



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 90109030.1

[51] Int.Cl⁵

C07K 3/12

[43] 公开日 1991年5月29日

[22] 申请日 90.11.9

[30] 优先权

[32] 89.11.9 [33] DK [31] 5621/89

[71] 申请人 诺沃工业联合股票公司

地址 丹麦巴格斯瓦德

[72] 发明人 皮尔·凯恩加德

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
代理部

代理人 李英

A61K 35/14

说明书页数: 21

附图页数: 2

[54] 发明名称 分离生物活性化合物的方法

[57] 摘要

公开了一种将凝血因子Ⅷ与溶于血浆的其它蛋白质分离的方法,其中在组分离条件下对血浆进行凝胶过滤,得到含有凝血因子Ⅷ的级分,其产率非常高且几乎不含其它蛋白质。

^
<20

权 利 要 求 书

1.一种用凝胶过滤介质将凝血因子Ⅷ与血浆中的其它蛋白质分离的方法，其中在组分离条件下采用高负荷和高流速对血浆进行凝胶过滤，凝胶过滤介质由对凝血因子Ⅷ呈惰性且分级分离范围在 1×10^3 至 1×10^8 之间的颗粒所组成。

2.权利要求1所述的方法，其中凝胶过滤介质由分级分离范围在 1×10^4 至 8×10^7 之间的凝胶材料所组成。

3.权利要求2所述的方法，其中凝胶过滤介质由分级分离范围在 5×10^4 至 4×10^7 之间的凝胶材料所组成。

4.权利要求1—3任一项所述的方法，其中所加血浆的体积至少为柱床体积的5%。

5.权利要求4所述的方法，其中所加血浆的体积为柱床体积的15—40%。

6.权利要求1—5任一项的方法，其中流速至少为0.3柱床体积/小时。

7.权利要求6所述的方法，其中流速为0.5—2柱床体积/小时。

8.一种包含按权利要求1—7任一项的方法所分离的凝血因子Ⅷ的药物制剂。

分离生物活性化合物的方法

本发明涉及利用凝胶过滤作为第一分离步骤从体液如血浆中分离生物学化合物如蛋白质，特别是凝血因子Ⅷ的方法。

凝血因子Ⅷ又称为抗血友病因子A或A H F，是一种参与血凝的固有途径的血浆蛋白。

凝血因子Ⅷ以极低的浓度在血浆中循环，其存在形式为分别具有凝血因子Ⅷ凝血活性（凝血因子Ⅷ：C）和利托菌素辅因子活性（von Willebrand 因子（VWF））的两种蛋白质的非共价配合物，所述的配合物分子量为 $1 - 20 \times 10^6$ D。

凝血因子Ⅷ：C在患有出血性疾病—血友病A的个体中100,000人约有5人没有或缺乏。

von Willebrand 因子与活化血小板的结合方式可增强活化血小板的聚集。这一作用可在体外通过利托菌素诱导的血小板的聚集来检测。由于von Willebrand 因子生物学活性的缺乏或降低，可与von Willebrands病一道看到出血时间延长。

对于患有血友病A的血友病者和患有von Willebrands病严重病症的患者，现在采用含有凝血因子Ⅷ：C/VWF的浓缩物进行治疗，这种疗法大大改善了患者的生命力和经济上的接受力并有助于延长这些患者的寿命。

可由血液或血浆生产含有凝血因子Ⅷ（凝血因子Ⅷ：C和/或

VWF) 的药物组合物。可用各种不同的已知方法来生产这样的制剂, 所有已知方法的特征在于凝血因子Ⅷ: C的产率尤为低。几乎所有方法的共同之处是最初的纯化步骤包括低温沉淀。通过低温沉淀, 冷冻的血浆在0 - 4 °C下融化, 结果产生含有凝血因子Ⅷ的沉淀物, 可通过例如离心进行收集。尽管低温沉淀是相对简单的, 但它有一个主要的缺点, 即当大规模使用时, 如使用5kg 以上的血浆库, 凝血因子Ⅷ: C的产率低(30-45%的血浆含量), 这意味着不论在后面采用哪种纯化步骤, 最终产率都低。

此外, 一般说来在生产凝血因子Ⅷ制剂过程中包括病毒失活步骤。病毒失活步骤大大增加了抗制剂中病毒的安全性, 但在多数情况下会导致凝血因子Ⅷ: C产率的进一步降低。

凝血因子Ⅷ的总产率极低造成了这些制剂在某些地区短缺, 因此需要新的以高产率纯化凝血因子Ⅷ的方法以满足用凝血因子Ⅷ治疗血友病者的要求。

以高产率直接从血浆中分离凝血因子Ⅷ的新方法意义非常重要, 因为使用低温沉淀法或使用该法之前 血浆中凝血因子Ⅷ含量的损失高达70%。

最近尝试了用亲和色谱法直接从血浆中分离凝血因子Ⅷ (Thromb. Haemost., 61, (2), 234 - 237 (1989)), 但所分离出的含凝血因子Ⅷ的部分其产率仅为低于60%, 其比活性为1 IU 凝血因子Ⅷ/mg 蛋白。

凝胶过滤又称为凝胶渗透色谱或颗粒排阻色谱, 是一种扩散控制方法, 用于按大小分离溶质。使溶质通过一填充有惰性多孔凝胶

颗粒的柱，颗粒的孔径可排阻最大的分子，而较小的分子可扩散到凝胶颗粒内部的静止相中。因此，完全从凝胶颗粒中排除的最大的分子先随着“外水体积”洗脱出来，而较小的分子流经柱的时间较长，按渐减的大小随着渐增的“流出体积”洗脱出来。

凝胶过滤可以两种不同的方式进行：

1. 组分分离方式

在组分分离方式中，将溶质分成其分子大小不同的两组，一组随着外水体积洗脱出来，另一组随后洗脱出来，其流出体积要大得多，常常接近于总的“柱床体积”；这一方法主要用于从溶解的盐中分离蛋白质或用于交换缓冲液，被称为“脱盐”。对于“脱盐”，可使用小孔径的刚性凝胶并可使用大量物料（样品体积占20—30%的柱床体积）和采用高流速（每小时约1柱床体积的缓冲液）实现本方法；因此，柱容量大。

2. 分级分离方式

在分级分离方式中，分离分子量相似的溶质；这一方法常用于分离蛋白质。为此，应使用较大孔径的凝胶颗粒且选择的凝胶过滤介质应保证在相对于总柱床体积的外水体积和流出体积之间洗脱出蛋白质。与采用组分分离条件相比，洗脱出的物质更接近，并可重叠。此外，高流速是不适宜的，因为这样不能有效地分离蛋白质，并且必须保持低的柱负荷以获得各蛋白质的合理分离。因此，以分级分离方式进行的凝胶过滤只适于作为蛋白质分离的最后的精制步骤。其中待分级分离的体积较小（Jagschies, Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. B3 (10),

1988 and Bio/ Technol., 4, 954 - 58 (1986))。

已尝试了利用凝胶过滤从血浆中分离凝血因子Ⅷ (J. Lab. Clin. Med., 72, (6), 1968, 1007-1008和 J. Clin. Invest., 48, 1969, 957 - 962)。在实验过程中实现了高度纯化, 但产率仅为约40-50%。发现所得含凝血因子Ⅷ级分的纯度取决于起始血浆, 因为高含量的脂质和乳糜微粒可导致混浊的具有较低比活性的凝血因子Ⅷ部分。尽管初步实验表明浓度高得多的 Cohn 级分 I 的凝胶过滤似乎是可能的, 但所用的凝胶过滤技术不能处理大量的血浆。

此外, Paulssen 等人 (Thromb. Diathes. Haemorr., 22, 1969, 577 - 583)发现可用凝胶介质 Sepharose 6B 从其它血浆蛋白中分离凝血因子Ⅷ, 但采用凝胶过滤色谱法进行大规模分离只在将重新溶解的低温沉淀物用作原料时似乎才是可能的。

美国专利3, 637, 489 还公开了一种采用凝胶过滤并使用多孔玻璃珠分离血液成分的方法。该方法旨在从血清或血浆的其它成分中分离免疫活性物质。

自从那时起, 已进行了几种利用凝胶过滤纯化凝血因子Ⅷ的尝试, 但这些尝试集中于部分纯化的血浆组分 (重新溶解的低温沉淀物及其进一步纯化的组分) 的凝胶过滤。所有尝试都是用小负荷的柱和/ 或小流速或其相结合来进行的。

凝胶过滤作为一种蛋白质纯化方法自从1959年就已为人们所知并在生化研究实验室中广泛使用作为一种蛋白质定性和由小体积的样品 (例如小于1 升) 纯化蛋白质的方法。在本发明之前一直未将

凝胶过滤大规模应用于血浆的分级分离以分离蛋白质，唯一的应用是从白蛋白溶液中脱除乙醇和盐。因此，如参考书中所述：“凝胶过滤尚未成为血浆分级分离的主要技术的最重要的原因是每一柱体积的蛋白质通过量低”（J. H. Berglöf: “Fractionation by Gel Filtration”, p. 163-173 in J. M. Curling (Ed.): “Methods of Plasma Protein Fractionation”, Academic Press, London, 1980)和“遗憾的是，可用合理大小的分级柱处理的蛋白量小，并且样品的稀释不容忽视。因此这种方法不常用于血浆的分级分离”（J. J. Morgenthaler et al.: “Preservation of structure and function during isolation of human plasma proteins”, p. 127-138 in Smit Sibinga et al. (Eds.): “Plasma Fractionation and Blood Transfusion”, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 1985)。

美国专利4,675,385 公开了一种通过顺序高效颗粒排阻色谱法从包含凝血因子Ⅷ，高分子量成分和低分子量成分的血浆制剂分离凝血因子Ⅷ促凝剂蛋白的方法，第一步是制备血浆制剂的缓冲含水组合物，然后将该组合物引入到色谱柱上而分离出低分子量成分，色谱柱由粒度约为13-35微米的多孔高效液相色谱珠粒构成，最后用缓冲含水洗脱剂洗脱柱。为了取得良好的分离，每个专利4,675,385 提出了纵横比不小于10-40的柱的使用，这样减小了柱容量，但并不能确保凝血因子Ⅷ成分与低分子量血浆蛋白质的良好分离。然而，这种第一次分离不能保证显示凝血因子Ⅷ：C活性的蛋白质

与血浆制剂的其它蛋白成分的良好分离，只有进行第二次HPLC才能获得这种良好的分离。

因此，在本发明之前，以下事实就已为大家所公认，即在血浆的分级分离时，若需处理较大量的血浆，例如5升以上，凝胶过滤并不是一种蛋白质分离的适宜方法。

现已出人意外地发现当选择适用于高流速的凝胶过滤材料时，有可能通过非常温和的机械分离而不必依赖于标准的初始低温沉淀直接从血浆中以纯级分的形式和以极高的产率分离凝血因子Ⅷ。

本发明涉及一种利用凝胶过滤将以凝血因子Ⅷ：C和VWF配合物形式存在的凝血因子Ⅷ与血浆中的其它蛋白质分离的方法。

本发明方法的特征在于在组分离条件下采用高负荷和高流速对分离的血浆或新鲜融化的冷冻血浆进行凝胶过滤，凝胶过滤介质由对因子Ⅷ呈惰性且分级分离范围为 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^8$ ，较好为 $1 \times 10^4 - 8 \times 10^7$ 的颗粒组成。例如，分级分离范围可为 $5 \times 10^4 - 4 \times 10^7$ 。

在一个优选实施方案中，所加的血浆体积至少是柱床体积的5%。所加的血浆量宜为柱床体积的15—40%。

本发明的方法宜采用每小时至少0.3柱床体积的流速，最好是每小时0.5—2柱床体积的流速进行。

为达到本发明的目的，所用的凝胶过滤介质应具有适于快速洗脱的刚性。此外，在凝胶过滤过程中凝胶必须是在化学上和免疫学上对因子Ⅷ呈惰性的许多实验已表明本发明的方法可采用商品凝胶进行，例如Sepharose CL-4B，Sepharose CL-6B，

Sepharose 4FF, Sepharose 6FF, Sephacryl S-400, Sephacryl S-500, Fractogel TSK HW-65(F) 和 Matrex Cellufine CGL2000, 所有这些凝胶都适于本发明的目的。这类凝胶的粒度(湿)一般在大约 $32\mu\text{m}$ 至大约 $200\mu\text{m}$ 之间。

按照本发明方法的一个实施方案, 将冷冻的血浆融化并确保所有的凝血因子Ⅷ均已被溶解, 然后最好在所有凝血因子Ⅷ溶解后立刻将融化的血浆加到柱上。温度不宜升得太高以免凝血因子Ⅷ的广泛降解。血浆可通过加入例如肝素、柠檬酸盐、蔗糖、氨基酸、盐或其它稳定剂进行预处理, 并根据需要进行过滤、离心、超滤浓缩、用常用的沉淀剂预沉淀, 或以其它方式进行预处理, 然后上柱, 只要任何选用的预处理方法对血浆中凝血因子Ⅷ的含量没有任何显著的影响即可。

本发明的方法已出人意外地显示出可得到极高产率的凝血因子Ⅷ。典型的是, 血浆中凝血因子Ⅷ的含量可在产品中回收到70%以上, 该方法可得到极纯的产品, 其比活性为1—约4 IU凝血因子Ⅷ: C/mg 蛋白。这可部分地归因于以下事实, 即使用本发明的方法, 也可从蛋白水解酶中分离凝血因子Ⅷ, 蛋白水解酶一般早在分离过程中即可引起凝血因子Ⅷ: C的分解。

本发明的方法可在采用高负荷和高流速将血浆应用于凝胶过滤的条件下处理大量的血浆, 得到极高产率的高纯度凝血因子Ⅷ。因此提出了一种极其有效的具有工业实用性的方法。

然后可将得自凝胶过滤的含凝血因子Ⅷ的级分或得自多次凝胶

过滤的合并的级分浓缩并用已知的技术如超滤、沉淀、离子交换、亲和色谱等进一步纯化。

剩余的血浆蛋白如白蛋白、免疫球蛋白、凝血酶原复合物、抗凝血酶Ⅲ和其它蛋白也可用已知的技术，如用乙醇沉淀、PEG沉淀、色谱法等从凝胶过滤后的级分中分离出来。

凝血因子Ⅷ：C活性的测定可用两步测定法或一步测定法进行。一步和两步测定法可使样品中凝血因子Ⅷ：C活性出现不同的测定值，这是一个公认的事实。此外，已知用同样的测定法对同一样品进行重复测定也可导致凝血因子Ⅷ：C活性测定的变化。

本文所用的“血浆”一词是指所有血细胞和血小板都已例如通过离心而从中除去的血液。

“凝血因子Ⅷ：Ag”表示凝血因子Ⅷ相关抗原，“VWF-Ag”表示von Willebrand因子相关抗原。

“柱床体积”被定义为填装的凝胶介质和隙间液体的体积。“外水体积”被定义为凝胶颗粒间缓冲液的体积，“流出体积”是用于洗脱特定物质的缓冲液的体积。“柱负荷”用来表示加到柱床中物料的体积，以柱床体积百分比计算。“分级分离范围”表示推荐的凝胶材料所选择的（球状）蛋白质或较大分子的分子量范围。

本发明的方法可参照阐明本发明实施方案的附图和实例加以进一步阐述。这些实例只是说明性的，不对本发明范围构成限制，本发明范围由所附权利要求书限定。

参照附图进一步说明本发明，其中

图1示出用不同测定法测得的通过本发明所述的凝胶过滤洗脱

凝血因子Ⅷ的示意图。

图2示出通过本发明所述的凝胶过滤洗脱各种不同血浆蛋白的顺序。

实施例1

血浆的凝胶过滤以分离凝血因子Ⅷ。

用Sephrose, CL-4B填装直径2.6cm的柱至最终高度为60cm。

取丹麦血库的冷冻血浆,在25℃水浴上使之融化。加入1 IU肝素/ml后,将50ml(16%柱床体积)的血浆加到柱上,流量为100ml/小时,然后用缓冲液洗脱柱,强制流量为200ml/小时,相当于每小时0.63柱床体积。用pH为7.4的缓冲液(0.02M柠檬酸盐,0.15M NaCl)进行柱的平衡和洗脱。进而向每升缓冲液中加入2.55ml 1M CaCl₂,使游离钙离子(Ca²⁺)浓度达约 7×10^{-5} M。用得自Ingold GmbH的钙选择性电极(Frankfurt/Main, FRG)检查游离钙离子浓度。收集各级分,并测定每一级分的OD280,凝血因子Ⅷ:C(同时采用一步凝血测定法和两步显色测定法),因子Ⅷ:Ag,白蛋白, IgG,血纤维蛋白原, IgM, α-2-巨球蛋白,凝血因子Ⅸ,凝血因子X,蛋白C和抗凝血酶Ⅲ。由OD280测定的蛋白由外水体积洗脱下来,为一小峰(级分10-18),随后是一很大很宽的峰(级分19-50,参见图1)。由两步显色测定法测得凝血因子Ⅷ:C活性为82%,而由一步凝血测定法测得凝血因子Ⅷ:C活性为91%,它随外水体积与最早的小

蛋白峰一起以一个聚集峰洗脱下来（凝血因子Ⅷ主级分）。其余的凝血因子Ⅷ继凝血因子Ⅷ主级分之后立即以一较小后续峰尾洗脱下来（级分19—26）。凝血因子Ⅷ：Ag和VWF：Ag与凝血因子Ⅷ：C一起洗脱下来，但具有稍宽的后续峰尾。

所有其它待测的血浆蛋白在凝血因子Ⅷ主级分之后与大而宽的蛋白峰一起洗脱下来（参见图2）。与凝血因子Ⅷ：C分离的血浆蛋白具有下列分子量：

抗凝血酶Ⅲ：	65,000 D
蛋白C：	62,000 D
凝血因子X：	59,000 D
凝血因子Ⅸ：	57,000 D
α-2-巨球蛋白：	718,000 D
IgM：	900,000 D
血纤维蛋白原：	340,000 D
IgG：	150,000 D
白蛋白：	67,000 D

用两步显色测定法对凝血因子Ⅷ：C活性的测定是采用生色底物法进行的（KABI Coatest凝血因子Ⅷ），对原始的在37℃下使用试管的方法进行了改良，即使用微量滴定板，减少所用试剂。使用50μl样品或标准品，与75μl磷脂，凝血因子Ⅸa，凝血因子X和CaCl₂的溶液混合后，于37℃下保温15分钟，然后加入50

μl 底物。于 37°C 下进一步保温20分钟后，加入 $50\ \mu\text{l}$ 1M 柠檬酸停止反应。在 405nm 处比色，参比测定在 492nm 处进行。

用一步测定法对凝血因子 $\text{VIII}:\text{C}$ 活性的测定是采用APTT法进行的（活化部分组织促凝血酶原激酶时间）。吸量 $100\ \mu\text{l}$ 样品或标准品置于比色杯中，然后加入 $100\ \mu\text{l}$ 缺陷性血浆（凝血因子 VIII 缺陷性血浆，General Diagnostic），并将该溶液在 37°C 下恒温5分钟。加入 $100\ \mu\text{l}$ 0.03M CaCl_2 后，测定溶液凝固前的时间。

为了定量测定，制备基于内标物稀释系列的校准曲线，内标物以WHO标准品（F VIII 的第三内标物，人血浆， $3.9\ \text{IU/ml}$ ）进行标定。本文所述的两步测定法的检测限度比一步测定法低（大约10倍）。当加入肝素时，宜采用两步测定法，因为通过稀释更易于消除肝素对测定的任何可能的影响。

用得自凝血因子 VIII 抑制剂患者的抗体作为微量滴定板的涂层材料（Nunc, Kamstrup, 4000 Roskilde, Denmark）并用得自同一抑制剂患者的过氧化物酶标记的F（AB'） $_2$ 片段测定结合的凝血因子 VIII （Thromb. Haemost., 53(3), 1985, 346-350），采用ELISA测定凝血因子 $\text{VIII}:\text{Ag}$ 。

VWF： Ag 也是采用ELISA测定的，但用兔抗人VWF（DAKO, Denmark）作为涂层材料并用过氧化物酶标记的兔抗人VWF（DAKO, Denmark）测定结合的VWF。用与凝血因子 $\text{VIII}:\text{Ag}$ ELISA所用相同的正常血清制备标准曲线。

用一步凝血测定法测定凝血因子 IX ，该方法与测定凝血因子

Ⅷ：C的方法类似，只是使用凝血因子Ⅸ缺陷性血浆。用辐射状免疫扩散法（*Immunochemistry*, 2, 1965, 235—254）测定Ig G，用火箭免疫电泳法（*Anal. Biochem.*, 15, 1966, 45—52）测定白蛋白，血纤维蛋白原， α -2-巨球蛋白，凝血因子X，蛋白C和抗凝血酶Ⅲ。用分光光度计（Spectronic 601, Milton Roy公司产品）测定OD280,按照Ph. Eur. 2nd. Ed., I, V. 3.5.2,用凯氏法测定蛋白质，不用TCA沉淀。以凝血因子Ⅷ：C浓度与OD280 或与用凯氏法测得的蛋白质浓度之比计算纯化级分的比活性。当用OD280 计算比活性时，不同实验的结果不是直接可比的，除非使用相同的起始血浆，因为含有凝血因子Ⅷ的级分常常是混浊的，见Ratnoff等人的结果（*J. Clin. Invest.* 48, 1969, 957—962）。

在实验中所使用的各种凝胶过滤介质来源如下：

Sepharose CL-6B, Sepharose CL-4B, Sepharose CL-2B, Sepharose 6FF, Sepharose 4FF, Sephacryl S-400和Sephacryl S-500均得自Pharmacia (Hillerod, Denmark), Biogel A-5m, Fine 得自BioRad (Bie & Berntsen, Rodovre, Denmark), Fractogel TSK HW-65(F) 得自Merck (Struers, Rodovre, Denmark) 和 Matrex Cellufine GCL2000得自Amicon (Helsingborg, Sweden)。

实施例2

使用各种不同的凝胶过滤介质对血浆进行凝胶过滤以分离凝血因子Ⅷ。

用各种具有不同的分级分离范围和不同结构的凝胶过滤介质填充直径为2.6cm的柱。在所有情况下，所填充的柱床最终高度为60cm。将血浆按实施例1所述融化，每ml中加入1 IU肝素。对于每种凝胶过滤介质，将50ml血浆（16%柱床体积）载于各柱上。按实施例1所述装柱和用缓冲液洗脱。流速在所有情况下都与实施例1所述相同，不同的仅是用Biogel A-5M进行的实验，由于反压升高使流速降至50ml/小时。收集各级分，并用Coatest测定每一级分的OD₂₈₀和凝血因子Ⅷ：C。以凝血因子Ⅷ：C/ml与OD₂₈₀之比计算凝血因子Ⅷ主级分的比活性。用不同的血浆对每一载荷重复进行几次实验并计算产率和比活性的平均值。按实施例1所述的方法选择凝血因子Ⅷ主级分，产率为凝血因子Ⅷ：C在凝血因子Ⅷ主级分中的含量，以所加血浆中凝血因子Ⅷ：C的百分含量表示。

各种不同介质的分级分离范围和粒度以及所计算的平均值示于下表I中。

表 I

凝胶过 滤介质	分级分离范 围 (M W)	实验次 数(n)	产 率 (%)	比活性	颗粒直径 (湿) (μ m)
A	$1 \times 10^4 - 4 \times 10^6$	3	95	0.16	40-165
B	$6 \times 10^4 - 2 \times 10^7$	4	82	0.88	40-165
C	$7 \times 10^5 - 4 \times 10^7$	3	68	0.24	60-200
D	$1 \times 10^4 - 4 \times 10^6$	3	96	0.71	40-165
E	$6 \times 10^4 - 2 \times 10^7$	3	86	1.35	40-165
F	$6 \times 10^4 - 8 \times 10^7$	3	91	0.28	40-105
G	$1 \times 10^4 - 5 \times 10^6$	1	71	0.12	40- 80
H	$5 \times 10^4 - 5 \times 10^6$	2	84	0.18	32- 63
I	$1 \times 10^4 - 3 \times 10^6$	2	92	0.18	45-105
J	$1 \times 10^4 - 8 \times 10^6$	3	101	0.75	40-105

A: Sepharose CL-6B;

B: Sepharose CL-4B;

C: Sepharose CL-2B;

D: Sepharose 6FF;

E: Sepharose 4FF

F: Sephacryl S-500;

G: Biogel A-5m Fine;

H: Fractogel TSK HW-65(F):

I: Matrex Cellufine GCL 2000;

J: Sephacryl s-400

实施例3

利用各种不同的柱负荷对血浆进行凝胶过滤以分离凝血因子Ⅷ。

用 Sepharose 4F F 填装直径为2.6cm 的柱至最终高度为60 cm。按实施例1 所述使血浆融化。然后，用0.5 M HCl 将血浆的 pH调至7.0, 每ml中加入1 IU肝素，并通过一10 μ m 尼龙滤器过滤血浆。分别向柱中加入30ml, 40ml, 50ml, 60ml和70ml血浆。按实施例1 所述进行加样，流速，和用缓冲液洗脱，但将缓冲液调至 pH7.0 。收集各级分，并用Coatest测定每一级分的OD280 和凝血因子Ⅷ：C。以凝血因子Ⅷ：C/ml与OD280 之比计算凝血因子Ⅷ主级分的比活性。用三种不同的血浆对每一载荷重复进行3 次实验并计算平均值 (\bar{X})。凝血因子Ⅷ主级分的体积 (ml) 是含凝血因子Ⅷ的级分的体积，可在大而宽的蛋白峰 (OD280) 被洗脱出来之前进行收集并按实施例1 所述的方法进行选择。产率为凝血因子Ⅷ：C在凝血因子Ⅷ主级分中的含量，以所加血浆中凝血因子Ⅷ：C的百分含量表示。

计算值示于下表II中。

表 II

所加的血浆量 ml 柱床 体积 % 部分号	凝血因子 VIII 主级分(ml)	产 率 (%)	比活性
30 9.4	1	88	0.81
	2	95	0.18
	3	90	0.63
	X	91	0.54
40 12.6	1	76	0.68
	2	85	0.17
	3	93	0.61
	X	85	0.49
50 15.7	1	91	0.57
	2	90	0.20
	3	85	0.53
	X	89	0.43
60 18.8	1	79	0.81
	2	85	0.16
	3	95	0.61
	X	86	0.53
70 22.0	1	85	0.82
	2	100	0.21
	3	93	0.53
	X	93	0.52

实施例4

采用各种不同的洗脱速率对血浆进行凝胶过滤以分离凝血因子Ⅷ。

向与实施例3 所用相同的柱中加入50ml如上所述融化的血浆。融化后，用0.5 M HCl 将血浆的 pH调至7.0, 每ml中加入1 IU肝素，并通过一10 μ m 尼龙滤器过滤血浆。用三个不同部分的血浆分别检验100, 200和300 ml/ 小时的流速。在加血浆和随后的洗脱过程中采用同样的流速。使用与实施例3 所述相同的缓冲液进行洗脱。收集各级分，并用Coatest测定每一级分的OD280 和凝血因子Ⅷ：C。按实施例3 所述计算凝血因子Ⅷ主级分的比活性和产率。计算凝血因子Ⅷ主级分的体积，产率和比活性的平均值（X）。结果示于下表Ⅲ中。

表 III

流速 ml / 小时	柱床体积 / 小时	血浆部分号	凝血因子 V _{III} 主级分 (ml)	产率 (%)	比活性
100	0.31	1	80	89	0.75
		2	80	88	0.17
		3	80	80	0.65
		x	80	86	0.52
200	0.63	1	80	84	0.99
		2	80	88	0.18
		3	80	89	0.79
		x	80	87	0.65
300	0.94	1	70	85	0.72
		2	80	96	0.18
		3	80	83	0.44
		x	77	88	0.45

实施例5

使用不同的柱负荷对血浆进行凝胶过滤以分离凝血因子Ⅷ。

用 Sepharose 4F F 填装直径为10cm的柱至最终高度为60cm。在30℃的水浴中融化得自丹麦血库的冷冻血浆。分别将925g, 1497g 和2000g 血浆加到柱中。用一台Masterflex 软管泵 (Buch & Holm, Herlev, Denmark) 在血浆的加入和洗脱过程中将流速维持在4200ml/小时, 相当于大约0.89柱床体积/小时。用与实施例1 所述相同的缓冲液进行洗脱。用 Pharmacia UV-1 监测器不断监测OD280。当外水体积的OD280 开始升高时, 开始收集凝血因子Ⅷ主级分, 当OD280 显示出大的蛋白峰开始被洗脱时, 停止收集。用一步凝血测定法测定凝血因子Ⅷ: C在凝血因子Ⅷ主级分中的含量, 用凯氏法测定蛋白质。以凝血因子Ⅷ主级分中凝血因子Ⅷ: C的总数与凝血因子Ⅷ主级分中蛋白质总mg数之比计算比活性。以凝血因子Ⅷ: C在凝血因子Ⅷ主级分中的含量计算凝血因子Ⅷ: C的产率, 以凝血因子Ⅷ: C在所加血浆中的百分含量表示。

结果示于下表Ⅳ中。

表 N

所加的血浆量 ----- g	凝血因子Ⅳ 主级分 (g)	产率 (%)	比活性 (IU / mg)
925	1192	74	2.50
1497	1860	73	2.24
2000	2200	81	1.08

实施例6

使用工业规模的柱对血浆进行凝胶过滤以分离凝血因子Ⅷ。

用Sephacrose 4FF填装直径为29cm的柱。用与实施例1所述相同的缓冲液平衡后，凝胶高度为53cm。将10kg得自丹麦血库的冷冻血浆融化并加热至30℃，然后将其加到柱中。所加量占柱床体积的28.8%。用一台Masterflex软管泵维持加样和用平衡缓冲液洗脱过程中流速为30升/小时，相当于0.86柱床体积/小时。用Pharmacia UV-1监测器不断监测OD280，在第一次指示外水体积OD280上升时，收集凝血因子Ⅷ主级分。总共收集11.73kg凝血因子Ⅷ主级分。然后用一步凝血测定法测定凝血因子Ⅷ：C的含量并用凯氏法测定蛋白质。共有8798IU凝血因子Ⅷ：C和低于2346mg蛋白质存在于凝血因子Ⅷ主级分中，凝血因子Ⅷ：C的产率为880IU/kg血浆，相当于88%以比活性高于3.75IU/mg蛋白的产品形式存在的产率。

按照本发明的方法得到的凝血因子Ⅷ主级分可用与常规纯化类似的方法进一步纯化，即重新溶解后低温沉淀，例如包括色谱纯化和使用常用的赋形剂冻干以形成稳定的制剂。使用之前用适宜的常规载体重新制成制剂。

说明书附图

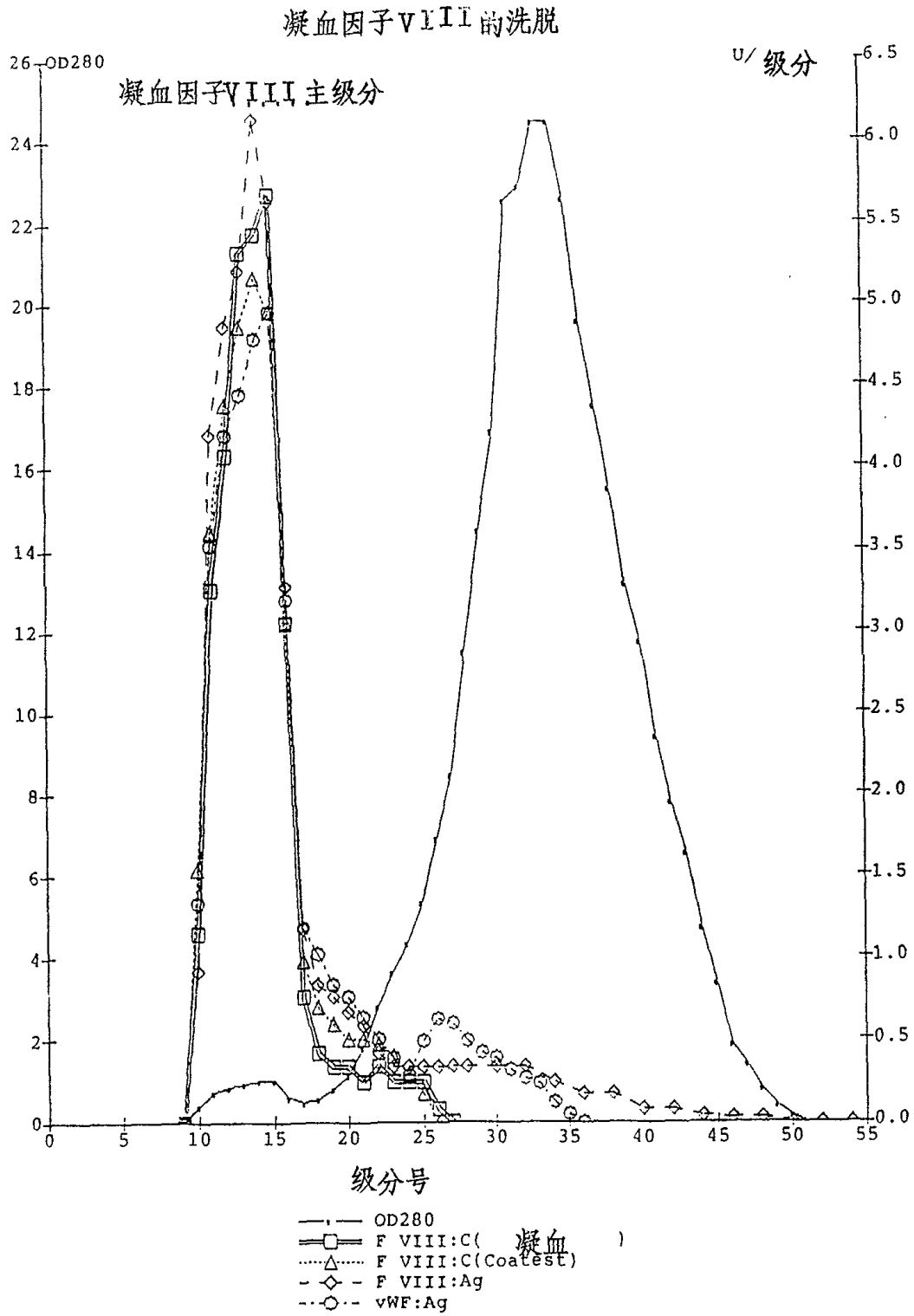


图. 1

各种不同蛋白质的洗脱

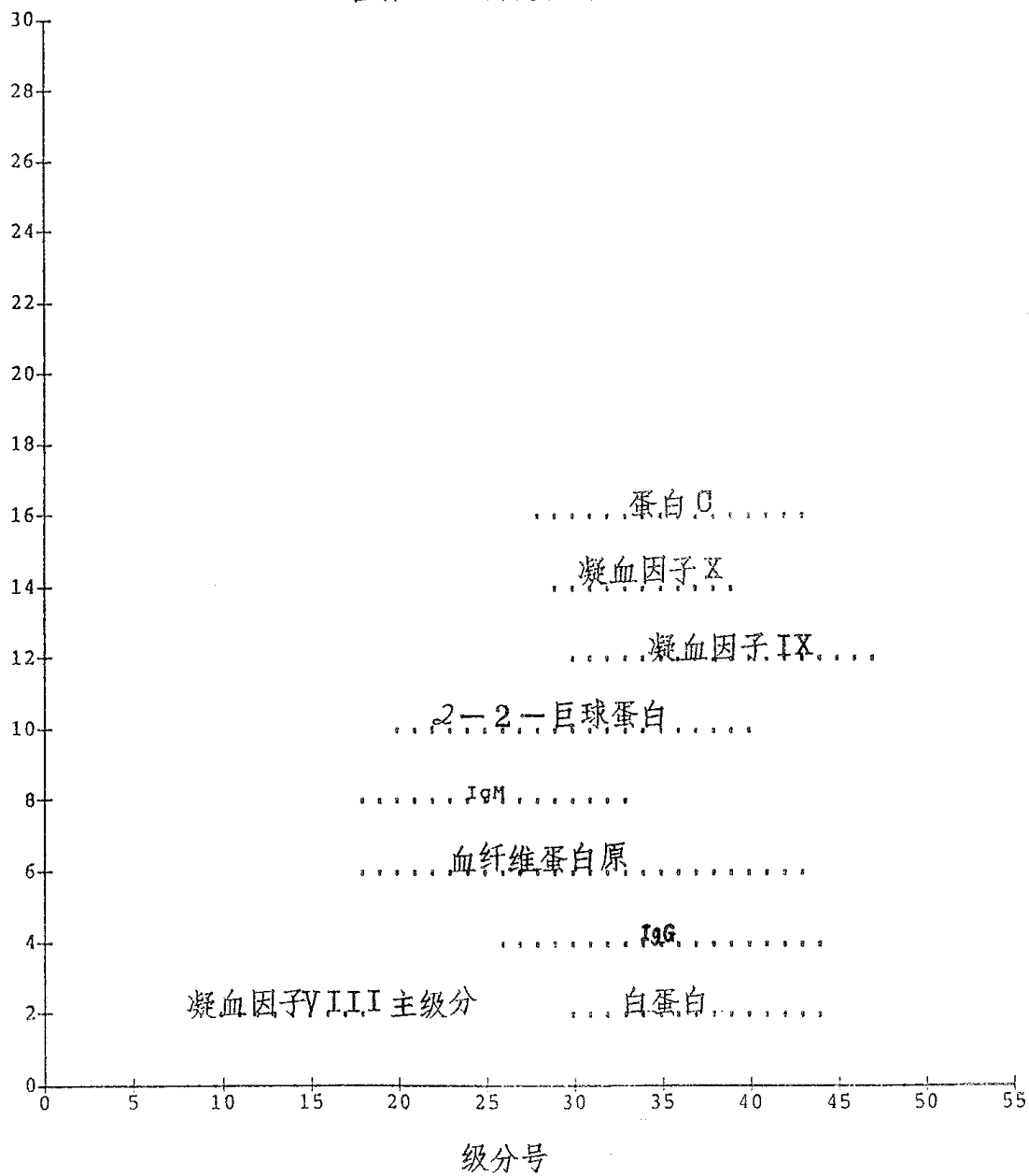


图. 2