



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101528776 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 08

(21) 申请号 200680032267. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2006. 08. 04

C07K 16/18 (2006. 01)

C07K 14/765 (2006. 01)

(30) 优先权数据

11/217, 956 2005. 09. 01 US

11/232, 527 2005. 09. 22 US

(56) 对比文件

WO 02087560 A1, 2002. 11. 07,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

审查员 周霞

2008. 03. 03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2006/030465 2006. 08. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/030244 EN 2007. 03. 15

(73) 专利权人 等离子科技有限责任公司

地址 美国南卡罗来那州

(72) 发明人 G·祖尔洛 D·卡丁 A·洛德巴克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 邹雪梅 黄可峻

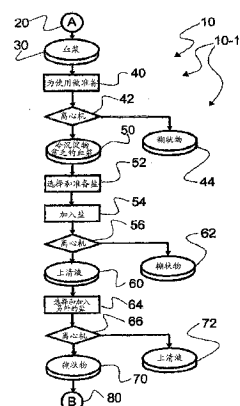
权利要求书6页 说明书15页 附图4页

(54) 发明名称

静脉注射免疫球蛋白制剂的生产方法

(57) 摘要

一种高效的大规模的血浆无醇分级分离生产方法,可生产出高产率、无变性、双重病毒灭活的静脉注射人免疫 γ 球蛋白(IgG)产物。该方法在最初的两步分级分离步骤中应用了一种或多种选自包括柠檬酸钠、醋酸钠、葡萄糖酸钠、硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵组中的盐,然后通过渗滤除去这些盐。还公开了用本发明的方法使用醇的方法。



1. 一种用于生产有用的、无变性的静脉注射免疫球蛋白 IgG 制品的血基材料的分级分离方法,包括以下步骤:

(a) 获取预定量的血基材料用于处理;

(b) 准备所述预定量的血基材料用于处理;其特征在于以下步骤(c)-(j)

(c) 选择至少一种第一化合物,其选自由柠檬酸钠、醋酸钠、葡萄糖酸钠、硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵的盐,以及乙醇组成的组;

(d) 其特征还在于,通过加入第一预定量的所述选择的至少一种第一化合物,在含有所述预定量的血基材料的溶液中产生第一预定重量浓度,进行第一分级分离步骤,形成第一可分离产物和第一残余产物,所述第一可分离产物的特征是几乎不含优球蛋白,其中所述步骤(d)的特征是所述第一预定重量浓度为11-13%;

(e) 将所述第一可分离产物与所述第一残余产物分离,完成第一分级分离步骤;

(f) 选择至少一种第二化合物,其选自由柠檬酸钠、醋酸钠、葡萄糖酸钠、硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵的盐,以及乙醇组成的组;

(g) 通过在第二可分离产物中加入第二预定量的所述选择的至少一种第二化合物,在含有所述第二可分离产物的溶液中产生第二预定重量浓度,进行第二分级分离步骤,形成第二可分离产物和第二残余产物,其中所述步骤(g)的特征是所述第二预定重量浓度为21-23%;

(h) 将所述第二可分离产物与所述第二残余产物分离,完成第二分级分离步骤;

(i) 准备所述第二可分离产物用于渗滤;以及

(j) 对所述第二可分离产物进行渗滤,形成较小体积的第三产物,其基本不含至少一种第一选择的化合物和至少一种第二选择的化合物。

2. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(a)中所述的血基材料是血浆。

3. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(a)中所述的血基材料是血液分级分离产物。

4. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(b)包括融化所述量的血基材料。

5. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(c)的特征是从由柠檬酸钠、醋酸钠和葡萄糖酸钠组成的有机盐组中选择至少一种化合物。

6. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(c)的特征是从由硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵组成的无机盐组中选择至少一种化合物。

7. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(c)的特征是从由柠檬酸钠、醋酸钠、葡萄糖酸钠、硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵组成的盐的组中选择至少一种化合物。

8. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(d)的特征是加入一定量的所选择的至少一种化合物,以使该至少一种化合物的重量浓度为12%。

9. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(c)的特征是从由柠檬酸钠、醋酸钠、葡萄糖酸钠、硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵组成的盐的组中选择几种化合物。

10. 权利要求9的血基材料分级分离的方法,其中步骤(d)的特征是加入一定量的所选择的几种化合物中的每一种,以使该几种化合物的总重量浓度为12%。

11. 权利要求7的血基材料分级分离的方法,其中步骤(d)的特征是加入一定量的所选择的几种化合物中的每一种,以使该几种化合物的总重量浓度为11-13%。

12. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(d)包括以第一上清溶液形成所述第一可分离产物,并且以第一糊状残余产物形成所述第一残余产物。

13. 权利要求12的血基材料分级分离的方法,其中所述第一预定重量浓度为12%。

14. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其特征在于包括附加的步骤:将所述第一残余产物分级分离为一组包含血液因子的产物,所述血液因子包含因子VIII、IX和 von Willebrand 以及纤维蛋白原。

15. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(e)包括通过离心将所述第一可分离产物与所述第一残余产物分离。

16. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(e)的特征是除去第一上清液形式的所述第一可分离产物。

17. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(f)的特征是从由柠檬酸钠、醋酸钠和葡萄糖酸钠组成的有机盐组中选择至少一种化合物。

18. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(f)的特征是从由硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵组成的无机盐组中选择至少一种化合物。

19. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(f)的特征是从由柠檬酸钠、醋酸钠、葡萄糖酸钠、硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵组成的盐的组中选择至少一种化合物。

20. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(g)的特征是加入一定量的所选择的至少一种化合物,以使该至少一种化合物的总重量浓度为22%。

21. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(f)的特征是从由柠檬酸钠、醋酸钠、葡萄糖酸钠、硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵组成的盐的组中选择几种化合物。

22. 权利要求21的血基材料分级分离的方法,其中步骤(g)的特征是加入一定量的每一种所选择的几种化合物,以使该几种化合物的总重量浓度为22%。

23. 权利要求21的血基材料分级分离的方法,其中步骤(g)的特征是加入一定量的每一种所选择的几种化合物,以使该几种化合物的总重量浓度为21-23%。

24. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(g)的特征是形成所述第二可分离产物,为第二沉淀物,并且使所述第二残余上清液产物具有第二预定的至少一种化合物的重量浓度。

25. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其特征在于在步骤(g)后的附加步骤:将所述第二残余产物分级分离为包含清蛋白和 α -1-抗胰蛋白酶的一组产物。

26. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(h)包括通过离心将所述第二可分离产物与所述第二残余产物分离。

27. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(h)包括通过过滤将所述第二可分离产物与所述第二残余产物分离。

28. 权利要求1的血基材料分级分离的方法,其中步骤(h)包括分离糊状物形式的所述第二可分离产物,该糊状物具有可测定的所得重量。

29. 权利要求28的血基材料分级分离的方法,其中步骤(i)包括合并所述获得体积的所述可分离糊状产物和具有所述可分离糊状产物的4倍重量的水而形成可分离糊状物的稀释液。

30. 权利要求29的血基材料分级分离的方法,其中步骤(h)的特征是,将稀释液通过过

滤膜,将第三产物的一部分与加入的至少一种化合物分离,从而提供基本不含所述至少一种化合物的第三产物。

31. 权利要求 30 的血基材料分级分离的方法,其中步骤(j)的特征是,将稀释液通过 30KD 的渗滤膜,将第三产物的一部分与加入的至少一种化合物分离,从而提供基本不含所述至少一种化合物的第三产物。

32. 权利要求 30 的血基材料分级分离的方法,其中步骤(j)包括在渗滤前测定第三产物的电导度作为第一预定的电导度,并测定基本不含至少一种化合物的第三产物的电导度作为第二预定的电导度。

33. 权利要求 32 的血基材料分级分离的方法,其中步骤(j)包括测定电导度,以保证基本不含至少一种化合物的第三产物的电导度在 500 微西门子 / 厘米 ($\mu\text{S/cm}$) $\pm$ 400 微西门子 / 厘米 ($\mu\text{S/cm}$) 的范围。

34. 权利要求 33 的血基材料分级分离的方法,其特征在于以下附加步骤:

(k) 加入预定体积的预定浓度的清洁剂,其选自包含溶剂清洁剂和增强的溶剂清洁剂的一组清洁剂,用于灭活基本不含至少一种化合物的第三产物中的病毒,以生产病毒灭活的 IgG 溶液。

35. 权利要求 34 的血基材料分级分离的方法,包括将灭活的 IgG 溶液冷却到 2-8°C 的附加步骤。

36. 权利要求 35 的血基材料分级分离的方法,包括以下附加步骤:

(l) 对病毒灭活的 IgG 溶液进行柱色谱分离,产生结合于树脂的 IgG 和流出物;

(m) 从流出物中分离结合于树脂的 IgG;以及

(n) 用预定浓度的氯化钠清洗结合于柱树脂的 IgG,以生产不含病毒灭活化学物质的富含 IgG 的溶液。

37. 权利要求 36 的血基材料分级分离的方法,其中步骤(l)包括用弱阳离子交换树脂进行不含病毒灭活化学物质的富含 IgG 的溶液的纯化,以生产纯化的 IgG 溶液。

38. 权利要求 36 的血基材料分级分离的方法,其中步骤(l)包括使用 Toyopearl CM-650C 树脂。

39. 权利要求 36 的血基材料分级分离的方法,其中步骤(l)包括测定不含病毒灭活化学物质的富含 IgG 的溶液的电导度,以确保所述溶液的电导度在 100-900 微西门子 / 厘米 ($\mu\text{S/cm}$) 的范围。

40. 权利要求 36 的血基材料分级分离的方法,包括以下附加步骤:

(o) 通过对所述溶液进行超滤,浓缩纯化的 IgG 溶液至预定的 IgG 溶液浓度。

41. 权利要求 39 的血基材料分级分离的方法,其中步骤(o)包括对所述溶液进行超滤,浓缩纯化的 IgG 溶液至 12% 的 IgG 溶液浓度。

42. 权利要求 36 的血基材料分级分离的方法,其特征在于以下附加步骤:

(p) 加入选自包括麦芽糖和山梨糖醇的一组化学物质的稳定化化学物质,稳定预定浓度的 IgG 溶液,生成稳定的 IgG 浓缩溶液。

43. 权利要求 34 的血基材料分级分离的方法,包括以下附加步骤:

(q) 纳米过滤稳定的 IgG 浓缩溶液,生成纳米过滤的稳定的 IgG 浓缩溶液。

44. 权利要求 34 的血基材料分级分离的方法,包括以下附加步骤:

(r) 使用用于注射的灭菌水,将稳定的 IgG 浓缩溶液稀释成预定浓度的散装的纯化 IgG。

45. 权利要求 42 的血基材料分级分离的方法,包括以下附加步骤:

(s) 使用用于注射的灭菌水,将稳定的 IgG 浓缩溶液稀释成 10%浓度的散装的纯化 IgG。

46. 权利要求 45 的血基材料分级分离的方法,包括以下附加步骤:

(t) 为对散装纯化的 IgG 浓缩溶液灭菌而进行过滤。

47. 权利要求 46 的血基材料分级分离的方法,包括以下附加步骤:

(u) 将散装纯化的灭菌 IgG 浓缩溶液分装到灭菌小瓶中用于分配。

48. 权利要求 47 的血基材料分级分离的方法,包括以下附加步骤:

(v) 对灭菌小瓶中内容物样品的安全性和有效性进行测试,当小瓶通过预定的测试标准后方进入分配渠道。

49. 权利要求 1 的血基材料分级分离的方法,其中在步骤 (i) 后有进一步的步骤:对所述第二残余产物进行处理,分离出清蛋白和 α -1-抗胰蛋白酶。

50. 权利要求 1 的血基材料分级分离的方法,其中所述准备所述一定量的血基材料包括进一步的步骤:通过冷冻血浆获得冷沉淀物,然后在 0-4°C 控制融化,在悬浮液中形成沉淀,并分离出沉淀,得到产生量的血基材料。

51. 权利要求 1 的血基材料分级分离的方法,其中步骤 (c) 的特征是所述第一化合物为乙醇。

52. 权利要求 1 的血基材料分级分离的方法,其中步骤 (c) 的特征是从由 (i) 柠檬酸钠、醋酸钠、葡萄糖酸钠、硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵的盐以及 (ii) 乙醇组成的组中选择至少一种化合物。

53. 权利要求 1 的血基材料分级分离的方法,其中步骤 (c) 的特征是从由柠檬酸钠、醋酸钠、葡萄糖酸钠、硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵的盐和乙醇组成的组中选择几种化合物。

54. 权利要求 1 的血基材料分级分离的方法,其中步骤 (f) 的特征是从由柠檬酸钠、醋酸钠、葡萄糖酸钠、硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵的盐和乙醇组成的化合物组中选择至少一种化合物。

55. 权利要求 1 的血基材料分级分离的方法,其中步骤 (f) 的特征是从由柠檬酸钠、醋酸钠、葡萄糖酸钠、硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵的盐和乙醇组成的化合物组中选择几种化合物。

56. 由冷沉淀物贫乏的血浆提取 IgG 的方法,包括:

(a) 提供从冷沉淀物物理分离的冷沉淀物贫乏的血浆;

(b) 通过加入按重量计为 11-13%的总盐含量将该冷沉淀物贫乏的血浆盐化以形成盐化的冷沉淀物贫乏的血浆,其中所述盐选自柠檬酸钠、醋酸钠、葡萄糖酸钠、硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵的盐组成的组;

(c) 将所述盐化的冷沉淀物贫乏的血浆离心以形成第一上清液和第一糊状物;

(d) 通过加入按重量计为 21-23%的总盐含量将第一上清液盐化以形成盐化的第一上清液,其中所述盐化的第一上清液的盐浓度大于所述盐化的冷沉淀物贫乏的血浆的盐浓

度,其中所述盐选自柠檬酸钠、醋酸钠、葡萄糖酸钠、硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵的盐组成的组;

(e) 将所述盐化的第一上清液离心以形成第二上清液和第二糊状物;以及

(f) 将第二糊状物脱盐以形成含 IgG 的产物。

57. 权利要求 56 的方法,其中步骤 (b) 包括向该血浆中加入一定量的柠檬酸盐。

58. 权利要求 57 的方法,其中所述柠檬酸盐包含柠檬酸钠溶液。

59. 权利要求 56 的方法,还包括处理第二上清液以回收清蛋白和 α -1-抗胰蛋白酶中的至少一种。

60. 权利要求 56 的方法,其中将第二糊状物脱盐的步骤包括将该第二糊状物稀释和过滤。

61. 权利要求 56 的方法,其中将第二糊状物脱盐的步骤包括将该第二糊状物稀释至少四倍,按重量计。

62. 权利要求 56 的方法,其中所述含 IgG 组分的产物基本上不含柠檬酸钠。

63. 权利要求 56 的方法,其中步骤 (d) 包括向第一上清液中加入额外量的柠檬酸盐。

64. 权利要求 56 的方法,其中所述产物是含 IgG 的溶液,还包括冷却该 IgG 溶液至 2-8°C。

65. 权利要求 56 的方法,其中所述产物是含 IgG 的溶液,还包括使用柱色谱提取 IgG。

66. 权利要求 65 的方法,其中所述柱色谱步骤使用弱的阳离子交换树脂。

67. 权利要求 56 的方法,其中所述产物是含 IgG 的溶液,还包括测试该含 IgG 的溶液的电导率以保证所述溶液的电导率范围在 100-900 微西门子/厘米 (μ S/cm)。

68. 权利要求 56 的方法,其中所述产物是含 IgG 的溶液,还包括将 IgG 稳定在该含 IgG 的溶液中。

69. 权利要求 68 的方法,还包括将该稳定的含 IgG 的溶液进行纳米过滤。

70. 权利要求 69 的方法,还包括将该稳定的含 IgG 的溶液稀释成预定浓度的散装纯化的 IgG。

71. 权利要求 70 的方法,还包括将该散装纯化的 IgG 灭菌。

72. 权利要求 71 的方法,还包括将该散装纯化的 IgG 分装至灭菌的分配用小瓶中。

73. 权利要求 56 的方法,其中步骤 (b) 的特征在于从包括柠檬酸钠、醋酸钠、葡萄糖酸钠、硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵的盐的组中选择至少一种化合物。

74. 权利要求 56 的方法,其中步骤 (d) 的特征在于从包括柠檬酸钠、醋酸钠、葡萄糖酸钠、硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵的盐的组中选择至少一种化合物。

75. 权利要求 56 的方法,还包括将第一糊状物分级分离成含有包含因子 VIII、IX、von Willebrand 和纤维蛋白原的血液因子的产物组。

76. 一种用于分级分离血基材料的方法,所述方法包括:

进行第一分级分离步骤,其通过向预先冷冻加工的一定量的血基材料中加入第一柠檬酸盐使得所述第一柠檬酸盐的重量浓度为 11-13%,以形成第一上清液和第一糊状物来进行;

进行第二分级分离步骤,其通过向第一上清液中加入第二柠檬酸盐使得所述第二柠檬

酸盐的重量浓度为 21-23%，以形成第二上清液和第二糊状物；和

过滤所述第二糊状物。

77. 权利要求 76 的方法，其中所述第一和第二柠檬酸盐中的至少一种包括柠檬酸钠。

78. 权利要求 76 的方法，其中所述第一和第二柠檬酸盐中的至少一种包括柠檬酸钠的 50% 重量 / 重量的溶液。

79. 权利要求 76 的方法，进一步包括融化冷冻加工的一定量的血基材料。

80. 权利要求 76 的方法，其中所述第一上清液具有至少 12% 重量 / 重量的柠檬酸盐浓度。

81. 权利要求 76 的方法，其中进一步包括处理所述第一糊状物以回收选自因子 VIII、IX、von Willebrand 以及纤维蛋白原的血液产物。

82. 权利要求 76 的方法，其中进一步包括通过离心将第一上清液与第一糊状物分离。

83. 权利要求 76 的方法，其中所述第二上清液具有至少 22% 重量 / 重量的柠檬酸盐浓度。

84. 权利要求 76 的方法，其中进一步包括处理所述第二上清液以回收选自清蛋白和 α -1-抗胰蛋白酶的血液产物。

85. 权利要求 84 的方法，其中进一步包括通过离心回收血液产物。

86. 权利要求 84 的方法，其中进一步包括通过过滤回收血液产物。

87. 权利要求 76 的方法，其中所述过滤步骤包括渗滤第二糊状物。

88. 权利要求 76 的方法，其中进一步包括制备第二糊状物的稀释液。

89. 权利要求 88 的方法，其中所述过滤步骤由稀释液中除去了基本上所有的第一和第二柠檬酸盐。

90. 权利要求 76 的方法，其中所述过滤步骤包括使稀释液通过 30KD 渗滤膜。

91. 权利要求 76 的方法，其中进一步包括测定来自过滤步骤的产物以保证该产物具有 500 微西门子 / 厘米 (μ S/cm) $\pm$ 400 微西门子 / 厘米 (μ S/cm) 的电导度。

92. 权利要求 76 的方法，其中进一步包括向来自过滤步骤的产物中加入清洁剂，以产生病毒灭活的溶液。

93. 权利要求 92 的方法，其中进一步包括对该病毒灭活的溶液进行柱色谱分离。

94. 权利要求 93 的方法，其中进一步包括在进行柱色谱分离的步骤中使用弱阳离子交换树脂，所述弱阳离子交换树脂具有 50-150 μ m 的粒度、0.05-0.11 meq/ml 的离子交换容量和 25-45 mg/ml 的吸附容量中的至少一种。

95. 一种由从血基材料分级分离的血液成分分离优球蛋白的方法，其目的在于对分离的血液成分进行下一步的渗滤过程，所述方法包括以下步骤：

(a) 获取预定体积的血基材料用于处理；

(b) 准备所述体积的血基材料用于处理；

(c) 准备第一分级分离步骤，其通过向准备的所述体积的血基材料中加入第一预定体积的第一预定浓度的柠檬酸钠使得柠檬酸钠的重量浓度为 11-13%，以形成第一可分离的上清液产物和第一残余产物，所述第一可分离的上清液产物基本上不含有优球蛋白来进行。

静脉注射免疫球蛋白制剂的生产方法

[0001] 部分接续专利申请

[0002] 本专利申请是申请号为 11/232527、名称为“AN ULTRA-HIGHYIELD INTRAVENOUS IMMUNE GLOBULIN PREPARATION”，并于 2005 年 9 月 22 日提交的美国专利申请的部分接续申请，而该专利申请又为申请号为 11/217956、名称为“AN ULTRA-HIGH YBELDINTRAVENOUS IMMUNE GLOBULIN PREPARATION”，并于 2005 年 9 月 1 日提交的美国专利申请的部分接续申请。

技术领域

[0003] 本发明总的涉及免疫血清球蛋白纯化的方法，更具体地涉及从血浆或其他血基材料中无醇分离免疫球蛋白的方法。令人感兴趣的是，本发明的方法也可采用醇。

背景技术

[0004] 一般地，从血浆或其他血基材料中分离出免疫球蛋白 (IgG) 的现有方法是基于 Edwin J. Cohn 的早期工作。正如 1993 年 1 月 5 日授予 Maria E. Sarno 等 (SARNO) 的美国专利 5,177,194 中所描述的，“一种广泛采用的方案是著名的科恩分级分离法，该法的基础是使用冷乙醇进行分级沉淀。”Cohn et al. J. Am. Chem. Soc. 68,459(1946)。

[0005] 1945 年 12 月 4 日授予 Edwin J. Cohn (Cohn) 的美国专利 2,390,074 中公开了使用醇、丙酮和二氧杂环己烷在该分级分离法中作为沉淀剂。继续以醇作为沉淀剂在 2005 年 5 月 17 日授予 Joshua Levy 等 (Levy) 的美国专利 6,893,639B2 中进一步体现，该专利中提到“从血浆中纯化免疫球蛋白的传统工业方法是基于冷乙醇的分级分离法，基于其在给定的醇浓度在零度以下的等电点，使蛋白质组发生共沉淀。”

[0006] 科恩的工作是因第二次世界大战中军队对用作代替冻干血浆的血容量扩充剂需要稳定溶液而发明的。因此，科恩法主要体现在对为血容量扩充提供所需渗透度的清蛋白级分的分离方法的优化上。

[0007] 即使是这样，醇沉淀剂的使用也不是没有困难，科恩曾说过，“一些蛋白质沉淀剂，例如醇容易使许多与它们接触的蛋白质发生变性，随着醇浓度和温度的增加，变性的危险性也在增加。已发现对许多蛋白质而言，在将沉淀剂与血浆或其他蛋白质溶液混合时，为防止蛋白质的变性，最好非常小心地操作。出于这个原因，提供无醇的方法进行血浆和其他血基材料的分级分离，包括 IgG 的纯化被认为是明智的。

[0008] 进一步的考虑，将乙醇和水组合，可能也无法避免蛋白质的变性。例如，如果向 500ml 水中加入 500ml 乙醇 (100%)，将不会获得 1000ml 50% 的乙醇。而最终的体积约为 956ml。据猜测，体积的减少是由于乙醇和水分子之间的紧密结合造成的。这种结合可导致蛋白质构型的改变，从而在除去乙醇并以水取代之后在蛋白质分子中产生一些永久的变性。

[0009] 在 20 世纪 70 年代，发现色谱在分离和纯化血浆蛋白中的用途。色谱分离血浆蛋白是针对蛋白质的各种特性，包括分子大小（凝胶过滤），电荷（离子交换色谱），以及它们

与特定分子（亲和色谱）之间的已知相互作用进行的。

[0010] 在工业规模上使用各种色谱方法已被用于从血浆中分离小分子量的高价值蛋白质，例如第 VIII 因子，以及在使用科恩法或改进的科恩法从血浆中分离后对 γ 球蛋白的最终纯化。然而，在工业规模上色谱分离分子量大的较低价值的级分例如清蛋白和 γ 球蛋白却被发现是不现实的。

[0011] 在两篇美国专利申请中教导了使用羧酸盐（例如柠檬酸三钠）作为从血浆中形成冷沉淀物的增强剂，这两篇专利申请分别是由 Edward Shanbrom 于 2003 年 1 月 30 日提交的 20030022149 号申请（Shanbrom' 149），以及于 2003 年 7 月 10 日提交的 20030129167 号申请（Shanbrom' 167）。Shanbrom 的方法总的说来用柠檬酸三钠和其他柠檬酸盐作为从冷沉淀物中产出血液凝固因子的增强剂。

[0012] Shanbrom' 149 在第 0009 段中提到，“本发明的目的是提供产率提高的冷沉淀物。”Shanbrom 还在第 0011 段中提到，羧酸是有效的增进冷沉淀物中血液凝固因子的产出的试剂。Shanbrom' 149 提到，向血浆中加入柠檬酸盐，特别是加入的重量浓度在 2-10% 时，不会使易变性的蛋白质发生变性。并且，Shanbrom' 149 中还提到，通过热处理，加强或增进了柠檬酸盐对微生物的杀灭。

[0013] Shanbrom' 167 在第 0015 段中提到，“加入的柠檬酸盐不仅增加了冷沉淀物的量，并且由于对冷冻（血浆以收集冷沉淀物）的需要的降低还简化了过程...”。Shanbrom 明确地指出，通过使用浓度为 2-10% 的柠檬酸三钠生成冷沉淀物，而从冷沉淀物中分级分离出产物。

[0014] Shanbrom' 149 和' 167 直接涉及的是从用柠檬酸化合物，特别是柠檬酸三钠形成的冷沉淀物中提取易于凝固的产物，以及使用柠檬酸化合物杀灭冷沉淀物中的微生物，而本发明直接涉及的是从使用盐类化合物而形成的上清液中提取稳定的产物（例如清蛋白、 γ 球蛋白和 α -1-抗胰蛋白酶）。Shanbrom 未曾以任何方式教导或提及上清液的使用。

[0015] 在 20 世纪 50 年代，发现了从血基材料中得出的“冷沉淀物”含有各种用于治疗凝血疾病如血友病的有用因子。这种冷沉淀物，由其命名可知，是通过冷冻血浆然后在 0-4℃ 可控融化形成沉淀物的液体悬浮物而获得的。由低温沉淀法获得的上清液然后可按科恩法进行分级分离得到清蛋白和 γ 球蛋白。后续的开发将冷沉淀物分级分离为纯的 VIII 因子、von Willebrand 因子以及其他凝固因子的浓缩物。这可通过使用非醇的分离和色谱纯化实现。

[0016] 发明简述

[0017] 简言之，本发明提供了一种新的从血浆中分离出 γ 球蛋白，并将其制备为可静脉注射的制剂的有效方法。因此，本发明可定义为“超高产率的静脉注射免疫球蛋白制剂”。本发明利用非变性沉淀剂从血浆中直接、迅速地分离出 γ 球蛋白，从而以较高产率获得了高质量的 γ 球蛋白，这些非变性沉淀剂可从包括柠檬酸钠、醋酸钠和葡萄糖酸钠的有机盐和包括硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和氯化铵的无机盐的组中选择。使用这些盐的两个出乎意料的特点是：(1) 分级分离取决于溶液所使用的有效重量百分比，以及 (2) 当单独使用这些盐和组合使用两种或多种具有相同有效重量百分比的盐的混合物时，均可有效进行分级分离。

[0018] 并且，证明了将这些盐加入到蛋白质溶液中时，不会像以前加入醇的方法那样除

去水。使用这些盐进行快速分离,除去产生的级分,随后从所得级分中除去盐,并迅速修复蛋白质内的水分子证明了其优于应用目前采用的乙醇分级分离方法。

[0019] 本发明的方法是对血基产物进行分级分离,生产有用的、未变性的免疫球蛋白(有时称作 IgG) 产品,该方法包括以下关键步骤:

[0020] (a) 向一定量的待分级分离的血基材料中加入足量的第一次量取的选择的盐或盐的组合,使得第一次加入的选择的盐或盐的组合达到第一次的预定浓度,形成不含优球蛋白的上清液产物,该上清液产物是可从残余的糊中分离的,并将两者分离;

[0021] (b) 完成第二分级分离:向分离的上清液产物中加入第二次量取的与前述相同的或另选择的盐或盐的组合,使所选择的盐或盐的组合达到第二的预定浓度,从而形成第二可分离的糊状产物以及为上清液的第二残余产物,然后分离该产物;

[0022] (c) 形成第二分离的糊状产物的稀释液;以及

[0023] (d) 渗滤第二分离并液化的糊状产物,形成基本不含选择的一种或多种盐的低体积的产物,该产物可随即用已知的实用方法处理,生产有用的、未变性的 IgG。

[0024] 在步骤 (a) 中,第一体积利用向血基材料中加入浓缩的盐溶液或干盐,在与一定量的血基材料混合后得到 11-13% 重量百分比的溶液。在该浓度下,加入的盐对血基材料进行部分选择性脱水形成上清液和沉淀的残余糊状物。注意,上清液具有的选择的盐或盐的组合的浓度是 11-13% 重量。优选的浓度大约是 12%。如果需要,残余糊状物可进一步分级分离为包括 VIH、IX、von Willebrand 和纤维蛋白原的血液因子。产物的分离可通过离心分离或化学领域熟知的现成方法完成。保留上清液用于进一步处理。

[0025] 在步骤 (b) 中,第二体积利用在保留的上清液中加入浓度更高的盐溶液或加入足量的干盐,来选择性地对其进行部分脱水以得到第二糊状物和残余的第二上清液产物。第二糊状物和第二上清液产物的总的重量浓度应在约 21-23% 的范围。优选地,所选择的盐或盐的组合的重量浓度大约是 22%。如同步骤 (a),如果需要的话,可将残余物(在这里为第二上清液)进一步处理为含有清蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶和其他蛋白质的一组成分。产物可通过离心分离、过滤或采用化学领域熟知的其他方法分离。

[0026] 出乎意料的是,使用盐进行的沉淀似乎并不取决于摩尔反应的类型。相反,沉淀在步骤 (a) 和 (b) 中均显示出仅对重量浓度有依赖性。在下表(表 I) 中,给出了有机盐 and 无机盐的有效浓度。注意,每种所列出的盐有效的重量浓度基本上都是相同的。

[0027] 表 I

[0028]

有机盐	分子量	在12%溶液中的摩尔量(步骤(a))	在22%溶液中的摩尔量(步骤(b))
柠檬酸钠	294	0.408 M	0.748 M
乙酸钠	82	1.46 M	2.68 M
葡萄糖酸钠	218	0.427 M	0.783 M

[0029]

无机盐	分子量	在12%溶液中的摩尔量 (步骤 (a))	在22%溶液中的摩尔量 (步骤 (b))
硫酸铵	132	0.908 M	1.66 M
氯化钠	58.5	2.05 M	3.76 M
硫酸钠	142	0.845 M	1.54 M
氯化铵	53.5	2.24 M	4.11 M

[0030] 表 I- 可用于步骤 (a) 和 (b) 中的盐的有效浓度的举例。

[0031] 同样出乎意料的是,只要盐的总重量浓度保持在步骤 (a) 和 (b) 中所使用的范围内,则可以任何组合使用上面所列出的盐。

[0032] 在步骤 (c) 中,优选用水稀释糊状产物至约 4 倍糊状产物的重量,但也可选用本发明范围内其他的水量。

[0033] 在步骤 (d) 中,可使用带有 30KD 过滤膜的渗滤系统从所得产物中分离所选择的一种盐或多种盐以及过量的水,以用于工业规模的进一步处理。注意,在步骤 (a) 的上清液中萃取出优球蛋白,使用这种过滤是容易和可行的。这里使用的“优球蛋白”被定义为那些不溶于水但溶于盐溶液中的球蛋白。更为重要的是,如果优球蛋白不从溶液中除去,且如果溶液的离子强度朝着去离子水的方向降低(例如在本发明的情况中),则优球蛋白将阻塞渗滤系统,使其无法使用。

[0034] 已知在血浆的采集、保存和储存中,低浓度的柠檬酸钠很早就被使用了。在使用高浓度的柠檬酸钠和 / 或其他盐作为沉淀剂之后进行的渗滤将显著降低离子浓度和 γ 球蛋白溶液的体积,从而可在工业规模上实现色谱纯化。

[0035] 用该方法从血浆中分离出 γ 球蛋白后,按照科恩或其他人提出的方法从剩余的蛋白质中除去清蛋白和 α -1- 抗胰蛋白酶。本发明的方法在分离 γ 球蛋白时不会与科恩方法中使用的起变性作用的醇接触,从而保留了 γ 球蛋白的天然状态。醇的变性作用包括形成聚合物、凝集物和 γ 球蛋白分子的碎片。然而,使用一种或组合使用前述的选择的盐可稳定血浆并使几乎所有的凝结蛋白质形成沉淀,从而防止了酶活化剂和蛋白水解酶的生成。

[0036] 在没有醇的变性作用、用选择的盐稳定血浆并然后用选择的盐除去凝结蛋白质,得到抗补体活性非常低的 γ 球蛋白制剂。

[0037] 总而言之,本发明的方法运用了高浓度的一种或多种预先选择的盐,并随后通过渗滤这一在 20 世纪 80 年代实现工业化的技术从 γ 球蛋白浓缩物中除去这些盐。所得 γ 球蛋白的最终纯化可借助已完善建立的色谱纯化技术可行和有效地完成。由于具有更高的产率,较少的分离步骤,更短的处理时间,较低的能量消耗和较低的化学品成本,从而降低了本发明的生产成本。由于减少了场地要求,降低了处理工作量,缩短了处理时间,以及消除了乙醇方法中所需要的防爆环境,资本成本也更小。

[0038] 出乎意料的是,本发明的方法也可采用醇,且其浓度与上面提及的盐的浓度类似。尽管对使用乙醇时的变性作用存在疑虑,但实验结果则令人感兴趣。与现有技术的乙醇方法的根本区别是,本发明的方法是在过程完成后迅速除去乙醇,从而与现有的乙醇方法相

比,可产生较小变性和产率更高的静脉注射 γ 球蛋白。并且,本发明的醇方法可在 0-25℃ 的温度之间进行。

[0039] 因此,本发明的主要目的是提供一种比现行方法成本低的有效的静脉注射 γ 球蛋白制剂。

[0040] 因此,本发明的基本目的是提供一种无醇制备 γ 球蛋白的方法。

[0041] 而本发明的重要目的是提供这样的高产率方法和制剂。

[0042] 本发明的另一目的是提供 γ 球蛋白制剂,其可被快速注射,且比采用醇的传统方法生产的 γ 球蛋白具有更高的患者耐受性。

[0043] 本发明的一个目的是提供先前未使用过的运用醇的方法,该方法具有比现有方法更高的产率和较低的变性。

[0044] 本发明的一个目的是,比采用传统基于醇的方法在生产 γ 球蛋白过程中形成的聚合物、凝集物、碎片、酶活化剂和蛋白水解酶有所降低。

[0045] 本发明的另一目的是作为根据本发明的任选方法获得冷沉淀物,形成冷沉淀物的悬浮液,将该悬浮液通过分级分离产生 VIII 因子、von Willebrand 因子,以及其他凝固因子。

[0046] 本发明的上述和其他目的以及特征在参照附图的详细描述中将更为明显。

附图说明

[0047] 图 1 是与本发明方法相关的一组关键初始步骤的流程图。

[0048] 图 2 是图 1 中所示步骤后紧接的一系列步骤的流程图。

[0049] 图 3 是图 2 中所示步骤后紧接的那些步骤的流程图。

[0050] 图 4 是紧接着图 3 中所示步骤后提供有用产物的步骤的流程图。

[0051] 实施方式的详述

[0052] 现在参见图 1-4 所示的流程。一般而言,长方形框用于表示过程步骤,每个菱形框用于表示分离步骤;每个椭圆柱形表示从前面的过程或分离步骤获得的产物;每个圆圈用于表示起点或页外的连续过程点。

[0053] 现参见图 1,这里示出了统一标号为 10 的优选的 IgG 处理流程中的起始部分 10-1。如在最初起始点 20 后所示,选择一定体积的待处理处理血浆 30。应当注意的是,尽管以血浆 30 作为例子在实施方式中描述,但也可用本发明范围之内的方法对其他的血基产物进行处理。并且,在为使用做准备之后,使用分离步骤 42 从被制备的冷沉淀物贫乏的血浆 (cryo-poor plasma) 50 中分离糊状物 44,这在下面将有更详细的说明。

[0054] 作为步骤 40 的一部分,将选择的冷冻的血浆 30 加热到约 5℃ 离心制成制备血浆。尽管 5℃ 是目标血浆 30 的处理温度,且应当在下面的步骤 10 中维持该温度,但在 2-8℃ 范围之间的温度均被认为是在本发明范围之内。如果选择的血浆不是冷冻状态(例如在用传统方法除去冷沉淀物的过程中融化),则血浆 30 可直接使用。

[0055] 根据步骤 52,选择一定量的一种盐或多种盐(可从上面表 I 中列出的盐中选择)加入到血浆 50 中。由于可选择使用一种盐或盐的组合,因此可谨慎地认为加入的盐被称作“至少一种盐”,且在上述步骤 (a) 和 (b) 各步中使用的量可含有单一的盐或盐的组合。通常,盐或盐的组合可配置成溶液,或作为干盐加入,或作为水合的和干盐的组合形式加入

(步骤 54)。无论在何种情况下,最重要的是使加入的盐的总浓度达到预定的重量浓度。

[0056] 例如,当选择使用柠檬酸钠时,将 500g 柠檬酸钠在 600ml 纯净水中搅拌,配置成 50% 的柠檬酸钠溶液。搅拌时间应当为 30-60 分钟,或者搅拌到柠檬酸钠溶解为止。这时,用纯水稀释混合物至 1000ml。向混合物中加入 50% 柠檬酸溶液直到达到 pH 7.0。

[0057] 在有机化学领域中,大家都知道以下步骤可用于产生 50% 柠檬酸溶液。向 60ml 纯净水中加入 50gm 柠檬酸。搅拌时间应当为约 30 分钟,或者搅拌到柠檬酸溶解为止。在柠檬酸溶解后,加入足量的纯净水使体积达到 100ml,并充分搅拌。取该溶液的部分加入到 1000ml 柠檬酸钠中,调节 pH 到 7.0。这样,向柠檬酸钠溶液中加入柠檬酸直到 pH 达到 7.0。应当注意的是,只需加入很少量的柠檬酸来调节 pH 到 7.0。

[0058] 为了准备进行第一分级分离步骤(对于柠檬酸钠为步骤 54),计算出加入到血浆 50 中的分级分离溶液的体积。目标是盐浓度(这里是柠檬酸钠分级分离溶液)应当为 12% 重量百分比。并且,分级分离溶液的 pH 应当大致为 7.0。

[0059] 以下是计算分级分离溶液(柠檬酸钠)和血浆 50 各自体积的公式:

[0060]
$$x = (C \cdot V) / (0.5 - C)$$

[0061] 其中:x 是 50% 柠檬酸钠溶液的期望体积;

[0062] C 是柠檬酸钠的期望的分级分离浓度;(例如 0.12 或 12%);以及

[0063] V 是需要稀释的溶液的体积,(例如血浆 50 的体积)。

[0064] 按公式 I 计算的一个例子是:

[0065] 对血浆 50 的体积(V_p)为 500 升,且柠檬酸钠的期望的分级分离的重量浓度为 12%:

[0066]
$$x = (0.12 \cdot 500) / (0.5 - 0.12) = 158 \text{ 升}$$

[0067] 对公式 I 中 C 求解,得到公式 II,按如下在其中插入血浆 50 和柠檬酸钠的体积值:

[0068]
$$C = (0.500 \cdot 158) / (500 + 158) = 0.12$$

[0069] 对步骤 54,在大约 5 分钟以上的期间内,将制备的柠檬酸钠分级分离溶液(可以是在室温,即大约 20°C)加入到起始温度为 5°C 的血浆 50 中。加入柠檬酸钠溶液时缓缓搅拌。当柠檬酸钠溶液完全加入到血浆 50 中后,继续缓缓搅拌所得的浆液约 60 分钟,并使浆液温度降低至 2-8°C。(浆液的 pH 应当保持在约 7.0-7.1。)

[0070] 在完成步骤 54 之后,进行步骤 56 的离心分离。推荐使用无逆流离心机(例如 Westphalia 离心机),采用本领域的常规步骤来将浆液的组分分离成上清液 60 和糊状物 62,并同时浆液温度维持在 2-8°C 的范围。

[0071] 含有原始血浆中几乎所有 IgG 的上清液 60 留作进一步处理,作为本发明方法的不可缺少部分,可对糊状物 62 进一步处理,得到血液因子,包括 VIII、IX、von Willebrand 和纤维蛋白原。

[0072] 对第二分级分离相,使用柠檬酸钠进行过程的步骤 64,向上清液 60 中加入额外的柠檬酸钠分级分离溶液。向上清液 60 中加入足够的 50% 的柠檬酸钠,以使柠檬酸钠的重量浓度从 12% 增加到 22%。注意,对于用在步骤 64 中的其他的一种或多种盐,使用的至少一种盐的总的重量浓度应当在 21%-23% 的范围,优选为 22%。

[0073] 为计算需加入的 50% 的柠檬酸钠的体积,提供公式 III:

[0074]
$$C_e = ((V_{60} \cdot C_{60}) + (V_x \cdot C_{0.50})) / (V_{60} + V_x)$$

[0075] 其中, C_e 是柠檬酸钠期望的最终重量浓度; V_{60} 是上清液 60 的体积; C_{60} 是上清液 60 中柠檬酸钠的浓度; V_x 是待加入的 50% 的柠檬酸钠的体积; $C_{0.50}$ 是 50% 的柠檬酸钠的浓度 (即 0.50)。

[0076] 注意, 溶液中的柠檬酸钠期望的最终重量浓度为 0.22 或 22%。

[0077] 对 V_x 求解, 得到公式 IV, 其可用作计算待加入的柠檬酸钠的体积。

[0078]
$$V_x = V_{60} * (C_e - C_{60}) / (C_{0.50} - C_e)$$

[0079] 例如, 当体积 V_{60} 为 552 升; 重量浓度 C_e 为 0.22; 重量浓度 C_{60} 为 0.12; 以及重量浓度 $C_{0.50}$ 为 0.50:

[0080] $V_x = 197$ 升

[0081] 加入了 V_x 体积的柠檬酸钠后, 搅拌 2-4 小时 (尽管对较小体积而言 1-2 小时通常足以), 并维持该混合物的温度在 2-8°C。注意, 随着柠檬酸钠的加入以及搅拌混合物, 该溶液将变为淡黄色。

[0082] 搅拌后, 按步骤 66 离心混合物。使用连续流动离心机并维持温度在 2-8°C, 从上清液 72 中分离出糊状物 70。所得上清液 (上清液 72) 中基本不含 IgG。血浆 50 中所有的 IgG 此时均在糊状物 70 中。

[0083] 现在参见图 2, 在流程 10 的 10-2 流程部分中, 作为图 1 中的点 80 的继续相当于点 80'。糊状物 70 的成分包括 IgG、其他血清蛋白质和柠檬酸钠。柠檬酸钠 (和 / 或其他使用的一种盐或多种盐) 必须从糊状物 70 中除去, 这样才能用离子交换色谱分离 IgG。首先, 如步骤 90, 用纯净水 (大约为糊状物 70 体积的 4 倍) 将糊状物 70 液化。步骤 90 的产物是富含 IgG 的溶液 100。溶液 100 的初始电导度约为 20 毫西门子 / 厘米 (mS/cm)。

[0084] 在步骤 102 中使用纯净水作为溶剂用连续渗滤除去柠檬酸钠 (和 / 或其他使用的一种盐或多种盐), 将溶液 100 分成除去的柠檬酸钠 110 和脱盐 IgG 保留物 112。注意, 该步骤的进行在各种情况下应当是一致的, 而与所选用的至少一种盐无关。步骤 102 的完成标志着保留物 112 的电导度降低到了 100-900 微西门子 / 厘米 (μ S/cm)。对步骤 102 中的渗滤, 可采用配备了 30KD 截断膜的 Millipore (或类似的) 渗滤系统。

[0085] 富含 IgG 的保留物的病毒灭活步骤 112 与步骤 120 可通过双重病毒灭活步骤完成, 包括第一溶剂 / 清洁剂 (S/D) 法, 然后是增强的 S/D 法。第一种方法中将保留物 112 的温度升高至约 27°C (温度可在 24-30°C 范围之间)。然后加入足够体积的 Triton X-100 或 Tween 80, 形成 1% 的溶液, 并用足够的磷酸三正丁酯使 1% 的溶液的十分之三形成加入了 S/D 的第一混合物。继续第一种方法, 在 27°C 下培育加入了 S/D 的第一混合物 3 小时, 其间脂质包裹的病毒被灭活。从这点考虑, 目前可采用的灭活和分级分离方法均可采用。然而, 为完整起见, 下面将提供目前优选的方法。

[0086] 对步骤 120, 可按如下制备 S/D 浓缩物:

[0087] 在 800ml 纯净水中加入 30ml 磷酸三正丁酯。充分混合。向混合的溶液中加入 100ml 的 Triton X-100 或 Tween 80。再度充分混合, 得到最终混合的 S/D 溶液。加入足够的纯净水, 使最终混合液的总体积达到 1000ml。再次充分混合。这样获得的最终浓度为 10 倍的浓缩物。向每 900ml 的保留物 112 中加入 100ml 的这种浓缩物, 形成加入了 S/D 的第一混合物。

[0088] 培养 3 小时后, 向由第一 S/D 法得到的溶液中加入足量的甲醛, 使 1% 溶液的十分

之三与足量的苯酚形成由 1% 溶液的十分之三构成的增强的混合物,以用于步骤 120 的增强方法。在大约 27℃ 下再培养 3 小时,此后未包裹的和包裹的病毒均将被灭活。

[0089] 对步骤 120,可按如下制备“增强的”浓缩物:

[0090] 向 900ml 的纯净水中加入 13.4ml 的 37% 和 50% 的甲醛溶液。充分混合。向该混合物中加入 50g 苯酚(试剂级)。再次充分混合。加入足够的纯净水,使“增强的”制剂的总体积达到 1000ml。再次充分混合。该制剂含有 50,000ppm 的甲醛和苯酚(各自为 5%)。测定第一加入了 S/D 的混合物的体积。向每 833ml 的 S/D 的混合物中加入 167ml 的增强的浓缩物,形成增强的混合物。

[0091] 步骤 120 通过冷却增强的混合物至 2-8℃ 而完成。冷却后,增强的混合物成为灭活病毒的 IgG(VI) 溶液 122。

[0092] 或者,如果需要的话也可用其他方法除去病毒(例如色谱、纳米过滤、巴斯德杀菌法)。

[0093] 步骤 124 包括使用柱色谱来除去病毒灭活的化学物质。这可通过以下的分步骤完成:

[0094] 1. 用 Toyopearl CM-650C 树脂建起一个短而宽的柱子。Toyopearl 树脂是弱的阳离子交换树脂,用于捕捉溶液 122 中的 IgG,同时允许溶液 122 中的其他蛋白质流过柱子。重要的是溶液 122 的电导度在 100-900 微西门子/厘米(μ S/cm)的范围。(电导度优选在 400-600 微西门子/厘米)来自血浆 50 的 IgG 在低离子浓度的溶液中与交换树脂结合。

[0095] 2. 向交换树脂中缓慢加入溶液 122。收集通过柱的流出液,将其置于 1cm 的硅玻璃容器,在 280nm 波长下用高质量的分光光度计测定流出液。(例如,可使用采用氙光源的 Beckman DU-7)。应当注意,流出物的光密度将随引入到树脂柱中的蛋白质而增加。用于病毒灭活溶液中的苯酚(如果使用的话)也可增加测定到的光密度。在所有的溶液 122 均通过树脂柱且洗掉柱中的灭菌剂后,在光密度比其原始值有所增加时开始收集流出物。光密度的增加表明流出物中含蛋白质。一段时间后,光密度降低到一定水平,这表示在溶液中有很少的蛋白质或没有蛋白质。此时,可停止收集。同时,优选去离子水充分清洗树脂。发生结合的是 IgG,其在流程 10-2 中被标记为结合的 IgG130。由柱中收集到的流出物包括血浆 50 中除 IgG 之外的所有蛋白质。该流出物是流出物溶液 132。建议对流出物溶液 132 进行血清蛋白质电泳,以确认仅有很少的 IgG 或没有 IgG 释放到溶液 132 中。

[0096] 根据树脂柱的尺寸,配制一定体积的 2% 的氯化钠溶液。该氯化钠溶液用于促使树脂颗粒释放出吸附的 IgG。在化学领域中,大家都知道 2% 的溶液是通过混合 20g 氯化钠到 1L 去离子水中制得的。足量的 2% 的氯化钠溶液的体积应大致等于树脂柱体积的 10 倍。

[0097] 对于步骤 134,向柱中加入氯化钠溶液,收集柱流出物。同时,使用分光光度计在 280 纳米测定 1cm 的硅玻璃容器中的流出物溶液的光密度。随着 IgG 从柱释放并进入流出物中,将发现所得的光密度(OD)会突然增加。收集所有测定到的高 OD 溶液。当流出物的 OD 降到较低(正常)范围时,停止收集溶液。所得溶液是 IgG 溶液 140。注意,高的 OD 表明溶液中有蛋白质成分,以及溶液 140 中可能含有少量的 IgM 和 IgA,它们需要进一步被除去。此外,溶液 140 还含有氯化钠,也需在分离出任何纯的 IgG 之前除去。

[0098] 现在参见图 2 中的接续点 150,其与图 3 中流程 10 的 10-3 流程部分中的接续点 150' 相接。优选采用渗滤系统进行连续渗滤,从溶液 140 中除去氯化钠。这样的渗滤系统

可由备有 30KD 截断膜的 Millipore (或类似物) 渗滤系统组成。在步骤 152 中的渗滤溶剂是纯净水。值得注意的是, 溶液 140 最初的电导度大约是 50 毫西门子 / 厘米 (mS/cm)。渗滤结束后, 电导度降至 100-900 微西门子 / 厘米 (uS/cm)。

[0099] 渗滤产物是富含 IgG 的保留物 160 和除去的氯化钠 164。建议在此步操作时进行血清电泳以确认保留物 160 中的蛋白质级分。

[0100] 步骤 166 是纯化富含 IgG 的保留物 160 的最后步骤。对步骤 166 优选 Toyopearl QAE-550C 树脂建短而宽的树脂柱。这种树脂提供强的阴离子交换, 用于捕捉富含 IgG 的保留物 160 中的其他蛋白质, 同时允许溶液中的 IgG 流过柱子。重要的是保留物 160 的电导度在 100-900 微西门子 / 厘米的范围, 优选在 400-600 微西门子 / 厘米的范围。这样, 保留物 160 中的 IgG 将在步骤 166 中流过树脂柱而不发生结合, 而其他蛋白质, 包括 IgM 和 IgA 将结合到柱中的树脂上, 从而从溶液中除去。这样, 将从纯化的 IgG 溶液 172 中有效地分离出任何污染的残留蛋白质 170。

[0101] 由于过程是连续的, 建议收集 IgG 溶液 172 并在 280nm 测定 OD。收集高 OD 的流出物溶液。当测定到的 OD 降低时, 停止收集。收集的溶液相对较稀。

[0102] 步骤 180 的超滤是对收集的溶液进行浓缩。对该超滤而言, 可使用中空的纤维过滤器, 或 Millipore 超滤系统 (Pellicon) 或等同物 (10K-30K 道尔顿保持力), 浓缩到 12% 的 IgG 溶液 182。184 是步骤 180 中除去的过量的水。所得的 12% 的浓缩物应当仅含痕量的氯化钠, 且 pH 应当约为 7。电导度应当在约 100-900 微西门子 / 厘米。

[0103] 为了稳定 12% 的 IgG 溶液 182, 加入 (步骤 190) 麦芽糖或山梨糖醇溶液将 12% 的溶液稀释到正好 10%。最终的 10% 的溶液 (IgG 溶液 192) 应当含有大约 5% 的麦芽糖或约 5% 的山梨糖醇 (无论使用那种)。

[0104] 任选将 10% 的溶液 192 通过病毒截留膜 (步骤 200) 进行纳米过滤, 而从 IgG 溶液 192 中除去病毒 204, 以生产纳米过滤的浓缩物 202。

[0105] 现在参见图 4 流程 10 的 10-4 流程部分中的接续点 210', 其与图 3 中的接续点 210 相接。作为标准操作, (根据前面是否进行了选择步骤 200), 步骤 220 用去离子水稀释稳定的 IgG 浓缩物 192 或稀释纳米过滤的 IgG 浓缩物 202, 产生纯化的散装 IgG 溶液。污染的细菌可在步骤 230 中借助使溶液 222 通过灭菌的过滤器来除去, 从而产生灭菌的散装 IgG 溶液 232。除去的污染的细菌 234 可通过已知的任何方法进行处理。

[0106] 所得的灭菌溶液 232 在步骤 240 中按标准操作方法分装至小瓶中, 得到溶液 232 的一批小瓶 242。为确保质量, 可在步骤 244 以及步骤 246 中进行 242 批的最终测试和检查, 从而得到溶液 232 的有效的小瓶组 250, 其中已去除了所有废弃物 252。

[0107] 现参照图 1, 其中流程图 10-1 公开了用于分离出糊状物的步骤, 由图中看出, 由该糊状物可分级分离出其他产物, 例如因子 VIII、von Willebrand 因子以及其他凝固因子。图 1 中所示的与产物 44 相关的步骤为任选步骤, 随后可生产出冷沉淀物, 并可从冷沉淀物中除去因子 VIII、von Willebrand 因子以及其他凝固因子。在这种情况下, 步骤 40 是逐渐将血浆 30 从 0°C 升温到 4°C。这种升温得到融化的血浆, 冷沉淀物悬浮于其中。按照步骤 42, 融化的血浆经离心分离得到糊状物 44 形式的冷沉淀物。糊状物 44 可随后用已知方法分离和处理, 以提供因子 VIII, von Willebrand 因子以及其他凝固因子。保留的分离的物质称作冷沉淀物贫乏的血浆 50, 用前面公开的方法处理。

[0108] 根据本发明进行的分级分离步骤的结果：

[0109] 为了证明在这里公开的本发明的分离步骤的效果和准确性，从 2005 年 8 月 8 日的实验报告中摘出下面的使用柠檬酸钠的结果。

[0110] 在该过程中，使用了新鲜的冷冻人血浆。在该过程中，通常混合 4-8 袋融化的血浆制得血样池（见图 1 步骤 40）。使用从 Beckman-Coulter 购置的设备来评价各种可获得的级分。使用 Beckman 的 "Appraise" 显像密度计作为 Paragon 电泳系统的一部分，扫描 Beckman 琼脂糖胶用于血清蛋白质电泳。对由血样池得到的每一级分，在 3 和 5 个凝胶狭缝之间加载 5 μ l 的产物。对结果进行平均，以获得每种级分的更具代表性的结果。这些结果列于下面提供的表中。

[0111] 凝胶在 100VDC 和 pH 8.6 下进行电泳 25 分钟，随后再用 Paragon 蓝色素染色。使用 Appraise 显像密度计在 600nm 扫描染色的干凝胶的每一凝胶狭缝两次（使用了每个凝胶带 10 个凝胶狭缝的凝胶）。根据每种级分吸附的染料的密度以及数据表达，得出五种不同蛋白质级分分布的平均图示。数据表达是从每个凝胶上在阴极和阳极之间产生的凝胶图案中选择部位处生成图的波峰和波谷的计算机分析得出的。表达值加和，并将染料百分数除以总的染料量，得到评价的百分数。注意，各血液级分的总和总是等于 100%。

[0112] 由下表 II 中看出，辨别了五种不同的蛋白质级分：清蛋白、 α 1、 α 2、 β 和 γ 球蛋白。在分级分离之前，从血样池中取样进行电泳，在开始分级分离之前确定每种级分的平均分数值。基础血样池中物质的代表性平均结果列于如下，作为整体血浆的百分数：

[0113]

	清蛋白	Alpha 1	Alpha 2	Beta	Gamma
基础血浆	61.2	7.1	9.7	13.0	8.9

[0114] 表 II：各级分的百分含量

[0115] 向一定体积的血浆中加入 50% 的柠檬酸钠对血样池中的血浆（即血浆 50）进行处理，得到 12% 的柠檬酸钠溶液（步骤 54）。在 2-8°C 下搅拌该混合物 60 分钟，然后在 2-8°C 下离心分离（步骤 56）60 分钟。测定产生的上清液溶液 60。称重剩余的糊状物 62，并加入去离子水制成溶液。

[0116] 采用上面的步骤对两溶液（60 和 62（溶解的））进行电泳，结果总结于下表 III 中：

[0117]

	清蛋白	Alpha 1	Alpha 2	Beta	Gamma
12% 的糊状物 62（溶解的）	67.8	2.7	9.1	20.4	nd*
12% 上清液 60	28.6	1.5	10.7	40.3	16.1

[0118] 表 III：所得百分浓度

[0119] *nd = 未检出

[0120] 在糊状物 62（溶解的）中未发现 γ 球蛋白。然而，在上清液 60 中发现了 γ 球蛋白。

[0121] 然后，向上清液 60 中加入足量的 50% 的柠檬酸钠溶液（步骤 64），得到含有 22% 柠檬酸钠的最终混合物。在 2-8°C 下搅拌该溶液 60 分钟。在 2-8°C 下离心分离（步骤 66）60

分钟后,测定所得的上清溶液 72。称重剩余的糊状物 70,并加入去离子水(加入水的毫升量是糊状物 70 重量的 4 倍)制成溶液(步骤 90),形成富含 IgG 的溶液 100。对上清液 72 和富含 IgG 的溶液 100 的样品按上面的步骤进行电泳,所得结果总结于下表 IV 中:

[0122]

	清蛋白	Alpha 1	Alpha 2	Beta	Gamma
22%上清液72	82.4	13.9	3.6	nd*	nd*
22%的溶液100(溶解的)	16.7	1.3	10.5	32.5	39.0

[0123] 表 IV:指示溶液的百分比浓度

[0124] *nd = 未检出

[0125] 在上清液 72 中未发现 γ 球蛋白。但在富含 IgG 的溶液 100 中发现了 γ 球蛋白。

[0126] 22%的上清液(其主要含有清蛋白)几乎不含 β 和 γ 球蛋白(即未检出它们的存在)。22%的糊状物溶液 100 含有有用的 γ 球蛋白,用作进一步分级分离以产生静脉注射用的 γ 球蛋白。注意,在步骤 90 中,在进行电泳之前,应给予糊状物一段时间进行溶剂化。在实验过程中,选择性地分离出含 12%~22%柠檬酸钠的血浆级分,用于此分离步骤。

[0127] 为除去在 22%的糊状物溶液中捕获的柠檬酸钠(步骤 102),选择 Pellicon 单元对溶液 100 进行渗滤。平均需要约 7 倍体积的溶液 100 来渗滤柠檬酸钠,并在进行柱上工作前,将所得溶液的电导度降低到 400~800 微西门子/厘米($\mu\text{S}/\text{cm}$)。

[0128] 渗滤之后,对脱盐的蛋白质溶液 112 进行电泳处理,以确定由渗滤步骤 102 带来的变化或损失。由于柠檬酸钠被除去,蛋白质在电泳图中的运动由于缺少与所含盐的相互作用而发生一定的改变。所得图比高盐浓度的图稍长。该拉长的图案使得 IgG 更容易从 β 球蛋白中分离出,这导致测定到的百分比的增加,如下表 V 中所示:

[0129]

	清蛋白	Alpha 1	Alpha 2	Beta	IgG
溶液112	16.6	1.5	9.9	26.9	45.2

[0130] 表 V:渗滤级分的百分含量

[0131] 从表 V 可看出,溶液 112 中大约 45%是 γ 球蛋白,且溶液 112 在电泳图中显示出更佳的分。注意, β 级分在电泳图案中位置的下降显示出更佳的分。

[0132] 此时,各种当前采用的方法均可用于纯化溶液 112 中的 γ 球蛋白。因此,该实验的完成可与图 2-4 中所示的步骤不同。在该实验中,溶液首先用溶剂/清洁剂溶液在 27°C 处理 3 小时。然后,按照 2003 年 9 月 12 日提交、授予 Allan L. Louderback 的名称为“AUGMENTED SOLVENT/DETERGENT METHOD FOR INACTIVATING ENVELOPED AND NON-ENVELOPED VIRUSES”的美国专利 6,881,573 制备的增强的灭菌溶液加入到混合物中,并进一步在 27°C 培养 3 小时。这种对透析的渗滤溶液进行的双重灭活处理使包裹的和未包裹的病毒均失活。

[0133] 将该灭菌处理过的溶液转移到装载了 Toyopearl CM-650C 树脂的离子交换柱上。树脂对 γ 球蛋白产生吸附,而允许溶液中的其他蛋白质从柱中流出。在将溶液加到柱上并调节柱流速使流出物始终缓慢滴出之后,在 280nm 测定流出物溶液以确定所有游离的蛋白质和灭菌剂均流过柱子的时间。此后,用两倍体积的纯净水清洗柱子,以确保流出物在

280nm 测定出很低的光密度。

[0134] 然后,在柱子顶端加入 2%氯化钠溶液,使滤液流经柱子。被树脂颗粒吸附的 γ 球蛋白获得释放而流出柱子进入接收容器中。

[0135] 对用纯净水(标记为纯净水)收集到的柱中流出物和用 2%溶液(标记为 2% NaCl)收集到的柱中流出物进行电泳测试,以展示选择的分离结果和从树脂颗粒释放的 γ 球蛋白。此步骤的结果总结于下表 VI 中:

[0136]

	清蛋白	Alpha 1	Alpha 2	Beta	IgG
纯净水	26.0	2.7	15.2	57.0	nd*
2% NaCl	nd*	nd*	nd*	1.9	98.1

[0137] 表 VI:所得百分比级分

[0138] *nd = 未检出

[0139] 注意,在第一树脂处理中有超过 98%的 γ 球蛋白得到分离。1.9%的 β 球蛋白的值可能是在将溶液涂入凝胶中时的涂入点处的结果。2%氯化钠溶液含有 γ 球蛋白(IgG),并且,对于较大的血浆样品,还可能含有一些 IgA 和 IgM 球蛋白,它们也应当被除去。

[0140] 对 2%的氯化钠溶液进行渗滤,以除去氯化钠而再次进行柱处理。将溶液流经 Pellicon 单元而进行再次渗滤,从而除去盐,生成电导度为 400-800 微西门子/厘米($\mu S/cm$)的最终产物。注意,可能需要 6 倍体积的去离子水用于渗滤 2%的溶液。

[0141] 最后一步是用 Toyopearl 560-C 树脂填充柱子,并从柱子顶部加入脱盐的溶液并使滤液缓慢流经柱子。在该柱子中, IgG 流过树脂,而其他的蛋白质(例如 IgA 和 IgM)吸附在树脂上,得到柱子的最终流出物(溶液 172),其为在水基中的 100%的 IgG。对流出物的测试如下表 VII 中所示:

[0142]

	清蛋白	Alpha 1	Alpha 2	Beta	IgG
溶液 172	nd*	nd*	nd*	nd*	100

[0143] 表 VII:终溶液的百分含量

[0144] *nd = 未检出

[0145] 按流程图 10-1 和 10-2 的步骤,使用各种盐对新鲜冷冻的血浆进行分级分离的实验。使用各种盐重复步骤 52、54 和 64,完成上面总结的两步中的分级分离过程。如表 VII 中所示,与公开的用柠檬酸钠的方法一致,如果可能,第一步骤 52 和 54 包括混合一定体积的血浆和第一预定体积的浓缩的盐溶液。当不可能通过将盐溶解于水而得到所需浓度时,可加入干盐来获得期望的重量浓度。

[0146] 盐溶液的第一预定体积为 12%重量。此后,在 2-8℃进行反应混合 1 小时。反应混合之后,在 2-8℃以 4500rpm 转速旋转所得混合物 1 小时。缓缓倒出并收集糊状沉淀物 62 的第一上清液 60。注意,第一上清液 60 含有 12%重量的所使用的盐的溶液。通常,所得的糊状沉淀物 62 用一定重量比例的去离子水(一般为收集的沉淀物 62 的 4 倍重量)稀释,并储存在 2-8℃过夜用于后面的分析。

[0147] 根据步骤 64,测定上清液 60 的体积,并加入一定量的浓缩的盐溶液,以将盐的浓度提高到 22%重量。所得组合物在 2-8℃混合 1 小时,然后冷冻过夜。次晨,再次混合组合

物约 5 分钟,然后在 2-8℃、4500rpm 下离心 1 小时。倒出上清液,上清液 72,并留下用作后面的步骤。从上清液 72 中分离出此步骤的目的产物糊状物 70 后,对其进行称重和稀释(按照步骤 90,加入去离子水溶解,水用量约为糊状物 70 重量的 4 倍)。

[0148] 用各种有机和无机盐的组合重复上面描述的过程。下面所示的表 VIII 给出了用 Beckman-Coulter 系统进行的血清电泳结果,电泳的结果用 Beckman-Coulter 扫描仪扫描的,并给出 5 个蛋白质的浓度,即清蛋白、 α -1、 α -2、 β 和 IgG。根据 Beckman 运算法则,各次扫描的总和大致为 100%。

[0149]

实验编号	步骤1 12%	步骤2 22%	清蛋白	Alpha1	Alpha2	Beta	IgG
1	硫酸铵	硫酸铵	18.1	1.9	25.6	24.6	29.9
2	柠檬酸钠	柠檬酸钠	19.4	1.4	10.1	35.4	33.2
3	硫酸铵	柠檬酸钠	17.0	1.6	9.6	26.4	45.5
4	柠檬酸钠	硫酸铵	17.9	1.6	12.6	24.7	43.2

[0150] 表 VIII 盐分级分离的血清电泳结果 - 示出每种分离的%

[0151] 在糊状物 62 和上清液 72 中均未发现 IgG。所有的 IgG 均在糊状物 70 中发现。由于 IgG 的值对于混合的有机(柠檬酸钠)和无机(硫酸铵)盐而言更高,因此应当不会产生混淆。这是其他蛋白质从血浆中分次萃取的结果。一些蛋白质对不同的盐具有不同的沉淀模式。重要的结果是几乎所有的 IgG 均发现在糊状物 70 中。

[0152] 通过本发明使用乙醇进行的过程结果

[0153] 出乎意料的是,发现可在本发明的范围内使用乙醇作为分级分离化合物。应注意,这里使用乙醇明显不同于现有的和以往的用乙醇进行血液分级分离。

[0154] 该方法经测试并记录于 2005 年 12 月 8 日的实验室记录本中,并使用一个冷冻的 FFP- 血浆瓶提供与上面公开的实验进行对照。在该实验中,使用的乙醇的浓度采用百分比测定,与公开的用于盐的方式相同。因此,95%的乙醇溶液经稀释制备出 50%的乙醇溶液(105ml 的 95%的乙醇加入 95ml 的去离子水中)。将如此制备的溶液放置在冰浴中,使其温度降低到 5℃。

[0155] 按照步骤 54,将 63ml 的 50%乙醇溶液加入保持在 5℃的 200ml 的 FFP- 血浆(剩余的)中。所得溶液(即含 12%乙醇)在冰浴中(2-8℃)搅拌 1 小时。搅拌后,按照步骤 56,用 Beckman J-6 离心机(4500rpm)旋转溶液 1 小时,温度维持在 2-8℃。倒出上清液 60,测定分离出的糊状物 62。

[0156] 上清液 60 的体积是 260ml。糊状物 62 的重量是 3.823g。用水(4 倍体积,即 15.3ml)对糊状物 62 进行重新水合,并充分混合。糊状物 62 显示出典型的块状沉淀。最终的稀释体积是 18ml。

[0157] 将上清液 60 置于冰浴中。再向上清液 60 中加入 50%乙醇(93ml),以将乙醇的重量浓度增至 22%(步骤 64)。在 2-8℃搅拌该溶液 1 小时,然后在冰箱中(2-8℃)储存过

夜。

[0158] 从冰箱中取出储存的溶液后搅拌约 5 分钟,然后置于离心瓶中,在 2-8℃ 和 4500rpm 下旋转 1 小时(根据步骤 66)。倒出上清液 72,并收集糊状物 70。注意,糊状物 70 是亮黄色的。(在大多数情况下,用盐生成的糊状物 70 是灰白色的。)尽管并不十分清楚,但怀疑黄色是由于乙醇从血浆中萃取出胆红素和其他色原体而产生的。在每个分级分离步骤均制备出库存样品。

[0159] 测定上清液体积(336ml)并将其储存在 5℃。糊状物 70 重 8.583g。用 4 倍体积的去离子水(34.3ml)对糊状物 70 进行重新水合,充分混合并储存在 2-8℃ 过夜。有趣的是发现当溶剂化后,糊状物 70 中的 IgG 的量出乎意料地高。

[0160] 测定结果总结于下表 IX、X 和 XI 中:

[0161]

	清蛋白	Alpha-1	Alpha-2	Beta	IgG
糊状物 62	39.2	2.2	15.4	33.4	9.7
上清液 72	73.7	9.1	8.3	8.9	-----
糊状物 70	6.7	2.8	17.2	6.7	66.6

[0162] 表 IX- 血清电泳:示出各级分的百分含量。

[0163]

样品	重量 -gm	体积 -ml
FFP- 血浆		200
糊状物 62	3.823	18
上清液 72		336
糊状物 70	8.583	40

[0164] 表 X- 最终分级分离的体积量

[0165]

	ml	gm/dl - 蛋白质	gm/liter - 蛋白质	gm/liter - IgG
FFP- 血浆	200	6.05	60.5	6.7 (11% - IgG)
糊状物 62	18	1.09	0.98	0.5
上清液 72	336	2.73	45.9	-----
糊状物 70	40	4.75	9.5	6.3

[0166] 表 XI- 蛋白质结果

[0167] 未对最初的基础材料进行电泳。然而,注意在每升血浆中约有 6.7g 的 IgG。如果将糊状物 62 中的 IgG 加上糊状物 70 中的 IgG,则它们的总和为 6.8g,与每升预期的 6.7g 很好地吻合。

[0168] 在不脱离本发明精神和实质特征的情况下,本发明可用其他具体形式实施。因此,这里的实施方式应当视作示例性的而非限制性的,而本发明的范围应以后附的权利要求为

准,而不应为上面的描述为准,且在权利要求含义和范围内的所有变化也应当包含在权利要求范围之内。

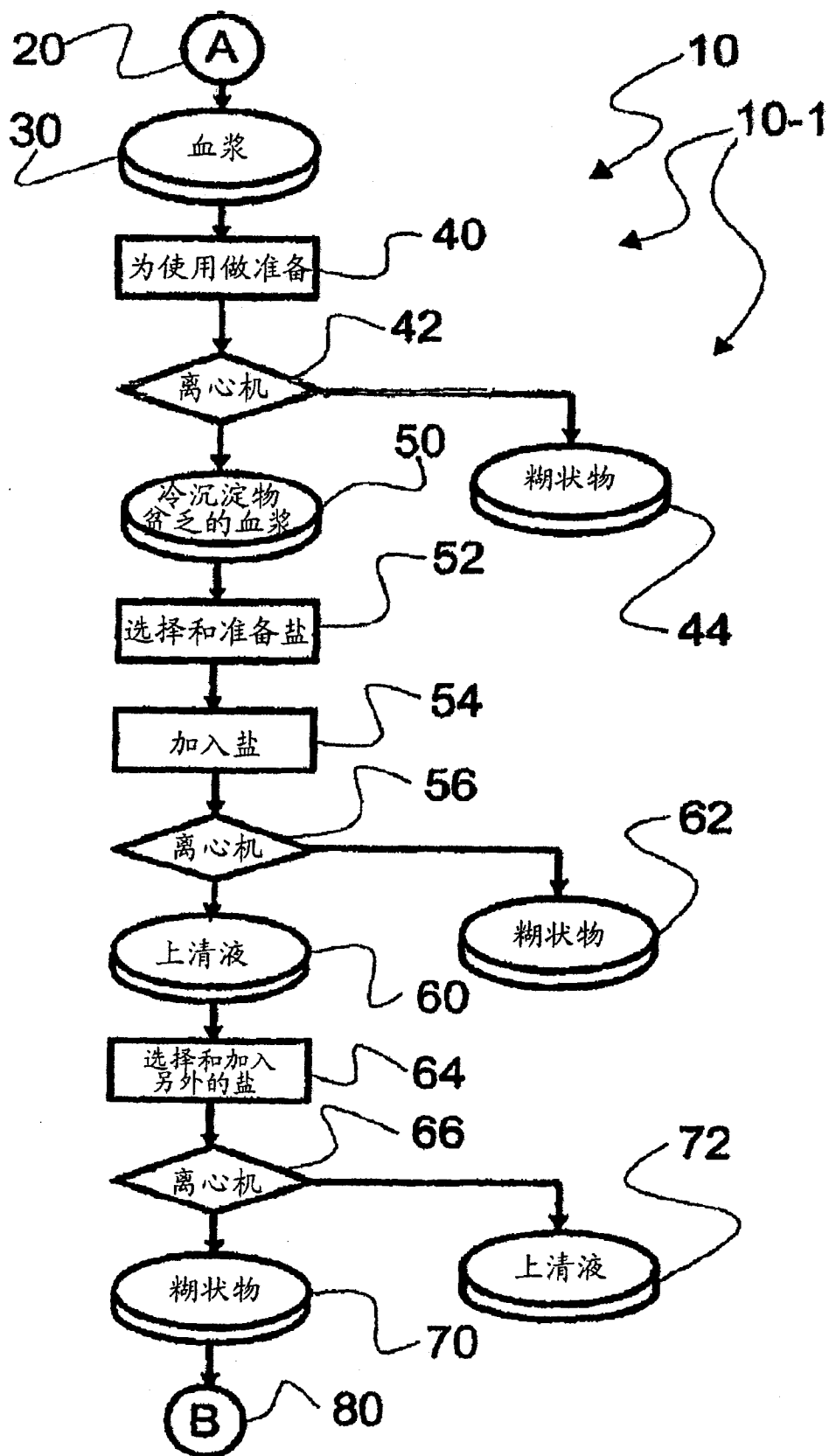


图 1

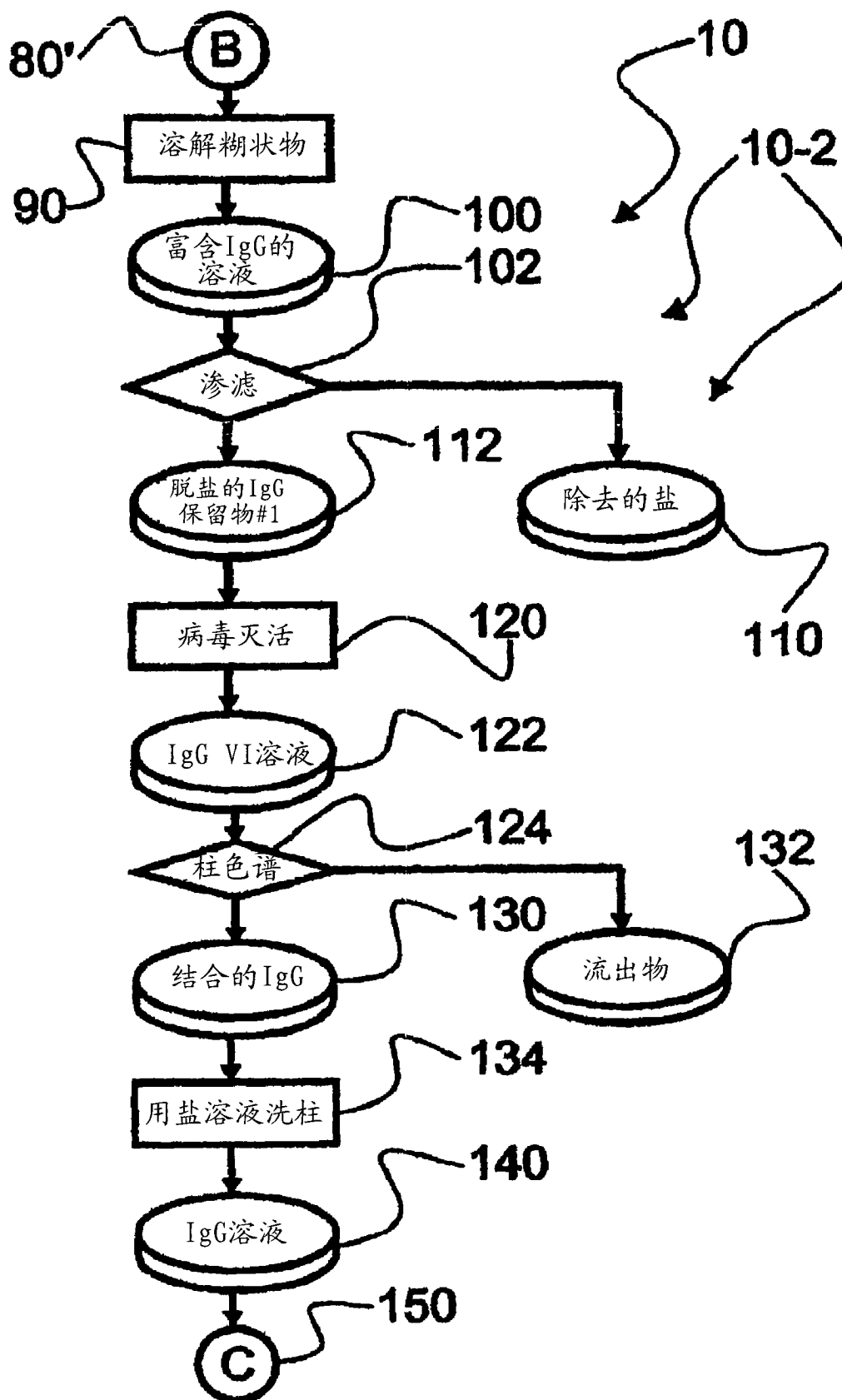


图 2

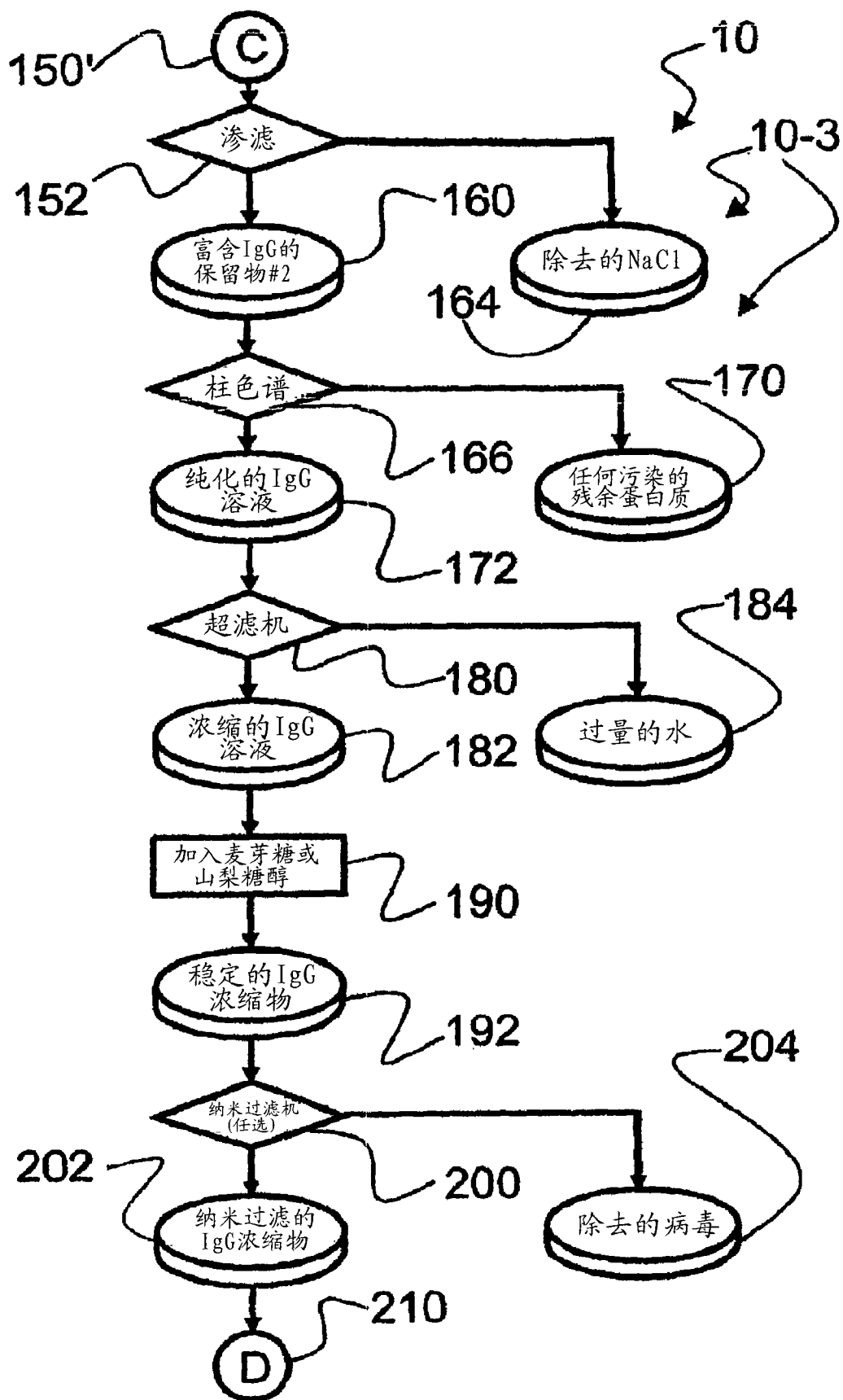


图 3

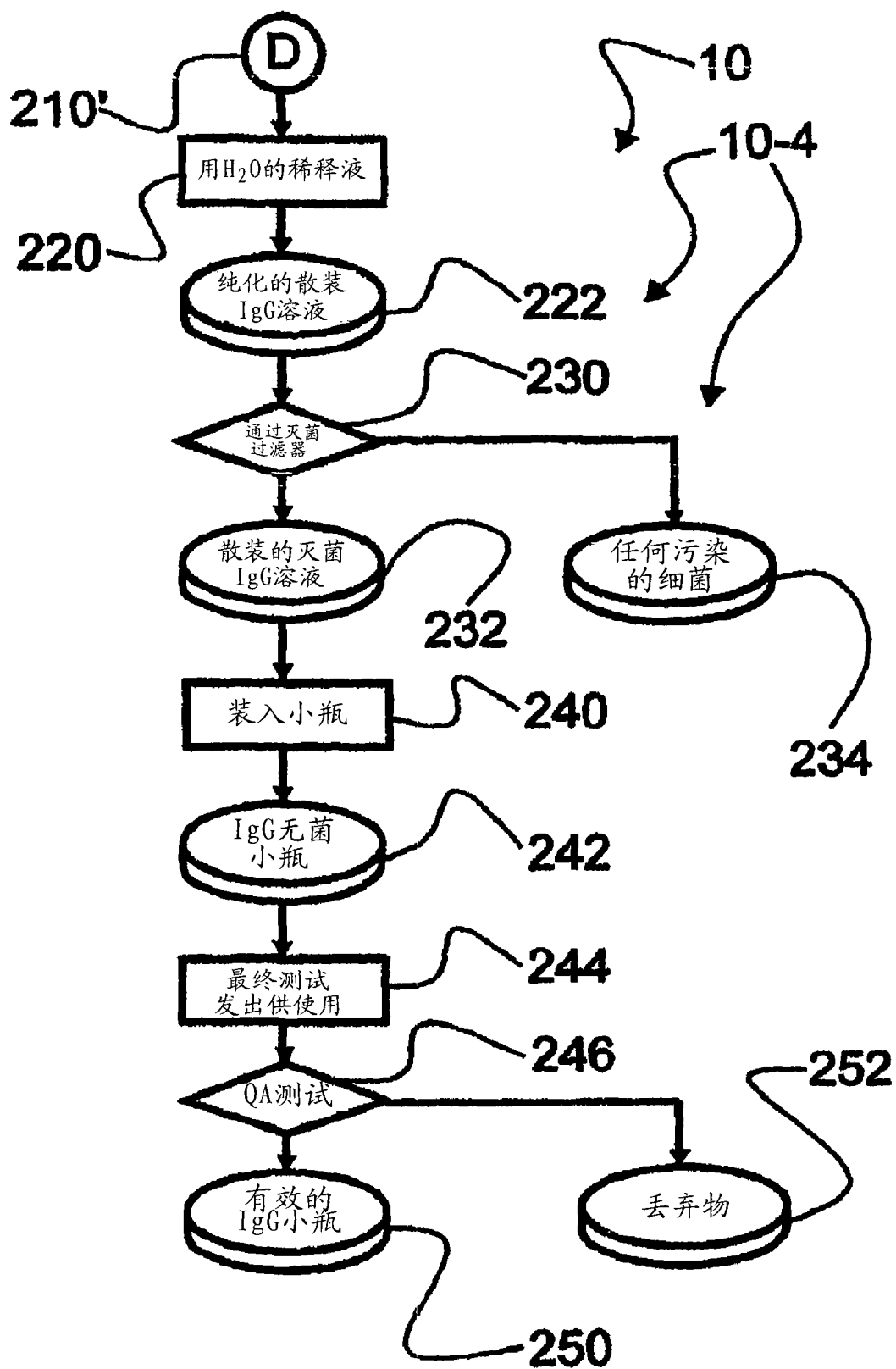


图 4