



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103282045 A

(43) 申请公布日 2013.09.04

(21) 申请号 201180058402.1 (51) Int. Cl.
(22) 申请日 2011.11.30 *A61K 38/37*(2006.01)
(30) 优先权数据 *A61K 47/48*(2006.01)
10195288.5 2010.12.16 EP *C07K 14/755*(2006.01)
61/424389 2010.12.17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日
2013.06.04

(86) PCT申请的申请数据
PCT/EP2011/071339 2011.11.30

(87) PCT申请的公布数据
W02012/079979 EN 2012.06.21

(71) 申请人 诺沃—诺迪斯克有限公司
地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 克里斯蒂安·里舍尔
C. 杰斯佩加尔德 A. 博格斯内斯
J. 克拉鲁普

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 刘健 李进

权利要求书1页 说明书9页

(54) 发明名称
因子 VIII 水溶液

(57) 摘要
本发明涉及在包含相对高浓度 FVIII 的水溶液中使 FVIII 稳定化的方法。本发明进一步涉及这些水溶液及其用途。

1. 在具有至少 1 $\mu\text{g/ml}$ FVIII 浓度和 pH 5.5-8.5 的水溶液中使 FVIII 稳定化的方法,其中所述方法包括使 FVIII 保持在包含至少 300mM 浓度的盐和 5-30% 浓度的甘油的水溶液中。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述水溶液包含 2-20 mM 浓度的二价阳离子。

3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的方法,其中所述水溶液包含 0.05-0.3 g/kg 浓度的去垢剂。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述盐是 NaCl。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的方法,其中所述水溶液中的盐浓度是 300-1000 mM。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中 FVIII 是 B 结构域截短的变体,所述 FVIII 浓度是至少 1 $\mu\text{g/ml}$,所述盐浓度是约 500 mM,所述甘油浓度是 10-20%,所述二价阳离子浓度是约 10 mM,所述去垢剂浓度是 0.1-0.2 g/kg,且所述溶液的 pH 是 6-8。

7. FVIII 水溶液,包含至少 1 $\mu\text{g/ml}$ FVIII, pH 5.5-8.5,至少 300 mM 浓度的盐,和 5-30% 浓度的甘油。

8. 根据权利要求 7 所述的溶液,其中所述溶液进一步包含 0.05-0.3 g/kg 浓度的去垢剂。

9. 根据权利要求 7-8 中任一项所述的溶液,其中所述溶液进一步包含 2-20 mM 浓度的二价阳离子。

10. 根据权利要求 7-9 中任一项所述的 FVIII 溶液,其中所述盐是 NaCl。

11. 根据权利要求 7-10 中任一项所述的 FVIII 溶液,其中所述水溶液中的盐浓度是 300-1000 mM。

12. 根据权利要求 7-11 中任一项所述的 FVIII 溶液,其中 FVIII 是 B 结构域截短的变体,所述 FVIII 浓度是至少 1 $\mu\text{g/ml}$,所述盐浓度是约 500 mM,所述甘油浓度是 10-20%,所述二价阳离子浓度是约 10 mM,所述去垢剂浓度是 0.1-0.2 g/kg,且所述溶液的 pH 是 6-8。

13. 用于大小排阻层析分离或纯化 FVIII 的方法,其中在使用根据权利要求 1-6 中任一项所述的方法和根据权利要求 7-12 中任一项所述的溶液分离或纯化期间,使 FVIII 稳定化。

14. 用于翻译后修饰 FVIII 的方法,其中在使用根据权利要求 1-6 中任一项所述的方法和根据权利要求 7-12 中任一项所述的溶液修饰过程期间,使 FVIII 稳定化。

15. 根据权利要求 7-12 中任一项所述的溶液或根据权利要求 1-6 中任一项所述的方法用于使 FVIII 稳定化的用途。

因子 VIII 水溶液

[0001] 本发明涉及提高因子 VIII 得率的方法领域。特别是,本发明涉及用于减少因子 VIII 聚集形成 / 沉淀的方法和缓冲液组合物 / 水溶液。

背景技术

[0002] FVIII/ 因子 VIII 是一种大的复合糖蛋白,以血浆来源形式,或以可任选地通过例如化学和 / 或酶学方法翻译后修饰的重组蛋白形式用于 A 型血友病的治疗 / 预防。

[0003] 使大蛋白在溶液中保持高浓度通常有困难,因为它们倾向于形成聚集。众所周知, FVIII(具有或不具有 B 结构域)相比大多数其他蛋白具有较差的溶解性。在低如 15 μ g/ml 的浓度可以发生可见的沉淀,在低得多的浓度发生不可见的聚集,这在涉及例如想要保持 FVIII 浓度远高于 1 μ g/ml 下进行蛋白翻译后修饰时是特别不希望的。涉及例如存储和 / 或纯化 FVIII 时也希望 FVIII 保持在高浓度下。最后,难以获得高得率的哺乳动物细胞系中表达的 rFVIII,甚至在表达为 B- 结构域缺失 / 截短变体时,因此,为了将 FVIII 浓度至少 0.5 μ g/ml 的溶液中 FVIII 沉淀相关的得率损失降到最小,非常希望采取措施减少 rFVIII 聚集形成的量。

[0004] 现有技术中没有如何减少 FVIII 体外聚集形成的暗示。在 W009108806 中,涉及经过翻译后修饰的 FVIII 的纯化时,在洗脱步骤中使用 250 mM NaCl 的盐浓度。

[0005] 发明概述

本发明涉及在具有至少 1 μ g/ml 的 FVIII 浓度, pH 5.5-8.5 的水溶液中稳定 FVIII 的方法,其中所述方法包括将 FVIII 保持在包含至少 300mM 浓度盐和 5-30% 浓度甘油的水溶液中。此外,本发明涉及这些溶液及其用途。

[0006] 发明人在本文显示此成分组合可以在相对高 FVIII 浓度条件下减少 FVIII 沉淀的倾向。本发明的方法和溶液还可以用于涉及 FVIII 浓度低于 0.5 μ g/ml 的情形,例如,涉及浓度将增加到至少 0.5 μ g/ml 的 FVIII 的浓缩和 / 或纯化。

[0007] 发明详述

“FVIII/ 因子 VIII”是主要由肝细胞产生的大的复合糖蛋白。人 FVIII 由 2351 个氨基酸组成,包括信号肽,并包含几个按同源性定义的不同结构域。有三个 A- 结构域,一个独特的 B- 结构域和两个 C- 结构域。结构域顺序可以列为 NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH。FVIII 以在 B-A3 边界分离的两条链在血浆中循环。所述链通过二价金属离子结合连接。A1-A2-B 链称为重链 (HC),而 A3-C1-C2 称为轻链 (LC)。“FVIII”在本文中理解为血浆来源或重组 FVIII, wtFVIII 或在例如显色分析中具有 FVIII 活性的任何 FVIII 变体。这些 FVIII 变体的实例包括 B- 结构域截短 / 缺失变体,和 / 或缀合一个或多个侧基(例如 PEG, 其它水溶性聚合物, 脂肪酸衍生物, Fc:FVIII 融合蛋白)的 FVIII, 和 / 或在一个或多个 A 和 / 或 C 结构域具有一个或多个氨基酸修饰的 FVIII 变体等。一个或多个这些 FVIII 修饰可以造成 FVIII 变体相比 wtFVIII 循环半衰期增加。

[0008] “B 结构域”:wt FVIII 分子中 B 结构域的长度为约 907 个氨基酸。在 B 结构域截短的 FVIII 分子 / 变体中 B 结构域的长度可以从约 10 到约 800 个氨基酸变化,例如从约 10

个氨基酸到约 700 个氨基酸,例如,如约 12-500 个氨基酸、12-400 个氨基酸、12-300 个氨基酸、12-200 个氨基酸、15-100 个氨基酸、15-75 个氨基酸、15-50 个氨基酸、15-45 个氨基酸、20-45 个氨基酸、20-40 个氨基酸、或 20-30 个氨基酸变化。截短的 B- 结构域可以包含重链和 / 或轻链的片段和 / 或在 wt FVIII 分子中没有发现的人工导入的序列。术语“B- 结构域截短”和“B- 结构域缺失”在本文中可以互换使用。

[0009] 溶液的“离子强度 /I”是对该溶液中离子浓度的众所周知的量度。溶液的离子强度, I, 是该溶液中存在的所有离子的浓度的函数。表 1 将可用于本发明相关的各种盐的摩尔浓度转换为离子强度。

	NaCl, KCl, NH ₄ Ac, NaAc, KAc, NH ₄ Cl	CaCl ₂ , CaAc ₂ , MgCl ₂ , MgAc ₂ .
10 mM	10	30
30 mM	30	90
50 mM	50	150
100 mM	100	300
300 mM	300	900
500 mM	500	1500
1000 mM	1000	3000

表 1:作为不同成分的函数的离子强度 (I)。

[0010] “水溶液”/“水缓冲液”在本文理解为水为主要溶剂的溶液,其中该溶液不包含有机溶剂或包含微量和 / 或痕量有机溶剂,例如,如少于 1% 有机溶剂。

[0011] “盐”在本文理解为任何盐,例如一种或多种根据表 1 的盐。

[0012] 本发明上下文中的“甘油”指甘油以及可以替代甘油的其它化合物,例如,如多元醇,例如,如乙二醇、丙二醇、赤藓糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、1,3 - 丙二醇、二乙醇胺、蔗糖、右旋糖、海藻糖、葡萄糖。本领域技术人员众所周知的是,此类化合物在涉及水溶液中 FVIII 的稳定化方面可以替代甘油。

[0013] “去垢剂 / 表面活性剂”在本文中包括任何去垢剂 / 表面活性剂,例如一种或多种下列去垢剂:SDS、Triton X-100、X114、CHAPS、DOC、NP-40、吐温 80、和吐温 20。

[0014] 二价阳离子加入根据本发明的溶液,例如 Mg²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺。“Ca²⁺”可以以表 1 中列举的一种或多种盐形式以及 CaOH₂ 的形式加入。

[0015] “大小排阻层析 /SEC/ 凝胶过滤层析”是一种层析方法,其中溶液中的分子基于其大小(更正确地,其流体动力学体积)被分离。典型地,当水溶液用于转运样品通过柱子时,该技术称为凝胶过滤层析,与之相对的名称是凝胶渗透层析,其用于有机溶剂用作流动相时。SEC 是广泛使用的聚合物表征方法,因为其能够为聚合物提供良好的 M_w 结果。凝胶过滤层析的主要应用是蛋白和其它水溶性聚合物的分级分离,而凝胶渗透层析用于分析有机可溶性聚合物的分子量分布。

[0016] “FVIII 的翻译后修饰”在本文中指 rFVIII 或血浆来源 FVIII 的任何修饰,例如,如

分子与亲水聚合物（如聚乙二醇（PEG）、脂肪酸衍生物、白蛋白、Fc 结构域等）缀合。FVIII 的修饰 / 转化可以使用如化学和 / 或酶学方法进行。肽的酶学翻译后修饰方法的一个实例公开于 W003031464。

[0017] “FVIII 的稳定化”在本文中指活性 FVIII 损失的减少。在具有相对高 FVIII 浓度的条件下，涉及 FVIII 的储存、纯化和翻译后修饰，FVIII 得率损失的主要原因是 FVIII 分子的“聚集 / 沉淀”。从而“稳定化”在本文中可以被视为在高浓度 FVIII 溶液中 FVIII 沉淀的减少。在实施例中，展示了根据本发明的溶液和 / 或方法如何导致 FVIII 得率损失的减少。

[0018] 实施方案列表：

实施方案 1：在第一个方面，本发明从而涉及在具有 FVIII 浓度至少 1 $\mu\text{g/ml}$ 和 pH 5.5-8.5 的水溶液中稳定化 FVIII 的方法，其中所述方法包括将 FVIII 保持在包含至少 300 mM 浓度的盐，5-35% 浓度的甘油，2-20 mM 浓度的二价阳离子（优选 Ca^{2+} ），和 0.05-0.3 g/kg 浓度的去垢剂的水溶液中。

[0019] 实施方案 2：根据任意实施方案方法的 FVIII 浓度可以是至少约

0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10,000, 15,000, 20,000, 或 25,000 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0020] 实施方案 3：根据本发明任意实施方案的 FVIII 的浓度可以在如 1-25,000 $\mu\text{g/ml}$ ，例如，如例如

1-20,000 $\mu\text{g/ml}$, 1-15,000 $\mu\text{g/ml}$, 1-10,000 $\mu\text{g/ml}$, 1-5000 $\mu\text{g/ml}$, 1-4000 $\mu\text{g/ml}$, 1-3000 $\mu\text{g/ml}$, 1-2000 $\mu\text{g/ml}$, 1-1000 $\mu\text{g/ml}$, 1-900 $\mu\text{g/ml}$, 1-800 $\mu\text{g/ml}$, 1-700 $\mu\text{g/ml}$, 1-600 $\mu\text{g/ml}$, 1-500 $\mu\text{g/ml}$, 1-400 $\mu\text{g/ml}$, 1-300 $\mu\text{g/ml}$, 1-200 $\mu\text{g/ml}$, 1-100 $\mu\text{g/ml}$, 5-5000 $\mu\text{g/ml}$, 5-4000 $\mu\text{g/ml}$, 5-3000 $\mu\text{g/ml}$, 5-2000 $\mu\text{g/ml}$, 5-1000 $\mu\text{g/ml}$, 5-900 $\mu\text{g/ml}$, 5-800 $\mu\text{g/ml}$, 5-700 $\mu\text{g/ml}$, 5-600 $\mu\text{g/ml}$, 5-500 $\mu\text{g/ml}$, 5-400 $\mu\text{g/ml}$, 5-300 $\mu\text{g/ml}$, 5-200 $\mu\text{g/ml}$, 5-100 $\mu\text{g/ml}$, 10-25,000 $\mu\text{g/ml}$, 10-20,000 $\mu\text{g/ml}$, 10-15,000 $\mu\text{g/ml}$, 10-10,000 $\mu\text{g/ml}$, 10-5000 $\mu\text{g/ml}$, 10-4000 $\mu\text{g/ml}$, 10-3000 $\mu\text{g/ml}$, 10-2000 $\mu\text{g/ml}$, 10-1000 $\mu\text{g/ml}$, 10-900 $\mu\text{g/ml}$, 10-800 $\mu\text{g/ml}$, 10-700 $\mu\text{g/ml}$, 10-600 $\mu\text{g/ml}$, 10-500 $\mu\text{g/ml}$, 10-400 $\mu\text{g/ml}$, 10-300 $\mu\text{g/ml}$, 10-200 $\mu\text{g/ml}$, 10-100 $\mu\text{g/ml}$, 15-25,000 $\mu\text{g/ml}$, 15-20,000 $\mu\text{g/ml}$, 15-10,000 $\mu\text{g/ml}$, 15-5000 $\mu\text{g/ml}$, 15-4000 $\mu\text{g/ml}$, 15-3000 $\mu\text{g/ml}$, 15-2000 $\mu\text{g/ml}$, 15-1000 $\mu\text{g/ml}$, 15-900 $\mu\text{g/ml}$, 15-800 $\mu\text{g/ml}$, 15-700 $\mu\text{g/ml}$, 15-600 $\mu\text{g/ml}$, 15-500 $\mu\text{g/ml}$, 15-400 $\mu\text{g/ml}$, 15-300 $\mu\text{g/ml}$, 15-200 $\mu\text{g/ml}$, 15-100 $\mu\text{g/ml}$, 20-5000 $\mu\text{g/ml}$, 20-4000 $\mu\text{g/ml}$, 20-3000 $\mu\text{g/ml}$, 20-2000 $\mu\text{g/ml}$, 20-1000 $\mu\text{g/ml}$, 20-900 $\mu\text{g/ml}$, 20-800 $\mu\text{g/ml}$, 20-700 $\mu\text{g/ml}$, 20-600 $\mu\text{g/ml}$, 20-500 $\mu\text{g/ml}$, 20-400 $\mu\text{g/ml}$, 20-300 $\mu\text{g/ml}$, 20-200 $\mu\text{g/ml}$, 或 20-100 $\mu\text{g/ml}$ 范围内。

[0021] 实施方案 4：根据本发明任意实施方案的方法，其中所述盐为选自一种或多种钠盐和 / 或一种或多种铵盐的一价盐。这些盐的实例列于表 1。

[0022] 实施方案 5：根据本发明任一实施方案的方法，其中所述盐为 NaCl。

[0023] 实施方案 6：根据本发明任一实施方案的方法，其中水溶液中所述盐浓度为 275-1500 mM，例如，如例如

275-1400 mM, 275-1300 mM, 275-1200 mM, 275-1100 mM, 275-100 mM, 275-1000 mM, 275-900 mM, 275-800 mM, 275-700 mM, 275-600 mM, 275-500 mM, 275-400 mM, 300-1500 mM, 300-1400 mM, 300-1300 mM, 300-1200 mM, 300-1100 mM, 300-1000 mM, 300-900 mM, 300-800 mM, 300-700 mM, 300-600 mM, 300-500 mM, 300-400 mM, 325-1500 mM, 325-1400 mM, 325-1300 mM, 325-1200 mM, 325-1100 mM, 325-1000 mM, 325-900 mM, 325-800 mM, 325-700 mM, 325-600 mM, 325-500 mM, 325-400 mM, 350-1500 mM, 350-1400 mM, 350-1300 mM, 350-1200 mM, 350-1100 mM, 350-1000 mM, 350-900 mM, 350-800 mM, 350-700 mM, 350-600 mM, 350-500 mM, 350-400 mM, 400-1500 mM, 400-1400 mM, 400-1300 mM, 400-1200 mM, 400-1100 mM, 400-1000 mM, 400-900 mM, 400-800 mM, 400-700 mM, 400-600 mM, 400-500 mM, 450-1500 mM, 450-1400 mM, 450-1300 mM, 450-1200 mM, 450-1100 mM, 450-1000 mM, 450-900 mM, 450-800 mM, 450-700 mM, 450-600 mM, 500-1500 mM, 500-1400 mM, 500-1300 mM, 500-1200 mM, 500-1100 mM, 500-1000 mM, 500-900 mM, 500-800 mM, 500-700 mM, 或 500-600 mM。

[0024] 实施方案 7：根据本发明任一实施方案的方法，其中 FVIII 是 B 结构域截短的变体。

[0025] 实施方案 8：根据本发明任一实施方案的方法，其中所述甘油浓度为从 5-35%，如例如，5-30%、5-25%、5-20%、5-15%、5-10%、12.5-35%、12.5-30%、12.5-25%、12.5-20%、12.5-15%、15-35%、15-30%、或 15-20% (W/W)。

[0026] 实施方案 9：根据本发明任一实施方案的方法，其中所述二价阳离子浓度为 2-20 mM，例如，如 2-15 mM、2-10 mM、2-5 mM、5-20 mM、5-15 mM、5-10 mM、10-20 mM、或 10-15 mM。二价阳离子可以表 1 所列举的，如钙盐的形式加入。

[0027] 实施方案 10：根据本发明任一实施方案的方法，其中所述去垢剂浓度为 0.05-0.5 g/kg，如例如，0.05-0.4 g/kg、0.05-0.3 g/kg、0.05-0.2 g/kg、0.05-0.1 g/kg、0.1-0.5 g/kg、0.1-0.4 g/kg、0.1-0.3 g/kg、或 0.1-0.2 g/kg。适用于本发明相关的用途的实例包括 SDS、Triton X-100、X114、CHAPS、DOC、NP-40、吐温 80，和吐温 20。

[0028] 实施方案 11：根据本发明任一实施方案的方法，其中所述溶液 pH 为 5.5-8.5，如例如，5.5-8.0、5.5-7.5、5.5-7.0、5.5-6.5、5.5-6.0、6.0-8.5、6.0-8.0、6.0-7.5、6.0-7.0、6.0-6.5、6.5-8.5、6.5-8.0、6.5-7.5、6.5-7.0、7.0-8.5、7.0-8.0、7.0-7.5、7.5-8.5、7.5-8.0、或 8.0-8.5。

[0029] 实施方案 12：根据本发明任一实施方案的方法，其中所述 FIII 分子为 B 结构域截短的变体，FVIII 浓度为至少 1 μ g/ml，盐浓度为约 500 mM，甘油浓度为 10-20%，二价阳离子浓度为约 10 mM，吐温浓度为 0.1-0.2 g/kg，并且溶液 pH 为 6-8。

[0030] 实施方案 12：包含至少 1 μ g FVIII/ml，pH 5.5-8.5，至少 300 mM 浓度的盐，5-30% 浓度的甘油，2-20 mM 浓度的二价阳离子（优选 Ca^{2+} ），和 0.05-0.3 g/kg 浓度的去垢剂的 FVIII 水溶液。去垢剂优选吐温 20。

[0031] 实施方案 13：根据本发明任一实施方案的 FVIII 溶液，其中所述盐是一价盐，所

述一价盐选自：钠盐或铵盐。

[0032] 实施方案 14：根据本发明任一实施方案的 FVIII 溶液，其中所述盐是 NaCl。

[0033] 实施方案 15：根据本发明任一实施方案的 FVIII 溶液，其中所述水溶液中盐浓度为 300-1000 mM。优选盐为 NaCl。

[0034] 实施方案 16：根据本发明任一实施方案的 FVIII 溶液，其中所述 FVIII 分子是 B 结构域截短的变体，FVIII 浓度为至少 1 μ g/ml，盐浓度为约 500 mM，甘油浓度为 10-20%，Ca²⁺ 浓度为约 10 mM，吐温浓度为 0.1-0.2 g/kg，并且溶液 pH 为 6-8。

[0035] 实施方案 17：根据本发明任一实施方案的 FVIII 溶液，可进一步包含涉及实施方案 2 所述的 FVIII 浓度，实施方案 6 中所述的盐浓度，实施方案 8 中所述的甘油浓度，实施方案 9 中所述的二价阳离子浓度，实施方案 10 中所述的去垢剂浓度，和实施方案 11 中所述的 pH。具体盐可以选自本文提示的任何替代物。二价阳离子具体来源可以类似的选自本文提示的任何替代物。去垢剂的具体来源可以类似的选自本文提示的任何替代物。

[0036] 实施方案 18：FVIII 大小排阻层析分离或纯化的方法，其中 FVIII 在分离或纯化时，使用根据本发明任一实施方案的方法和 / 或根据本发明任一实施方案的溶液进行稳定化。

[0037] 实施方案 19：FVIII 翻译后修饰的方法，其中 FVIII 在修饰过程中，使用根据本发明任一实施方案的方法和 / 或根据本发明任一实施方案的溶液进行稳定化。

[0038] 实施方案 20：根据本发明任一实施方案的溶液和 / 或根据本发明任一实施方案的方法用于稳定化 FVIII 的用途。

[0039] 实施方案 21：在具有 FVIII 浓度至少 1 μ g/ml 和 pH 5.5-8.5 的水溶液中稳定化 FVIII 的方法，其中所述方法包括将 FVIII 保持在包含至少 300 mM 浓度的盐和 5-30% 浓度的甘油的水溶液中。

[0040] 实施方案 22：根据本发明任意实施方案的方法，其中所述水溶液包含 2-20 mM 浓度的二价阳离子。

[0041] 实施方案 23：根据本发明任意实施方案的方法，其中所述二价阳离子是 MgCl₂。

[0042] 实施方案 24：根据本发明任意实施方案的方法，其中所述二价阳离子是 CaCl₂。

[0043] 实施方案 25：根据本发明任一实施方案的方法，其中所述水溶液包含 0.05-0.3 g/kg 浓度的去垢剂。所述去垢剂优选为吐温。

[0044] 实施方案 26：FVIII 水溶液，包含至少 1 μ g/ml FVIII，pH 5.5-8.5，至少 300 mM 浓度的盐，和 5-30% 浓度的甘油。

[0045] 实施方案 27：根据本发明任意实施方案的溶液，其中所述溶液进一步包含 0.05-0.3 g/kg 浓度的去垢剂。所述去垢剂优选为吐温。

[0046] 实施方案 28：根据本发明任一实施方案的溶液，其中所述溶液进一步包含 2-20 mM 浓度的二价阳离子。

[0047] 实施方案 29：根据本发明任意实施方案的溶液，其中二价阳离子是 MgCl₂。

[0048] 实施方案 30：根据本发明任意实施方案的溶液，其中二价阳离子是 CaCl₂。

实施例

[0049] 实施例 1：

FVIII 溶液经缓冲液交换到 10 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 20% (v/v) 甘油, 2 mM CaCl₂, 0.02% 吐温 80, pH 7.5, 并且浓缩到约 30 mg/ml。用于蛋白结晶的 96 孔微量滴定板以下列模式用缓冲液装配：

行（与因子 VIII 混合后的最终浓度）：

- A. 50 mM 醋酸钠 , pH 5.0,
- B. 50 mM His, pH 5.5,
- C. 50 mM His, pH 6.0,
- D. 50 mM 咪唑 , pH 6.5,
- E. 50 mM 咪唑 , pH 7.0
- F. 50 mM HEPES, pH 7.5
- G. 50 mM HEPES, pH 8.0
- H. 50 mM Gly-gly, pH 9.0

列：

- 1 和 7: 0 M NaCl
- 2 和 8: 0.08 M NaCl
- 3 和 9: 0.2 M NaCl
- 4 和 10: 0.33 M NaCl
- 5 和 11: 0.53 M NaCl
- 6 和 12: 0.8 M NaCl

[0050] 所有孔含有 20 % 甘油, 0.02% 吐温 80。列 1-6 含有 2 mM CaCl₂, 列 7-12 含有 16 mM CaCl₂。200 nL FVIII 溶液 + 400 nL 缓冲液在液滴中组合, 所述板用透明膜密封, 孵育 24 小时, 在显微镜下检查。液滴根据下列等级对沉淀进行评分: 无: 澄清, 低: 微弱沉淀, 高: 大量沉淀。结果显示在下表中：

	2 mM CaCl ₂						16 mM CaCl ₂					
	0 M NaCl	0.08 M NaCl	0.2 M NaCl	0.33 M NaCl	0.53 M NaCl	0.8 M NaCl	0 M NaCl	0.08 M NaCl	0.2 M NaCl	0.33 M NaCl	0.53 M NaCl	0.8 M NaCl
pH 5.0	高	高	高	高	高	高	高	高	高	高	高	低
pH 5.5	高	高	高	无	无	无	高	高	低	无	无	无
pH 6.0	高	高	无	无	无	无	高	高	无	无	无	无
pH 6.5	高	高	低	无	无	无	高	高	无	无	无	无
pH 7.0	高	低	无	无	无	无	高	无	无	无	无	无
pH 7.5	低	无	无	无	无	无	高	无	无	无	无	无
pH 8.0	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	低	无
pH 9.0	高	高	高	低	低	无	无	无	无	无	无	无

表 2：不同条件下, 在 10 mg/ml 因子 VIII 的 600 纳升点滴中在显微镜下观察到的沉淀。

[0051] 看到 0.33 M 的 NaCl 浓度和以上（行 4-6, 10-12）最适于避免沉淀, 特别在最低 pH 值下。

[0052] 实施例 2:

FVIII 溶液经缓冲液交换到 10 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 20% (v/v) 甘油, 10 mM CaCl₂, 0.02% 吐温 80, pH 7.5, 并且在 amicon 旋转过滤器上浓缩到 19 mg/ml。384 孔微量滴定板以下列模式装配:

行（与因子 VIII 混合后的最终浓度）:

- A. 50 mM His, pH 5.5,
- B. 50 mM His, pH 6.0,
- C. 50 mM 咪唑, pH 6.5,
- D. 50 mM 咪唑, pH 7.0
- E. 50 mM HEPES, pH 7.5
- F. 50 mM HEPES, pH 8.0

列:

- 1: 0 M NaCl
- 2: 0.17 M NaCl
- 3: 0.23 M NaCl
- 4: 0.3 M NaCl
- 5: 0.4 M NaCl
- 6: 0.5 M NaCl

[0053] 所有孔含有 20 % 甘油, 0.02% 吐温 80 和 10mM CaCl₂。缓冲液和因子 VIII 混合, 使最终因子 VIII 浓度为 5mg/ml。在 Wyatt DynaPro 读数器中测量每孔光散射强度。更高的强度表明更高的自结合。结果显示在下表中:

归一化的强度						
	pH 5.5	pH 6	pH 6.5	pH 7	pH 7.5	pH 8
0.17 M NaCl	4.98E+08	1.01E+09	5.07E+08	2.91E+09	1.27E+09	1.18E+09
0.23 M NaCl	1.53E+09	9.86E+08	1.67E+09	7.52E+08	6.15E+08	5.02E+08
0.3 M NaCl	1.22E+09	3.27E+09	8.34E+08	4.44E+08	3.67E+08	4.24E+08
0.4 M NaCl	8.27E+08	1.92E+09	3.18E+08	2.12E+08	2.63E+08	3.05E+08
0.5 M NaCl	1.52E+09	4.65E+08	2.16E+08	1.55E+08	1.63E+08	1.92E+08

表 3: 不同 pH 值和 NaCl 浓度下 5 mg/ml FVIII 的光散射强度 (归一化的计数率)。

[0054] 看到在高 NaCl 浓度处发现表明低自结合度的最低的强度。

[0055] 虽然本文已经阐释且描述了本发明的某些特征, 那些本领域技术人员现在将想到很多修饰、替代、改变和等价方案。因此, 应当理解, 所附的权利要求旨在覆盖落入本发明真正的精神内的所有这些修饰和改变。

[0056] 实施例 3:

UF/DF

2150 g 含 N8 的溶液分别调整 pH 到 6.13 和 CaCl₂ 到总共 10mmol/kg。含 N8 的溶液随后通过超滤浓缩到约 4mg/ml, 然后用 5 倍体积含 20 mmol/kg 组氨酸, 9 mmol/kg HCl, 0.5

mol/kg NaCl, 10 mM/kg CaCl₂, 20% 甘油 pH 6.16 的缓冲液, 通过渗滤进行缓冲液交换。含 N8 的溶液然后进一步浓缩到 9.54 mg/ml。得率取决于分析方法在 97-98% 范围内。完成浓缩后测量的总 HMWP 水平如下表所示。总之, 这证明在高 NaCl 浓度条件下尽管 FVIII 浓度显著增加, 但是缺少 HMWP 形成。

样品描述	HMWP (%)	二聚体 (%)	总 HMWP (%)
N8 起始材料	< 0.3	< 0.3	< 0.3
N8 UF/DF	< 0.3	< 0.3	0.4

表 4:

实施例 4

FVIII 的 PEG 化

起始材料是在 0.5 M 氯化钠, 10 mM 氯化钙, 20% 甘油, 20 mM 组氨酸和 9 mM 盐酸中含有 7.5 mg/ml FVIII, pH 6.1 的溶液。向 210ml 此溶液中加入 1.3mg 唾液酸酶, 42mg ST3Gal1 和 1.7g 40K PEG, 使之在周围室温下反应 17.7 小时。在反应结束时没有混浊或沉淀的迹象。

[0057] 实施例 5

FVIII 分子流通模式的疏水相互作用层析

此步骤的目的是通过疏水相互作用层析的手段, 去除用于将 40K 聚乙二醇基团共价修饰的 FVIII 分子唾液酸化的酶 (ST3Gal3), 和 HMWP (高分子量蛋白)。直径 0.5cm 的层析柱用 TSK Phenyl 5PW 树脂装填至柱床高 10.5 cm, 获得 2.1ml 的柱床体积。层析柱用 5 倍柱体积的包含 450 mM 氯化钠、10 mM 氯化钙、10% 甘油、0.02% 聚山梨酯 80, 20mM 组氨酸和 9mM 盐酸, pH 6.1 并且电导率为 ~35mS/cm 的缓冲液平衡。向包含 1.05 mg/ml 浓度的 FVIII 分子和 0.025 mg/ml ST3Gal3 的上样物中加入氯化钠以达到与平衡缓冲液相同的电导率, 加入组氨酸和盐酸以调整到 pH 6.1。上样物 (37.5ml) 通过层析柱随后是平衡缓冲液。在流通液中收集没有结合到层析柱上的纯化的 FVIII 产品, 得到 41.1ml 0.85mg/ml 浓度的流通液。得率为 88.7%。高分子量蛋白含量从 1.5% 减少到 1.0%。ST3Gal3 从 ~24000ppm 减少到 1328ppm, 相当于 ~18 倍的减少。

[0058] 实施例 5

SEC 样品

使用 AKTA explorer 和装填 1.8 L (10 h x 23.5 cm h) 的 GE Healthcare 的 Superdex 200 的 BPG10 层析柱, 对含有共价结合 40K PEG 的 rFVIIIa 和其反应物 (rFVIII 和 PEG) 的反应混合物进行大小排阻层析。流速为 0.8 CV/hr (4.24 ml/min), 温度 22°C, 运行缓冲液由下列成分组成:

L-组氨酸	5.8 g/kg	37.4 mmol/kg
37% HCl	0.7 g/kg	7.1 mmol/kg
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.97 g/kg	6.6 mmol/kg
L-甲硫氨酸	0.21 g/kg	1.4 mmol/kg
NaCl	34.9 g/kg	597 mmol/kg
蔗糖	11.6 g/kg	33.9 mmol/kg
聚山梨酯 80	10 g/kg	

[0059] 上样前,层析柱用 1CV 氢氧化钠清洗,UV 自动归零前用 1.2CV 缓冲液平衡。

[0060] 层析柱用 92 ml (约 5 % 的 CV),具有 1.05 mg/ml 浓度的反应混合物(总共 97 mg)上样。

[0061] 当 UV 吸收信号超过 0.15 AU/cm 时,收集合并物,获得合并体积 202 ml,浓度 0.46 mg/ml,结果收率 98 %。

[0062] 使用所述的大小排阻层析步骤以减少处理酶以及其它污染物。通过 SEC 步骤,处理酶 ST3Ga13 减少 330 倍(从约 1328ppm 到 4ppm)。