(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115677848 A
(43)申请公布日 2023.02.03

(21)申请号 202211301410.0

(22)申请日 2022.10.24

(71)申请人 通化安睿特生物制药股份有限公司
地址 134100 吉林省通化市通化县快大茂镇团结路2177号

(72)发明人 项炜 岳志蕾 董文雯 管廷臣

(74)专利代理机构 上海智晟知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 31313
专利代理师 李镝的

(51)Int.Cl.
C07K 14/765(2006.01)
C07K 1/18(2006.01)
C07K 1/14(2006.01)

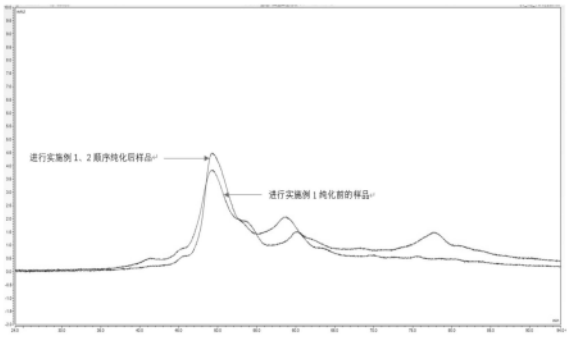
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

一种制备高纯度高稳定性蛋白质的方法

(57)摘要

本发明为采用添加中长链脂肪酸配体，通过阴离子或/和阳离子层析去除电荷异质性蛋白，获得高纯度高稳定性重组人白蛋白的方法。包含如下步骤：本发明的独特之处在于所述的混合液为脂肪酸混合物和泊洛沙姆的混合液；油酸、肉豆蔻酸、棕榈酸钠、硬脂酸钠和重组人白蛋白的摩尔比为0.3:0.3:0.3:0.5:1；序贯使用离子交换层析可以有效地去除重组白蛋白中的截断的白蛋白、错配或修饰的白蛋白，从而得到去除电荷异质性白蛋白、修饰后的白蛋白，获得高纯度高稳定性的人白蛋白样品。



CN 115677848 A

1.一种制备高纯度高稳定性蛋白质的方法,其特征在于,

包含如下步骤:

步骤A:将经前期纯化收集的重组人白蛋白样品用10KDa膜包置换缓冲液为80mM PB pH 7.5的平衡液体系,样品收集液加入混合液,所述的混合液为脂肪酸混合物和泊洛沙姆的混合液;油酸、肉豆蔻酸、棕榈酸钠、硬脂酸钠和重组人白蛋白的摩尔比为0.3:0.3:0.3:0.5:1;泊洛沙姆和重组白蛋白的重量比例为10-500微克泊洛沙姆/1克重组白蛋白;泊洛沙姆用于促进脂肪酸溶解;

上样后,以纯化水将阴离子交换层析柱冲洗至中性,层析柱装柱高度380mm,用50mM PB pH 6.5洗脱液体系对吸附样品的层析柱进行洗脱,收集重组人白蛋白组分;

步骤B:阳离子交换层析用40mM HAc-NaOH的平衡液体系平衡层析柱,将收集的重组人白蛋白组分;采用10KDa平板膜脱盐换液为阳离子交换层析平衡液体系,之后进行上样层析分离,收集重组人白蛋白的组分。

2.如权利要求1所述的一种制备高纯度高稳定性蛋白质的方法,其特征在于,

步骤C:将经前期纯化收集的重组人白蛋白样品用30KDa膜包置换缓冲液为40mM HAc-NaOH的平衡液体系,用平衡液平衡阳离子交换层析柱,样品中加入混合液,所述的混合液为脂肪酸混合物和泊洛沙姆的混合液;油酸、肉豆蔻酸、棕榈酸钠、硬脂酸钠和重组人白蛋白的摩尔比为0.3:0.3:0.3:0.5:1;之后进行上样层析分离,收集重组人白蛋白的组分;

步骤D:将上述步骤C收集的重组人白蛋白组分,用10KDa膜包置换成步骤A的平衡液体系,并采用步骤A的平衡液进行阴离子交换层析柱的平衡,采用相同的方法进行步骤A的上样纯化,收集重组人白蛋白组分。

3.如权利要求1或2所述的一种制备高纯度高稳定性蛋白质的方法,其特征在于,在步骤B和/或步骤D之后,还包含如下操作:在上述层析最终完成时,采用100KDa和/或30KDa和/或10KDa的膜包进行截留大分子聚集体和去除小分子物质,进行置换并浓缩为浓度大于20%的重组人白蛋白原液。

4.如权利要求1所述的一种制备高纯度高稳定性蛋白质的方法,其特征在于,阴离子交换层析为正向洗脱方式纯化,其中平衡液和洗脱液的pH均在6.0至9.5之间,本发明所述的方法,阴离子交换层析的条件中电导不高于20ms/cm;或者阴离子交换层析为反向洗脱方式纯化,其中平衡液pH在4.0至6.0之间,阴离子交换层析的条件中平衡电导不高于10ms/cm。

5.如权利要求1所述的一种制备高纯度高稳定性蛋白质的方法,其特征在于,阳离子交换层析的条件中平衡液pH在4.0至6.5之间;阳离子交换层析的条件中电导不高于10ms/cm。

6.如权利要求1所述的一种制备高纯度高稳定性蛋白质的方法,其特征在于,经前期纯化收集的重组人白蛋白样品为规模化生产的基因重组微生物表达人白蛋白。

一种制备高纯度高稳定性蛋白质的方法

技术领域

[0001] 本发明为采用添加中长链脂肪酸配体，通过阴离子或/和阳离子层析去除电荷异质性，获得高纯度重组人白蛋白的方法。

背景技术

[0002] 人白蛋白主要的药理作用包括：调节组织与血管间水分的动态平衡，维持正常与恒定的血浆容量；同时还对某些离子和化合物有较高亲和力，与这些物质可逆结合进而发挥转运功能；人白蛋白还为肌体提供了大量的氨基酸储备。

[0003] 由于人白蛋白的上述作用，使其可以应用于临床各学科，发挥多种治疗作用。人白蛋白临床主要用于调节血浆胶体渗透压、扩充血容量、治疗创伤性、出血性休克、严重烧伤及低蛋白血症；同时在中风，肝硬化肝腹水和肾病等常见疾病中都有着广泛的应用。除了直接在临床治疗领域，白蛋白还在疫苗生产所使用的培养基、药品辅料、诊断试剂、新型肿瘤长效制剂产品、化妆品、实验室生物试剂等多个方面都已经得到了极其广泛的应用。

[0004] 人白蛋白的结构是一个心型结构的单链非糖基化蛋白，有585个氨基酸，17对二硫键，一个自由巯基，分子量为66438道尔顿。人白蛋白在人体中的半衰期为19～21天。人白蛋白的心形结构由三个主要结构域和六个被17个二硫键包裹的亚结构域组成，它们通过范德华力松散地结合在一起。从其晶体结构可以看出，二硫化物桥赋予螺旋状的球状结构刚度，但提供足够的灵活性，使蛋白质能够根据周围介质的变化进行构象变化。

[0005] 人白蛋白常规的生产方法是从人血清中提取分离纯化出来，统称为人血清白蛋白。人血来源的人白蛋白受到血浆来源的数量限制和血浆供者的病毒污染以及个体抗体和蛋白差异的影响，其在临床使用中将存在较大的风险。因此，在很多国家的人血白蛋白使用说明书中都有病毒安全性声明，例如："为预防因使用人血或血浆制品导致的感染所采取的标准措施包括供血者选择、单次供血的筛选或血浆池特殊感染标记的筛选及灭活/去除病毒的有效生产步骤的采用。即便如此，当选用由血液或血浆制备的医药产品时，被传染性致病因子感染的可能性不能排除。这包括了未知的或新出现的病毒和其它病原体"。因此，采用基因重组的方法是有效获取无病毒污染的白蛋白最好途径。

[0006] 目前，最常用的可实现规模化生产的基因重组微生物表达人白蛋白的方式，主要是酵母表达系统，其中以酿酒酵母和毕赤酵母最为成熟。然而，由于人白蛋白属于大容量注射剂，每次注射的剂量可达到5克至30克。所以，必须要求每次注射剂量的总宿主蛋白残留和生产过程的污染物不得大于1ng/ml(200mg/ml-rHA)。不管采用何种方式进行重组人白蛋白的生产，其糖基化、氧化、多聚、错配和聚集等修饰后的重组白蛋白都可能对人体产生免疫毒性，还可能会对蛋白质的稳定性产生一定的影响。因此，高效特定的纯化方法是获得高纯度同质化均一化重组人白蛋白的工艺关键要素。

[0007] 专利WO1966/037515(CN 1198844C)中公开了一种在离子交换层析前加入如辛酸钠的中短链脂肪酸的方法，该方法可以在一定程度上去除糖基化修饰后的电荷异质性白蛋白。但是，辛酸钠的配体能力较弱，不能十分有效地去除错配、氧化和截短的电荷异质性白

蛋白。

[0008] 专利CN2019108743433公开了在重组白蛋白制剂中添加中长链脂肪酸或盐和微量的聚合物辅料的方法，以提高白蛋白制剂的稳定性，防止出现团聚和聚集的方法。但是，该方法无法选择性地去除疏水异质和电荷异质残缺、异构或后修饰的白蛋白，不能从源头上去除不稳定性的少量异质化白蛋白。

[0009] 本发明通过在精纯的离子交换层析前添加一定量的中长链脂肪酸以及脂肪酸盐以满足白蛋白的合理配体配比，辅助白蛋白的有效空间折叠，以展现出电荷异质性白蛋白电荷异质空间，在此条件下可以采用离子交换层析有效地去除重组白蛋白在发酵和纯化中产生的碎片和错配等不正确或后修饰结构的白蛋白。

[0010] 在本说明书中，术语“重组人白蛋白”也可以称为“重组白蛋白”和/或“重组人血清白蛋白”和/或“重组人血白蛋白”和/或“rHA”和/或“rHSA”。术语“人血清白蛋白”是指从人血清中提取出来的人白蛋白，也可以称为“人血白蛋白”和/或“HSA”和/或“HA”和/或“pdHSA”。本说明书中，术语：“中长链脂肪酸”是指碳链大于10的天然脂肪酸及其盐。

发明内容

[0011] 发明的目的：为了提供效果更好的一种制备高纯度高稳定性蛋白质的方法，具体目的见具体实施部分的多个实质技术效果。

[0012] 为了达到如上目的，本发明采取如下技术方案：

一种制备高纯度高稳定性蛋白质的方法，其特征在于，

包含如下步骤：

步骤A:将经前期纯化收集的重组人白蛋白样品用Millipore 10KDa膜包置换缓冲液为80mM PB pH 7.5的缓冲体系，样品收集液加入混合液，所述的混合液为脂肪酸混合物和泊洛沙姆的混合液；油酸、肉豆蔻酸、棕榈酸钠、硬脂酸钠和重组人白蛋白的摩尔比为0.3:0.3:0.3:0.5:1；

上样后，以纯化水将阴离子交换层析柱冲洗至中性，层析柱装柱高度380mm，用50mM PB pH 6.5洗脱液体系对吸附样品的层析柱进行洗脱，收集重组人白蛋白组分；

步骤B:阳离子交换层析用40mM HAc-NaOH的平衡液体系平衡层析柱，将收集的重组人白蛋白组分；采用Millipore 10KDa平板膜脱盐换液为阳离子交换层析平衡液体系，之后进行上样层析分离，收集重组人白蛋白的组分。

一种制备高纯度高稳定性蛋白质的方法，其特征在于，

包含如下步骤：

步骤C:将经前期纯化收集的重组人白蛋白样品用Millipore 10KDa膜包置换缓冲液为40mM HAc-NaOH的平衡液体系，用平衡液平衡阳离子交换层析柱，样品中加入混合液，所述的混合液为脂肪酸混合物和泊洛沙姆的混合液；油酸、肉豆蔻酸、棕榈酸钠、硬脂酸钠和重组人白蛋白的摩尔比为0.3:0.3:0.3:0.5:1；之后进行上样层析分离，收集重组人白蛋白的组分；

[0013] 步骤D:将上述步骤C收集的重组人白蛋白组分，用Millipore 10KDa膜包置换成步骤A的缓冲体系，并采用步骤A的平衡液进行阴离子交换层析柱的平衡，采用相同的方法进行步骤A的上样纯化，收集重组人白蛋白组分。

[0014] 本发明进一步技术方案在于，步骤B和/或步骤D之后，还包含如下操作：在上述层析最终完成时，采用100KDa和/或30KDa和/或10KDa的膜包进行截留大分子聚集体和去除小分子物质，进行置换并浓缩为浓度大于20％的重组人白蛋白原液。

[0015] 本发明进一步技术方案在于，阳离子交换介质包括但不限于SP强阳离子或CM弱阳离子交换介质，阳离子交换介质可选但不限于Uni-SP/CM系列、UniGel-SP/CM系列、NanoGel-SP系列、Nano-SP系列、Monomix-HC SP系列、Monomix-MC SP系列、GE公司的Sepharose系列或者博格隆生物技术有限公司的Bestarose系列；阴离子交换介质包括但不限于Q强阴离子或DEAE弱阴离子交换介质，阴离子交换介质可选但不限于Uni-DEAE/Q系列、UniGel-DEAE/Q系列、NanoGel-Q系列、Nano-Q系列、Monomix-HC DEAE/Q系列、Monomix-MC DEAE/Q系列、GE公司的Sepharose系列或者博格隆生物技术有限公司的Bestarose系列。

[0016] 本发明进一步技术方案在于，泊洛沙姆和重组白蛋白的重量比例为10-500微克泊洛沙姆/1克重组白蛋白；泊洛沙姆用于促进脂肪酸溶解。

[0017] 本发明进一步技术方案在于，阴离子交换层析为正向洗脱方式纯化，其中平衡液和洗脱液的pH均在6.0至9.5之间，本发明所述的方法，阴离子交换层析的条件中电导不高于20ms/cm；或者阴离子交换层析为反向洗脱方式纯化，其中平衡液pH在4.0至6.0之间，阴离子交换层析的条件中平衡电导不高于10ms/cm。

[0018] 本发明进一步技术方案在于，阴离子交换层析为正向洗脱方式纯化，优选平衡液和洗脱液的pH均在6.5至9.0之间；优选阴离子交换层析的条件中电导不高于15ms/cm；阴离子交换层析为反向洗脱方式纯化，优选平衡液pH在4.0至5.5之间，优选阴离子交换层析的条件中平衡电导不高于6ms/cm。

[0019] 本发明进一步技术方案在于，阳离子交换层析的条件中平衡液pH在4.0至6.5之间；阳离子交换层析的条件中电导不高于10ms/cm。

[0020] 本发明进一步技术方案在于，优选阳离子交换层析的条件中平衡液pH在4.5至6.0之间；优选阳离子交换层析的条件中电导不高于5ms/cm。

[0021] 本发明进一步技术方案在于，经前期纯化收集的重组人白蛋白样品为规模化生产的基因重组微生物表达人白蛋白。

[0022] 采用如上技术方案的本发明，相对于现有技术有如下有益效果：本发明的独特之处第一在于油酸、肉豆蔻酸、棕榈酸钠、硬脂酸钠和重组人白蛋白的摩尔比为0.3:0.3:0.3:0.5:1；即长链脂肪酸以及脂肪酸盐：人重组白蛋白的摩尔比为：0.1～3:1之间；序贯使用离子交换层析可以有效地去除重组白蛋白中的截断的白蛋白、错配或修饰的白蛋白，这些组分在临床中可能会出现对人体的副作用或者影响半衰期和药效。

[0023] 本发明的独特之处第二还在于，通过在精纯的离子交换层析前加入中长链脂肪酸以及脂肪酸盐，可以通过离子交换选择性地保留有效的脂肪酸配体比例，通过离子交换去除因白蛋白结构修饰或折叠错误出现疏水异质后的配体比例过多或过少的组分，获得高纯度高稳定性的人白蛋白样品。

附图说明

[0024] 为了进一步说明本发明，下面结合附图进一步进行说明：

图1进行实施例1前的样品电荷异质性检测图谱和进行实施例1、实施2顺序纯化后

的样品电荷异质性检测图谱对比图;图1纵坐标为吸收值(mAU),横坐标为时间轴(min);

图2加速稳定性实验,DLS(动态光散射仪)检测测试样品在0时、1个月、3个月时的粒径分布情况;图2纵坐标为分布百分比;横坐标是分子直径(nm);

图3长期稳定性实验,DLS(动态光散射仪)检测测试样品在0时、12个月、24个月、36个月时的粒径分布情况;图3纵坐标为分布百分比;横坐标是分子直径(nm)。

具体实施方式

[0025] 下面结合附图和具体实施方式,进一步阐明本发明,应理解下述具体实施方式仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。

[0026] 本发明的发酵规模在10L、20L、3,000L和10,0000L设备上进行的实施,纯化规模分别在柱直径10cm、45cm、120cm的规模实施,其线性放大良好。本实施例包括但不限制于以上规模。以下实施例结合附图可进一步理解本发明的特点和优势,不以任何方式限制本发明解释的其余内容。

[0027] 实施例1阴离子交换色谱层析

将经前期纯化收集的重组人白蛋白样品用Millipore 10KDa膜包置换缓冲液为80mM PB pH 7.5的平衡液体系,样品收集液加入油酸、肉豆蔻酸、棕榈酸钠、硬脂酸钠和泊洛沙姆的混合液,脂肪酸终浓度分别为0.3:0.3:0.3:0.5:1摩尔比(油酸:肉豆蔻酸:棕榈酸钠:硬脂酸钠:重组人白蛋白)。上样后,以纯化水将UniGel-DEAE层析柱(装柱高度380mm)冲洗至中性。用50mM PB pH 6.5洗脱液体系对吸附样品的层析柱进行洗脱,收集重组人白蛋白组分。

[0028] 实施例2阳离子交换色谱层析

阳离子交换层析采用博格隆(上海)生物技术有限公司的SP Bestarose FF填料(该填料等同于GE SP Sepharose Fast Flow填料)。用40mM HAc-NaOH的平衡液体系平衡层析柱,将实施例1收集重组人白蛋白溶液,采用millipore10KDa平板膜脱盐换液为平衡液体系,之后进行上样层析分离,收集重组人白蛋白的组分。

[0029] 实施例3阳离子交换层析与阴离子交换色谱层析互换

本实施例为先进行实施例2,将经前期纯化收集的重组人白蛋白样品用Millipore 10KDa膜包进行置换至实施例2的缓冲体系,补充油酸、肉豆蔻酸、棕榈酸钠、硬脂酸钠和泊洛沙姆的混合液,脂肪酸终浓度分别为0.3:0.3:0.3:0.5:1摩尔比(油酸:肉豆蔻酸:棕榈酸钠:硬脂酸钠:重组人白蛋白)。按实施例2相同的方法进行,收集重组人白蛋白组分。

[0030] 将上述收集的重组人白蛋白组分,用Millipore 30KDa膜包置换成实施例1的平衡液体系,并进行柱平衡,采用相同的方法进行实施例1纯化,上样和收集重组人白蛋白组分。

[0031] 在上述层析最终完成时,可采用100KDa和/或30KDa和/或10KDa的膜包进行截留大分子聚集体和去除小分子物质,进行置换并浓缩为浓度大于20%的重组人白蛋白原液。对进行实施例1前的样品,和进行实施例1、实施例2后的样品进行电荷异质性检测。

[0032] 电荷异质性检测方法参照《中国药典》2020年四部通则0513离子色谱法,测定重组人白蛋白中电荷异质体,检测结果如下(图1);

实施例4加速稳定性实验

本实施例为经实施例2纯化后蛋白溶液,在最终完成原液生产后,进行了重组人白

蛋白注射剂配制;其注射剂样品按照温度25℃±2℃、湿度60%±5%条件,进行加速试验测试,一般考察至6个月,测试结果(表一,表二),附图(图1)。

[0033] 实施例5长期稳定性实验

本实施例为经实施例2纯化后蛋白溶液,在最终完成原液生产后,进行了重组人白蛋白注射剂配制;其注射剂样品按照温度5℃±3℃条件,进行长期稳定性测试,考察测试一般为:第一年每三个月检测,如0、3、6、9、12个月;第二年每六个月检测,如18、24个月;之后每年检测,如36个月。测试结果(表三,表四),附图(图3);

检测结果表一:

样品考察时间点	外观	纯度 Native-PAGE 法	多聚体 HPLC-SEC 法
1 个月	略粘稠，黄棕色澄明液体，未出现浑浊	100%	0.7%
2 个月	略粘稠，黄棕色澄明液体，未出现浑浊	100%	0.7%
3 个月	略粘稠，黄棕色澄明液体，未出现浑浊	100%	0.7%
6 个月	略粘稠，黄棕色澄明液体，未出现浑浊	100%	0.8%

表二:DSC检测测试样品在0时、3个月时,样品的T_{onset}、T_{m1}、T_{m2}变化。

样品序列	T_{onset}(℃)	T_{m1}(℃)	T_{m2}(℃)
0时	63.54	68.52	74.62
3个月	63.55	68.53	74.64

[0034] 图2DLS检测测试样品在0时、1个月、3个月时的粒径分布情况,经过加速稳定性实验样品粒径分布未出现明显变化。

[0035] 检测结果表三:

样品考察时间点	外观	纯度 Native-PAGE 法	多聚体 HPLC-SEC 法
3 个月	略粘稠，黄棕色澄明液体，未出现浑浊	100%	0.7%
6 个月	略粘稠，黄棕色澄明液体，未出现浑	100%	0.7%

	浊		
9 个月	略粘稠，黄棕色澄明液体，未出现浑浊	100%	0.7%
12 个月	略粘稠，黄棕色澄明液体，未出现浑浊	100%	0.7%
18 个月	略粘稠，黄棕色澄明液体，未出现浑浊	100%	0.7%
24 个月	略粘稠，黄棕色澄明液体，未出现浑浊	100%	0.7%
36 个月	略粘稠，黄棕色澄明液体，未出现浑浊	100%	0.8%

表四:DSC检测测试样品在0时、36个月时,样品的T_{onset}、T_{m1}、T_{m2}变化。

样品序列	T_{onset}(℃)	T_{m1}(℃)	T_{m2}(℃)
0时	63.54	68.52	74.62
36个月	63.56	68.55	74.66

[0036] 图3DLS检测测试样品在0时、12个月、24个月、36个月时的粒径分布情况,经过长期稳定性实验样品粒径分布未出现明显变化。

[0037] 总的来说,本发明提供了重组白蛋白纯化中间品条件下,添加一定量的中长链脂肪酸以及脂肪酸盐,通过离子交换层析去除重组白蛋白在发酵和纯化中产生的碎片和错配等不正确结构的蛋白质。本发明的方法是将经纯化的重组人白蛋白溶液,通过阳离子交换层析、阴离子交换层析等手段进行纯化。

[0038] 1)阴离子交换层析;

2)阳离子交换层析。

[0039] 本发明的阳离子交换介质为SP系列,或者是CM系列阳离子交换介质可选但不限于Uni-SP/CM系列、UniGel-SP/CM系列、NanoGel-SP系列、Nano-SP系列、Monomix-HC SP系列、Monomix-MC SP系列、GE公司的Sepharose系列或者博格隆生物技术有限公司的Bestarose系列。

[0040] 本发明的阴离子交换层析的介质为DEAE系列,或者是强阴离子的Q系列,,阴离子交换介质可选但不限于Uni-DEAE/Q系列、UniGel-DEAE/Q系列、NanoGel-Q系列、Nano-Q系列、Monomix-HC DEAE/Q系列、Monomix-MC DEAE/Q系列、GE公司的Sepharose系列或者博格隆生物技术有限公司的Bestarose系列。

[0041] 长链脂肪酸的添加可以通过在阴离子交换层析前添加,或者在阳离子交换层析前补充。

[0042] 本发明层析步骤之间的置换缓冲液和浓缩,可以采用分离孔径在分子量1KDa到30KDa之间的中空纤维膜和平板膜包等装置与设备实施,包括但不限制于使用顺序和交叉使用。

[0043] 本发明的层析步骤之间的置换缓冲液，也可以采用Sephadex G25或Superdex G75进行换液处理。

[0044] 本发明实施后获得的高度电荷一致性和疏水一致性的重组白蛋白制剂可以有效地按照中国药典(2020年版)或美国药典(USP39)的处方就可以达到57℃条件下50小时放置的稳定要求，还可以在25℃或30℃条件下稳定存放30天以上。

[0045] 本发明所述的泊洛沙姆选自泊洛沙姆124、泊洛沙姆188、泊洛沙姆237、泊洛沙姆338、和泊洛沙姆407中的一种或多种。

[0046] 本发明方法得到高纯度重组人白蛋白，可应用于人血来源的血清白蛋白相同的临床适应症。

[0047] 本发明方法得到高纯度重组人白蛋白，可应用于诊断试剂、培养基和药用辅料。

[0048] 本发明采用的分离介质包括但不限于聚丙烯酸酯或聚苯乙烯-二乙烯基苯聚合组成的10μm至150μm之间的亲水改性微球接枝的离子交换介质，也可以是Sepharose 6FF，或者是接枝侧链的长度和以上两种聚合物基材或琼脂糖基质的任何一种。

[0049] 本发明采用柱床高度，装填在100mm至800mm之间。优选250mm至600mm之间。

[0050] 本发明的所述的色谱层析条件可按照通用的指导手册进行一定的调节和变更。

[0051] 本发明所述的色谱层析之间可以采用其他一些常规的方法进行透析、超滤和巴氏灭活等步骤，不影响本发明的实施效果。

[0052] 本发明的层析最终完成后，可采用100KDa和/或30KDa和/或10KDa的膜包进行截留大分子聚集体和去除小分子物质，置换并浓缩为大于制剂浓度的重组人白蛋白原液。

[0053] 本发明中所述的表达宿主细胞为酵母，包含糖酵母属系的酿酒酵母，克鲁维酵母属系、汉逊酵母属系和毕赤酵母属系。

[0054] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本领域的技术人员应该了解本发明不受上述实施例的限制，上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理，在不脱离本发明精神和范围的前提下，本发明还会有各种变化和改进，这些变化和改进都落入要求保护的范围内。

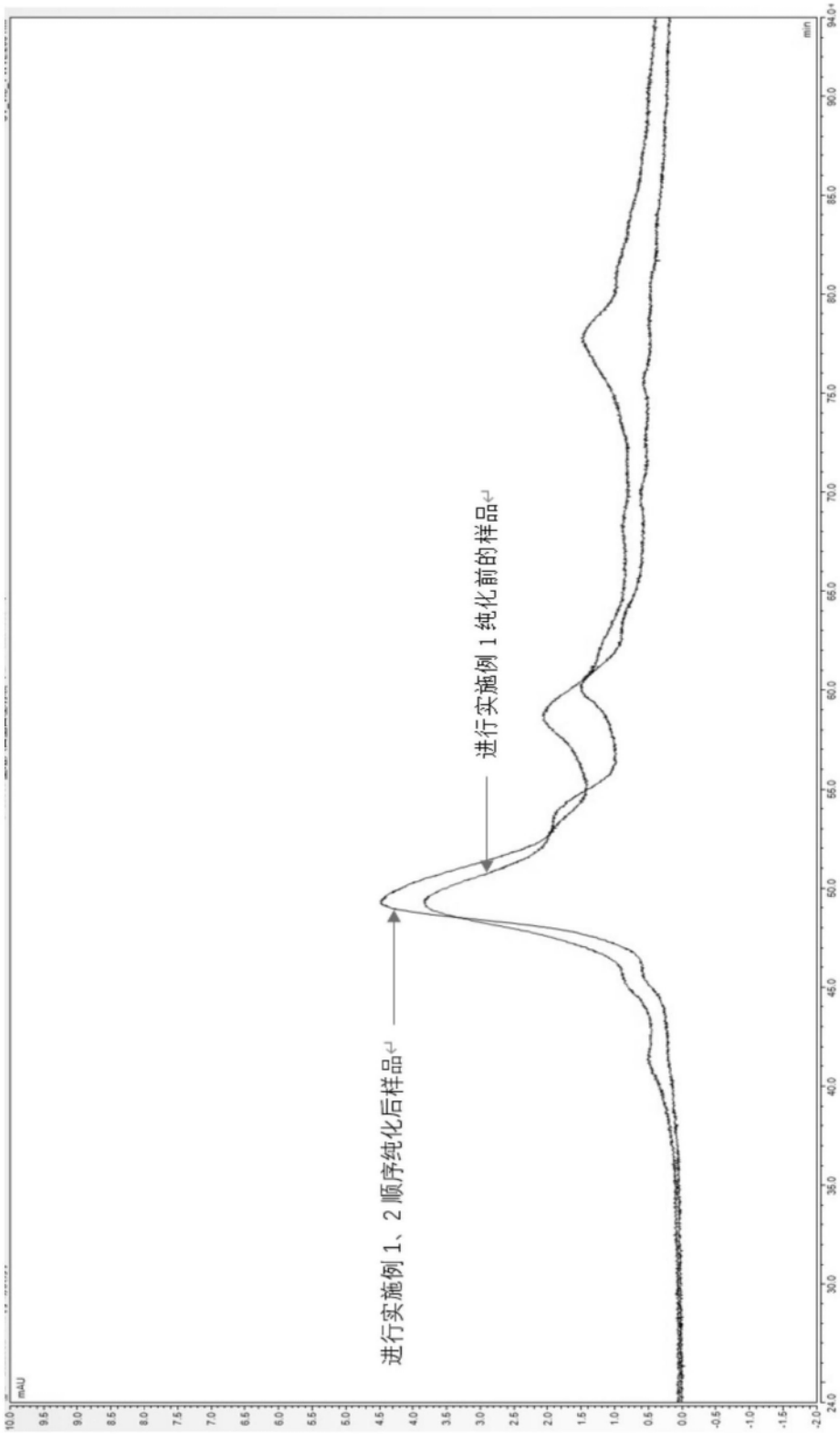


图1

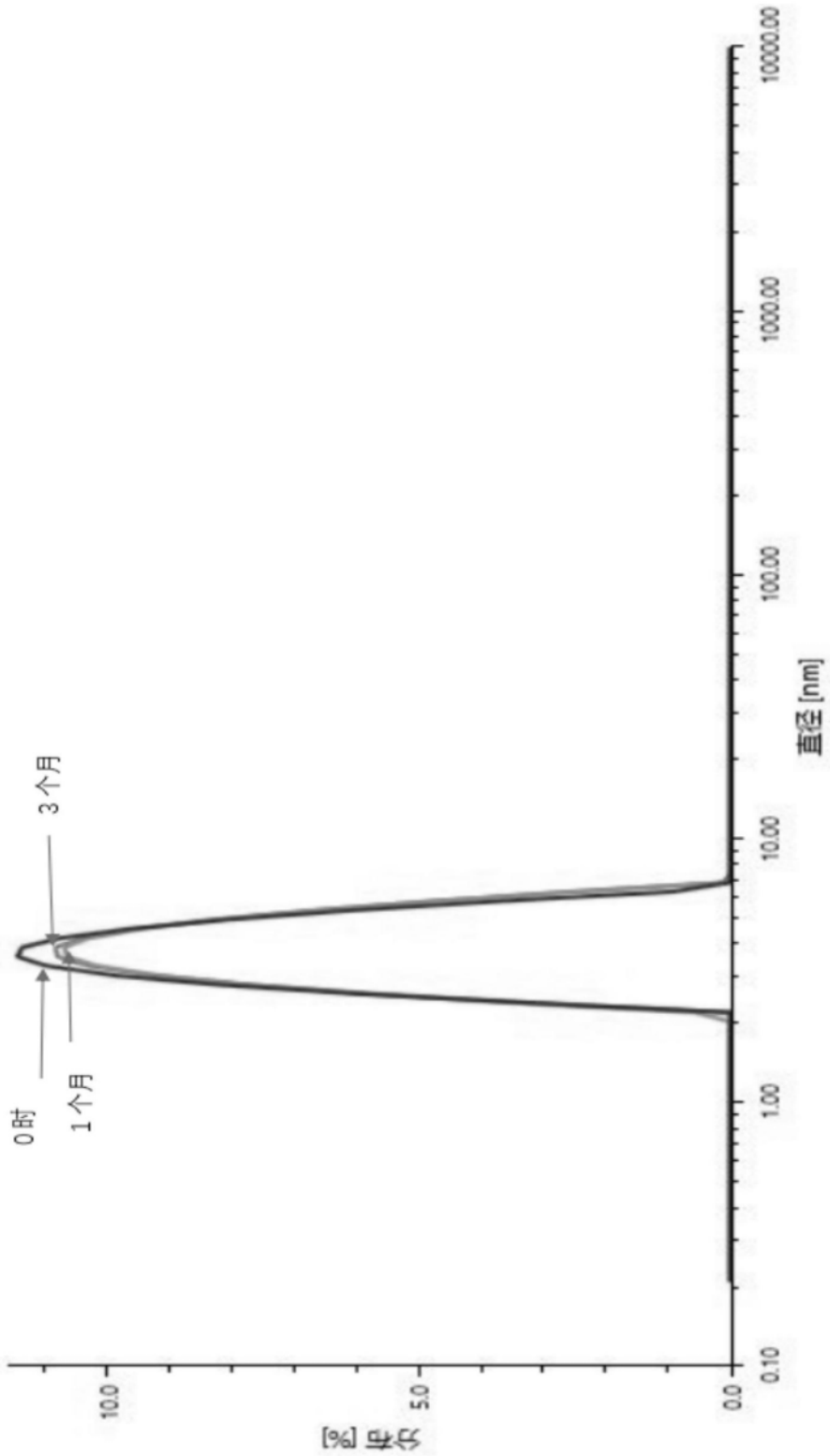


图2

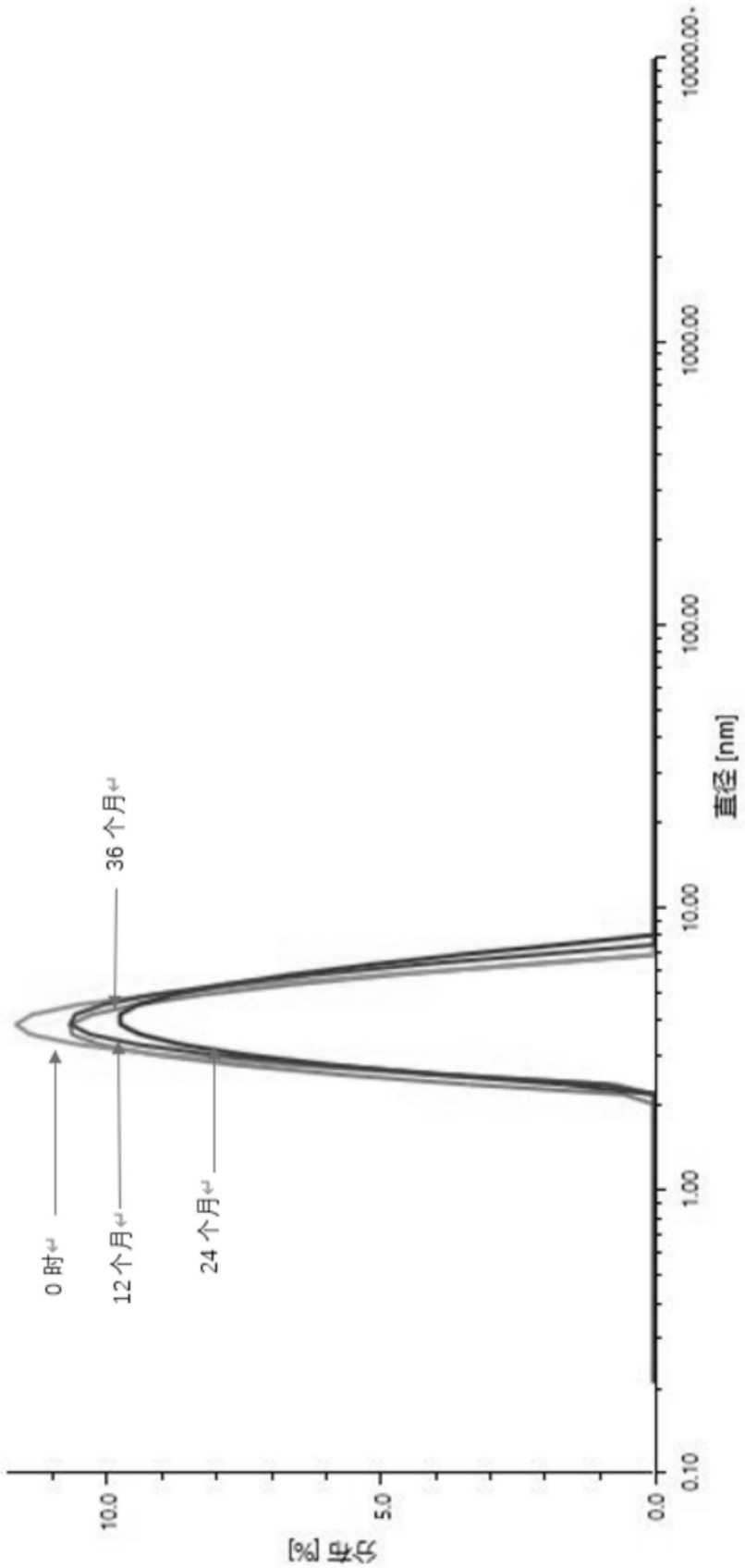

0 时
12 个月
24 个月
36 个月
分布 [%]
10.0
5.0
0.0
0.10
1.00
10.00
100.00
1000.00
10000.00
直径 [nm]

图3