



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 96195517.1

[45] 授权公告日 2004 年 5 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1149103C

[22] 申请日 1996.4.4 [21] 申请号 96195517.1

[30] 优先权

[32] 1995. 5. 20 [33] EP [31] 95107710.6

[86] 国际申请 PCT/EP1996/001488 1996.4.4

[87] 国际公布 WO96/036369 英 1996.11.21

[85] 进入国家阶段日期 1998.1.14

[71] 专利权人 奥克塔法马有限公司

地址 瑞士兰琴

[72] 发明人 W·马尔古雷 H·施文

L·比瑟尔特

审查员 彭郁葱

[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 谭明胜

权利要求书 2 页 说明书 4 页

[54] 发明名称 降低潜在感染材料的感染性的方法

[57] 摘要

一种降低潜在感染材料的病毒感染性的方法，潜在感染材料如人或动物体液或从中可分离出生物活性物质的体液部分，其中感染性归因于非脂包被的病毒，该方法的特征在于：欲从中分离所说生物活性物质的潜在感染材料以疏水相处理，该疏水相基本上不溶于水，且能与潜在感染材料形成两相系统，和将该疏水相由这样处理的潜在感染材料中分离出来。

1. 一种降低从中可分离出生物活性物质的离体人或动物体液或从其得到的体液部分的、归因于非脂包被病毒的病毒感染性的方法，该方法的特征在于：

将欲从中分离所说生物活性物质的所述人或动物体液或从其得到的体液部分以疏水相处理，

该疏水相基本上不溶于水，且能与所述人或动物体液或从其得到的体液部分形成两相系统，和

将该疏水相从这样处理的所述人或动物体液或从其得到的体液部分中分离出来。

2. 根据权利要求1的方法，其中所述人或动物体液或从其得到的体液部分为血或血浆或处理过的血或血浆。

3. 根据权利要求2的方法，其中所述处理过的血或血浆为冷沉淀物。

4. 根据权利要求1的方法，其中可由所述人或动物体液或从其得到的体液部分中分离的生物活性物质为蛋白质。

5. 根据权利要求4的方法，其中所述生物活性物质为血液凝固级联因子。

6. 根据权利要求1的方法，其中所述疏水相由非极性有机液体组成。

7. 根据权利要求6的方法，其中所述有机液体为室温下为油状的液体或低熔点脂肪。

8. 根据权利要求1的方法，其中所述人或动物体液或从其得到的体液部分除以疏水相处理外，还同时或后续地以非离子型去污剂，以及烷基磷酸酯处理，以更有效地降低其感染性。

9. 根据权利要求8的方法，其中所述非离子型去污剂是聚醚。

10. 根据权利要求8的方法，其中所述烷基磷酸酯为三正丁基磷酸酯，所述聚醚为Triton衍生物。

11. 根据权利要求1的方法，其中所说的疏水相与所述人或动物体液或从其得到的体液部分充分混合，分相后使各相分开。

12. 根据权利要求1的方法，其中经疏水相处理已降低感染性的材料通过分离过程进一步分成不同部分，分离过程包括亲和层析、离子交

换层析、电泳、凝胶渗透层析和疏水反相层析。

13. 权利要求 1 到 12 任何一项的方法用来回收感染性降低的生物活性物质的用途。

14. 权利要求 13 的用途，其中所述生物活性物质为血液凝固级联因子。

降低潜在感染材料的感染性的方法

本发明的目标是一种降低潜在感染材料的病毒感染性的方法，潜在感
5 染材料如人或动物体液或从中可分离出生物活性物质的体液部分，其中
感染性归因于非脂包被的病毒。

人或动物体液等潜在感染材料是生物活性、从而宝贵的物质的重要来源。然而，从这些来源分离生物活性物质并非毫无问题，这在过去已很明显，尤其是在来自血浆的制品传播 HIV 时。因而使用这些制品时一个
10 必须的要求是它们是无病毒的，即这些制品应当不能传播感染性颗粒。

脂包被的病毒可以非离子型生物相容的溶剂和去污剂处理有效地灭活。这些方法在 EP 0131740 中有介绍。非脂包被的病毒这样处理不能充分地灭活。WO 94/17834 报道了一种充分灭活甲肝病毒等非脂包被的病毒的方法。但该方法只有用非离子型去污剂和 60 到 65 °C 加热联合
15 处理才可灭活病毒。但加热处理时间长达 5 到 30 小时是一个缺点，因为宝贵的生物活性物质主要是蛋白质，其复杂的结构被这样的热处理改变甚至破坏。这包括降低相应部分的活性。因而，已知的方法引起这些物质的可能收率的降低。

DE 4021542A1 公开了一种处理无感染性血浆制品的联合方法。血浆
20 用非离子型表面活性剂处理，除去脂层之前加入生物相容性脂类。此后，在疏水性材料上进行固相抽提分出脂层并除去非离子型表面活性剂。

EP-A 0239859 涉及一种由含脂溶性加工化学制剂的生物材料中除去脂溶性加工化学制剂的方法。该方法包括使含脂溶性加工化学制剂的生物材料与有效量的天然存在的油或具有类似化学结构的合成物质作用，上述天然存在的油来自植物或动物。振荡所得混合物，沉淀分开上相和下相，移出上相。该方法在制备相对无病毒、生理可接受的血浆时特别有用。

欧洲专利申请 EP-A 0525502 公开了一种制备用于静脉使用、病毒已
30 灭活的免疫球蛋白溶液的方法。免疫球蛋白以非离子型表面活性剂处理，随后在疏水材料上进行固相抽提将其除去。

欧洲专利申请 EP-A0112563 公开了一种血浆蛋白制品的溶剂处理方法。血浆蛋白制品以干燥形式与一种有机溶剂混合以除去病毒感染性。

WO-A 83/04371 公开了一种灭活位于蛋白载体上的脂病毒的方法，所说的病毒选自乙肝病毒(HBV)和非甲非乙型肝炎(NANBH)病毒，该方法是使上述病毒与一种卤代烃处理剂在常温下长时间作用，卤代烃的用量为 5% (v/v) 到 50% (v/v)，优选卤代烃为氯仿。

本发明要解决的问题是提供一种方法，该方法可降低潜在感染材料或已知感染材料中所含非脂包被病毒的感染性。

奇怪的是，我们发现潜在感染材料中非脂包被病毒的感染性可用疏水相处理该材料得以降低，疏水相与该潜在感染材料可形成双相系统，随后分离形成的两相。

根据本发明降低潜在感染材料的病毒感染性的方法其特征在于以下措施，其中潜在感染材料如人或动物体液或从中可分离出生物活性物质的部分，其感染性可归因于非脂包被的病毒。欲从中分离生物活性物质的潜在感染材料以基本不溶于水的疏水相处理，它与该潜在感染材料将会形成两相系统。此后，将疏水相与这样处理的潜在感染材料分开。

以下，潜在感染材料也包括已知感染材料。尤其包括血或血浆等体液或冷沉淀物等处理过的或血浆。此外还包括这些潜在感染材料的任何部分以及细胞裂解物或类似的天然物。

可从潜在感染材料中分离的生物活性物质尤指蛋白质，如因子 VIII 或维生素 K 依赖因子等血液凝固级联因子，如 C 或 S 蛋白， γ -球蛋白，补体因子和丝氨酸蛋白酶抑制剂。

尤其，根据本发明可用来与潜在感染材料形成两相系统的疏水相为一种非极性有机液体，如植物油或低熔点脂肪等在室温下是油状的液体。

根据本发明的方法不但与利用非离子型去污剂和二烷基或三烷基磷酸酯灭活病毒的现有方法相容，而且还被证实有另一个优点，即将潜在感染材料的疏水相处理和非离子型去污剂和二烷基或三烷基磷酸酯，特别是三正丁基磷酸酯(TNBP)的处理联合使用。这种联合处理可同时或依次进行。

下列衍生物可作为非离子型去污剂，其含量应为以重量计至少 0.1%: 胆汁盐、脂肪酸的聚氧乙烯衍生物、部分酯化的山梨糖醇酐，如商品名

为 Tween 80、Tween 20 和 Polysorbat 80 的产品, 以及非离子型、溶于油的表面活性剂, 尤其是商品名为 Triton X-100(乙氧基化的烷基酚)的表面活性剂。两性离子试剂也可以使用, 如 N-十二烷基-N,N-二甲基-2-氨基-1-乙烷磺酸盐或其衍生物等磺基甜菜碱, 或辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷等 5 等非离子型去污剂。去污剂的用量优选为 0.01%到 10%。优选使用 TNBP、Tween 和 Triton 或胆酸钠/TNBP 联合处理。

以疏水相处理潜在感染材料基本可以代替 WO 94/17834 中必需的热处理, 该热处理与非离子型去污剂和烷基磷酸酯联合使用可灭活非脂包被病毒。

10 可能的非脂包被病毒尤指甲肝、柯萨奇、脊髓灰质炎和细小病毒。

根据本发明的方法在疏水相与潜在感染材料充分混合时特别有效。这可通过例如机械作用达到, 如超声处理、高效搅拌、强烈振荡等。

两相系统形成后, 尤可通过离心或过滤除去疏水相。疏水相尤可使用大豆油和/或蓖麻油等植物油。油相可通过疏水滤器过滤除去。疏水相需要 15 要分离的程度主要取决于后续处理过程。若非脂包被病毒的感染性已降低的材料还需用阴离子交换或亲和层析纯化, 则疏水相无需定量分离。因而必须确保可能抽提到疏水相的感染性颗粒被分开。然而, 若疏水相需要定量分离, 则其可用类似于 DE 4008852 所述的方法除去。该分离过程可使用常规生化分离过程, 包括电泳。

20 根据本发明的方法极适合分离生物活性物质, 如因子 VIII、维生素 K 依赖的凝血因子等凝血级联因子。

本发明用以下实施例进一步说明。

实施例

25 向潜在感染血浆部分加入非脂包被病毒。各病毒层可见附表。非包被病毒则使用柯萨奇 B6 和脊髓灰质炎 1。脂包被的 PRV 病毒用作对照。实验过程如下: 非脂包被病毒以非离子型去污剂和 TNBP(SD)处理, 或不用 TNBP 处理(表中 SD 栏为(-))。样品以油处理。

30 各种血浆部分(如含因子 VIII 的部分)大约 20 ml 均加入柯萨奇、脊髓灰质炎或假性狂犬病病毒至表中所列感染性病毒的水平。

随后强烈振荡。

1. 将 0.2 ml Tween 80 和 0.06 ml TNBP 加入 19.74 ml 的部分, 或

2. 将 0.2 ml TritonX-100 和 0.2 ml TNBP 加入 19.6 ml 的部分。

向制品 1 和 2 中各加入 1 ml 蓖麻油, 随后在室温下强烈抽提 1 小时。

5 3. 另一含病毒的 20 ml 部分同上以 1 ml 蓖麻油短暂处理, 但此前没有用去污剂处理(SD-)。

上述各例均以离心分相。处理前后由水相取出 1 ml 样品作为感染性对照。

病毒	SD	处理前水平*	处理后水平*	下降水平
PRV	-	6.84±0.32	6.18±0.30	0.66±0.62
柯萨奇 B6	+	6.96±0.32	2.79±0.17	4.17±0.49
	-	6.78±0.23	3.56±0.32	3.22±0.55
脊髓灰质炎 1	+	7.02±0.38	<2.73±0.12	>4.29±0.50
	-	6.90±0.32	4.16±0.28	2.74±0.60

10

*每毫升的 $\log_{10}\text{TCID}_{50}$