的 99.9% 以上。与比较例 1 一样, 会发生低分子化。

实施例 1 以疏水性层析法除去低分子化因子

取一部分在比较例 2 - (2) 得到的含 HCII 的级分, 在 4℃ 条件下, 通过 Butyl Toyopearl (Tosoh 公司制) 后, 在 25℃ 培养 48 小时以上。其中 Butyl Toyopearl 预先用含 1.5M 以上 NaCl 的 40mM 磷酸缓冲液 (pH 7.1) 平衡。用 HPLC 测定该溶液, 未发现低分子化 HCII 的含有率增高。因此, 证明了用上述疏水性层析分离处理, 可除去低分子化因子。

实施例 2 以疏水性层析除去低分子化因子 (II)

疏水性层析载体使用苯基琼脂糖 (Pharmacia 公司制), 载体的平衡使用含 0.1M 以上 NaCl 的磷酸缓冲液 (pH8)。其他均按实施例 1 进行操作。未吸附部分也按实施例 1 的方法处理, 测定有无 HCII 的低分子化。结果显示没有发生低分子化。接着进行凝胶过滤层析。结果显示在 SDS - PAGE 上的 72 KDa 位置。有一个单一的带, 用 HPLC 分析时, 也只出现一个单一的峰(图 3)。因此表明在该纯化部分不仅不含低分子化因子, 基本上也不含低分子化及多聚化 HCII。

实施例 3 使用以赖氨酸为配体的亲和性层析除去低分子化因子

将一部分在比较例 2 - (2) 得到的含 HCII 的级分, 4℃ 下通过以赖氨酸为配体的交联琼脂糖载体、所得到的未吸附部分按实施例 1 相同的方法处理, 检测有无 HCII 的低分子化。同样未观察到低分子化发生。由此可知, 上述亲和性层析处理能除去低分子化因子。

实施例 4 用水溶性多聚物除去低分子化因子

取一部分比较例 2-(2) 的含 HCII 的级分, 再加入 PEG 4000 或聚氧乙烯(160)聚丙(30)二醇(商品名: Pluronic F68), 放置一定时间后, 离心回收上清液。该上清液按比较例 2-(3) 的步骤处理后, 再按实施例 1 的方法处理, 检测有无低分子化 HCII, 同样未观察到 HCII 的低分子化。由此可知, 用上述水溶性多聚物或非离子性表面活性剂进行分级分离, 能除去低分子化因子。

实施例 5 通过盐析除去低分子化因子

在一部分来自于比较例 2-(2) 的含 HCII 的级分中, 加入 1M 氯化钡溶液, 使其浓度为 5~20% (v/v), 放置一定时间后, 离心分离, 回收上清液。将该上清液按比较例 2-(3) 步骤处理后, 再以实施例 1 同样的方法进行处理, 检测有无 HCII 的低分子化, 同样未观察到 HCII 的低分子化。由此可知, 通过上述盐析处理能除去低分子化因子。

实施例 6 通过用多孔性中空纤维的过滤处理除去病毒

多孔性中空纤维使用 BMM (Bemberg Microporous Membrane (微孔膜)、旭化成株式会社) 的组件。BMM 是多孔性中空纤维, 其制备原料为再生纤维素, 并以铜氨法制成。BMM 组合使用 Planova® 15 (旭化成株式会社制)。其中, Planova® 15 是由 150 层以上的多层构造形成的膜壁。组合内的多孔性中空纤维的尺寸如下。

平均孔径: $15\text{nm} \pm 2\text{nm}$

中空纤维内径: $330 \pm 30\mu\text{m}$

膜厚: $27 \pm 3\mu\text{m}$

该组合是由上述多孔性中空纤维和耐高压湿热灭菌的聚碳酸酯制成的塑料容器以及使之粘合在一起的聚氨酯类粘合剂构成。该组合经高压灭菌。其中注满注射用蒸馏水。对于各种 Planova 构成材料的安全性, 均按日本药局方规定的方法进行了确认(摘自 BMM 商品说明书)。

在实施例 1 获得的基本上不含低分子化因子、低分子化 HCII、多聚化 HCII 及着色物的纯化 HCII 级分中, 加入 HCV 阳性血浆, 以 $0.22\mu\text{m}$ 的滤膜 (Millipore 制) 过滤后, 再根据交叉流过液法用 BMM 组件过滤。过滤条件: HCII 溶液温度 $4 \sim 10^\circ\text{C}$ 、过滤压力 0.8

Kgf/cm²。在该过滤步骤中，HCII 在滤液中的回收率为 97%。过滤处理结束后，调整 HCII 溶液的效价并进行除菌过滤。得到的 HCII 溶液分装后制成液体制剂。

实验例 1 确认除病毒效果

5 在实施例 6 得到的制剂中，丙型肝炎病毒基因组量用 PCR 法测定。

(1) 提取样品中的 RNA

在该制剂中加入胍、硫氰酸胍及十二烷基肌氨酸钠、进一步加入酚。氯仿，除蛋白。其次，以异戊醇沉淀 RNA。各反应均在室温进行。

10 (2) 用反转录酶制备 cDNA

从 (1) 得到的 RNA 与随机六聚体退火，用逆转录酶在 42℃ 反应 1 小时，得到 cDNA。

(3) 用巢式 PCR 法增幅 cDNA

15 用 HCV 引物〔自 HCV 基因组的 5' 末端非编码区，5' - GTGAGTACACCGGAATTGCC - 3' (序列号 1) 和 5' - CACGGTCTACGAGACCTCCC - 3' (序列号 2) 用作正义引物链，5' - ACGACCGGGTCCTTTCTTGG - 3' (序列号 3) 和 5' - GCACTCGCAAGCACCTATC - 3' (序列号 4) 用作反义引物〕和 Taq 聚合酶、扩增 HCV cDNA。在 94℃，30 秒热变性、在 55℃ 2 分钟退火。
20 cDNA 的扩增，在 72℃ 进行 2 分钟。该项操作循环 20 次以上，得到反应产物。

(4) PCR 反应产物的分析

对于在 (3) 得到的反应产物，进行聚丙烯酰胺电泳 (PAGE) 6% (w/v)。其中使用了溴化乙锭。

25 实验结果，过滤处理前 HCII 溶液中 HCV 基因组量是 103 PCR 单位/ml，而过滤处理后降低到检出限度 (1PCR 单位/ml) 以下。

工业上使用的可能性

30 因为按本发明的 HCII 制剂制备法能除去低分子化因子，所以在 HCII 保存过程中不会发生分解 (低分子化)。因而，可以提供更高纯度的安全有效的 HCII 制剂。

序列表的单独文字说明

序列号 1

一种被设计好的寡核苷酸, 将其作为扩增 HCV 基因组 5' 末端非编码区的正义引物。

序列号 2

5 设计的一种寡核苷酸, 使其作为扩增 HCV 基因组 5' 末端非编码区的正义引物。

序列号 3

设计的一种寡核苷酸, 使其作为扩增 HCV 基因组 5' 末端侧非编码区的反义引物。

序列号 4

10 设计的一种寡核苷酸, 使其作为扩增 HCV 基因组 5' 末端侧非编码区的反义引物。

本专利申请是以在日本提出的平成 9 年专利申请第 320349 号为基础作成的, 在上述专利申请中的内容全部包含在本说明书中。

15 另外, 在本文述及的专利及专利申请说明书的所有公开物, 通过引用的形式, 将其全部内容编入到本说明书中。

样品序列表

- <110> 吉富制药有限公司
- <120> 肝素辅因子II制剂及其生产方法
- <130> 09276
- <150> JP 9-320349
- <151> 1997-11-05
- <160> 4
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 设计用来扩增HCV基因组5'非编码区的正义引物
- <400> 1
- gtgagtacac cggaattgcc 20
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 设计用来扩增HCV基因组5'非编码区的正义引物
- <400> 2
- cacggtctac gagacctccc 20
- <210> 3
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>

<223> 设计用来扩增HCV基因组5'非编码区的正义引物

<400> 3

acgaccgggt cctttcttgg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 设计用来扩增HCV基因组5'非编码区的正义引物

<400> 4

gcactcgcaa gcaccctatc 20

说明书附图

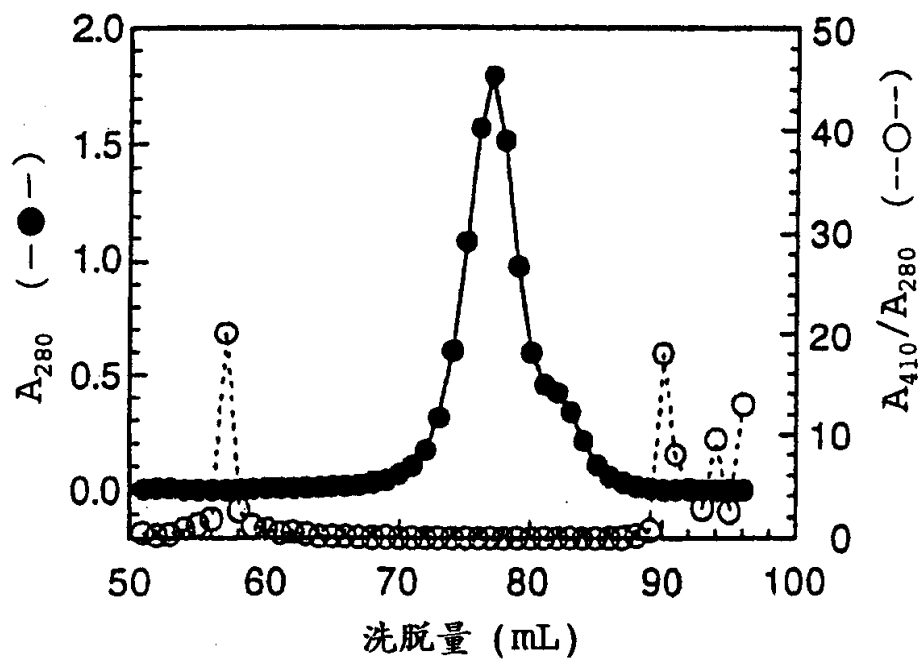


图 1

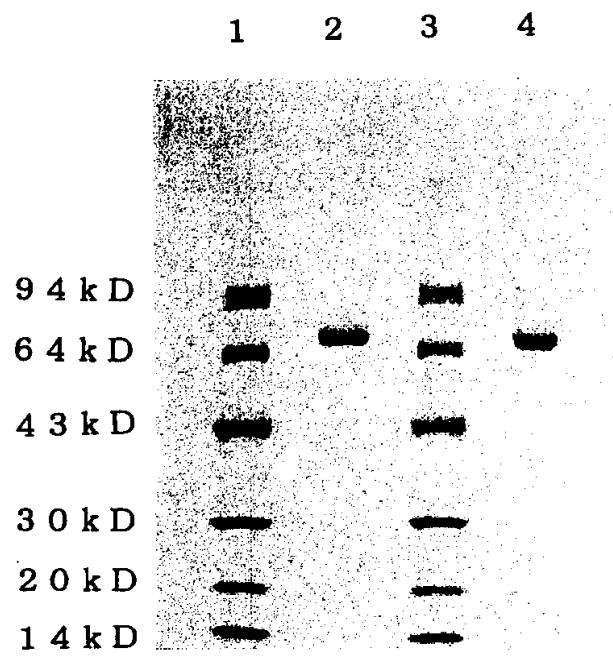


图 2

00:07:05

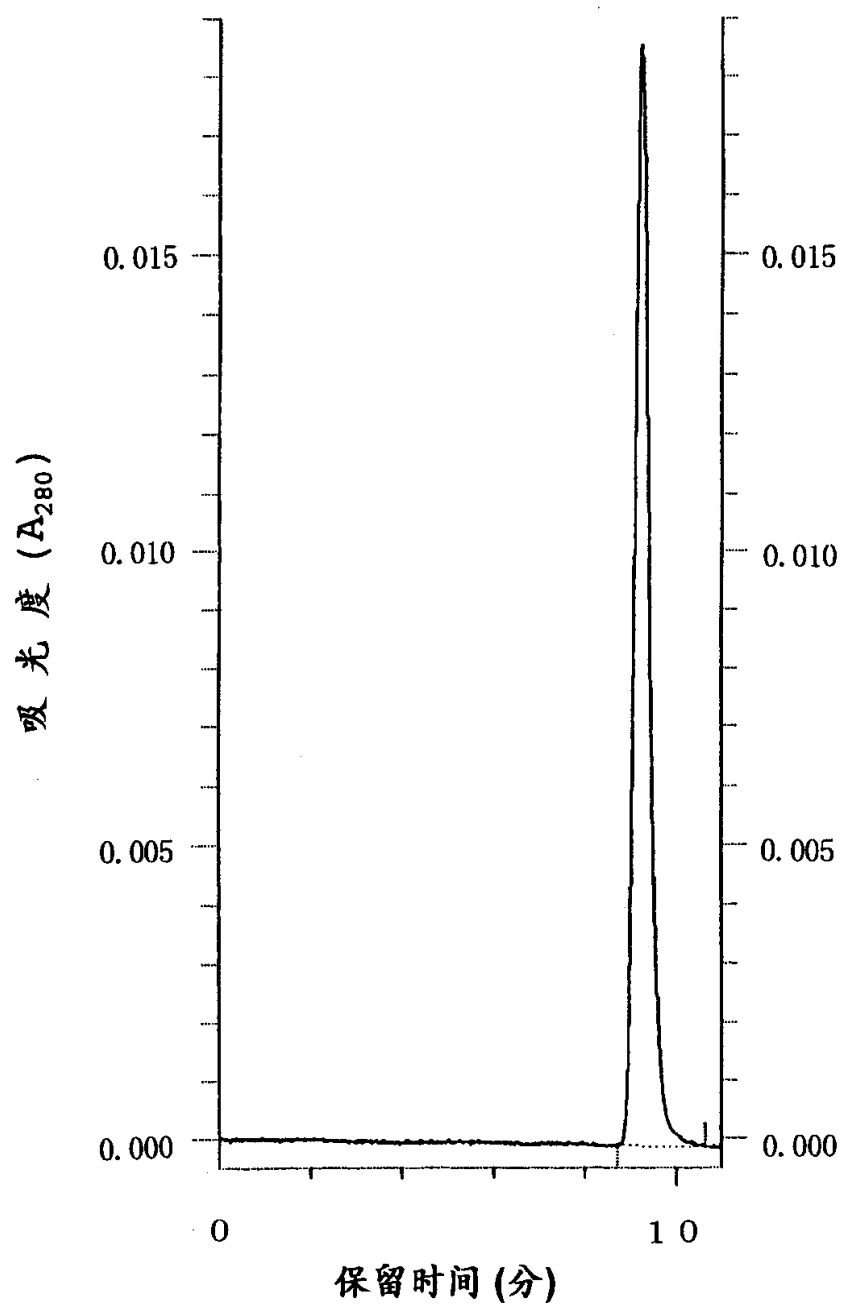


图 3