

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380107863.9

[51] Int. Cl.

C07K 17/00 (2006.01)

A23J 1/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 2 月 8 日

[11] 公开号 CN 1732185A

[22] 申请日 2003.10.28

[21] 申请号 200380107863.9

[30] 优先权

[32] 2002.11.19 [33] US [31] 10/300,233

[86] 国际申请 PCT/US2003/034205 2003.10.28

[87] 国际公布 WO2004/046311 英 2004.6.3

[85] 进入国家阶段日期 2005.6.28

[71] 申请人 陶洛斯 HSA 有限责任公司

地址 美国马萨诸塞

[72] 发明人 K·维苏里 S·尤奥迪拉

S·P·弗尔顿 D·E·考托

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 赵艳华

权利要求书 18 页 说明书 49 页 附图 14 页

[54] 发明名称

结晶人血清白蛋白的方法

[57] 摘要

本发明涉及通过结晶和重复的结晶从各种来源纯化和生产人白蛋白。本发明方法的基本特征包括提供特定的反应条件和沉淀试剂以使白蛋白结晶最大化。利用溶解度图作为本发明方法的过程控制的基础。本发明特别地控制磷酸盐浓度、pH 和温度以精确指导结晶动力学和晶体产率。

1. 一种晶体人白蛋白产品,该产品包含至少一部份由如下方法得到的物质:

a) 浓缩含白蛋白的流体,直到所述流体具有每升溶液至少 15 克白蛋白;

b) 向所述含白蛋白的流体中添加第一磷酸盐混合物,直到所述磷酸盐混合物的浓度在 2.4-2.6 摩尔的范围内;

c) 提供所述含白蛋白的溶液的第一次过滤以致形成所得的结晶批料溶液以去除杂质;

d) 冷却所述结晶批料溶液的滤液至至多 15℃ 的温度;

e) 让所述结晶批料溶液中的人白蛋白结晶;

f) 向所述结晶批料溶液中添加更多的所述第一磷酸盐混合物,足以达到至多 3.0 摩尔的浓度;

g) 从任何剩下流体中进行白蛋白晶体的第一次分离;

h) 将来自所述第一次白蛋白晶体分离的白蛋白晶体悬浮在第二磷酸盐混合物中,其中所述第二磷酸盐混合物具有 2.7-3.0 M 的浓度;

i) 加热来自所述第一次白蛋白晶体分离的晶体悬浮液达到温度在 40-50℃ 的范围内以溶解晶体;

j) 对来自所述白蛋白晶体的第一次分离的溶解的晶体悬浮液提供第二次过滤;

k) 冷却来自所述白蛋白晶体的第一次分离的所得到的溶解的晶体悬浮液至至多 15℃ 的温度; 和

l) 让白蛋白晶体从所得到的冷却的晶体悬浮液中形成;

其中这些特定步骤的应用允许人白蛋白从给定的含有人白蛋白的原料流中纯化和结晶。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述第一磷酸盐混合物由磷酸钠盐组成。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述第一磷酸盐混合物是磷酸钾盐。

4. 权利要求 1 的方法, 其中所述第一磷酸盐混合物由钠盐和钾盐组成。

5. 权利要求 1 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有在一升溶液中 15-50 克范围内白蛋白的浓度。

6. 权利要求 1 的方法, 其中在添加时所述第一磷酸盐混合物的温度在 20-30℃ 的范围内。

7. 权利要求 1 的方法, 其中在添加时所述第一磷酸盐混合物具有 6.0-6.7 范围内的 pH。

8. 权利要求 1 的方法, 其中将过滤所述结晶批料后收集的所述滤液的温度冷却至至多 10℃。

9. 权利要求 1 的方法, 其中使所述结晶批料溶液结晶至多 12 小时。

10. 权利要求 1 的方法, 其中使所述结晶批料溶液结晶至多 24 小时。

11. 权利要求 1 的方法, 其中使所述结晶批料溶液结晶至少 24 小时。

12. 权利要求 1 的方法, 其中通过过滤完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

13. 权利要求 1 的方法, 其中通过离心完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

14. 权利要求 1 的方法, 其中通过重力完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

15. 权利要求 1 的方法, 其中通过干燥完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

17. 权利要求 1 的方法, 其中所述第二磷酸盐混合物由磷酸钠盐组成。

18. 权利要求 1 的方法, 其中所述第二磷酸盐混合物是磷酸钾盐。

19. 权利要求 1 的方法, 其中所述第二磷酸盐混合物由钠盐和钾盐组成。

20. 权利要求 1 的方法, 其中将来自白蛋白晶体的第一次分离的所述溶解的晶体悬浮液冷却至至多 10℃ 的温度。

21. 权利要求 20 的方法, 其中将从所述溶解的晶体悬浮液中沉淀出来的白蛋白晶体再溶解成溶液并且重结晶至少一次。

22. 权利要求 1 的方法, 其中预先将所述含白蛋白的流体澄清以去除杂质不在溶液中。

23. 权利要求 1 的方法, 其中所述原料流是来自转基因哺乳动物的乳汁或其它体液。

24. 权利要求 23 的方法, 其中将来自转基因哺乳动物的乳汁澄清以去除杂质和一些乳汁蛋白质。

25. 权利要求 23 的方法, 其中在给定原料流中纯度的水平是至少 10%, 也就是, 其中人白蛋白构成给定溶液总蛋白质的至少 10%。

26. 权利要求 1 的方法, 其中所述得到的结晶批料溶液的 pH 是 5.6-7.8。

27. 权利要求 1 的方法, 其中所述得到的结晶批料溶液的 pH 是 6.0-6.5。

28. 权利要求 1 的方法, 其中所述得到的结晶批料溶液的 pH 是 7.0-7.8。

29. 权利要求 1 的方法, 其中所述第一磷酸盐混合物的浓度具有 2.2-3.0 M 范围内的浓度。

30. 权利要求 1 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 2-400 克范围内的白蛋白浓度。

31. 权利要求 1 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 3-300 克范围内的白蛋白浓度。

32. 权利要求 1 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 3-100 克范围内的白蛋白浓度。

33. 权利要求 1 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 3-40 克范围内的白蛋白浓度。

34. 权利要求 1 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液

2-10 克范围内的白蛋白浓度。

35. 权利要求 1 的方法，其中将所述结晶人白蛋白产品用作药物制剂中的赋形剂。

36. 权利要求 1 的方法，其中将所述结晶人白蛋白产品用作药物组合物中的治疗剂。

37. 权利要求 1 的方法，其中所述原料流是来源于表达重组人白蛋白的宿主的培养上清液或体液。

38. 权利要求 37 的方法，其中所述宿主是哺乳动物细胞培养物。

39. 权利要求 37 的方法，其中所述宿主是酵母细胞培养物。

40. 权利要求 37 的方法，其中所述宿主是昆虫细胞培养物。

41. 权利要求 37 的方法，其中所述宿主是原核细胞培养物。

42. 权利要求 1 的方法，其中将所述结晶人白蛋白产品用于治疗医学疾病。

43. 权利要求 42 的方法，其中所述医学疾病选自：

- a) 水肿；
- b) 低血容量症；
- c) 血清蛋白减少；
- d) 成人呼吸窘迫综合征（ARDS）；
- e) 肾变病；
- f) 新生儿溶血性疾病（HDN）；
- g) 严重烧伤；
- h) 低蛋白血症；和
- i) 急性胰腺炎。

44. 权利要求 1 的方法，其中在心肺分流外科手术期间使用所述结晶人白蛋白产品。

45. 一种生产结晶人白蛋白的方法，该方法包括：

- a) 浓缩含白蛋白的流体，直到所述流体具有每升溶液至少 15 克白蛋白；
- b) 向所述含白蛋白的流体中添加第一磷酸盐混合物，直到所述磷

酸盐混合物的浓度在 2.4-2.6 摩尔的范围内;

c) 提供所述含白蛋白的溶液的第一次过滤以致形成所得的结晶批料溶液以去除杂质;

d) 冷却所述结晶批料溶液的滤液至至多 15℃ 的温度;

e) 使所述结晶批料溶液中的人白蛋白结晶;

f) 向所述结晶批料溶液中添加更多的所述第一磷酸盐混合物, 足以达到至多 3.0 摩尔的浓度;

g) 从任何剩下流体中进行白蛋白晶体的第一次分离;

h) 将来自所述第一次白蛋白晶体分离的白蛋白晶体悬浮在第二磷酸盐混合物中, 其中所述第二磷酸盐混合物具有 2.7-3.0 M 的浓度;

i) 加热来自第一次白蛋白晶体分离的晶体悬浮液直到温度在 40-50℃ 的范围内以溶解晶体;

j) 对来自所述白蛋白晶体的第一次分离的溶解的晶体悬浮液提供第二次过滤;

k) 冷却来自所述白蛋白晶体的第一次分离的所得到的溶解的晶体悬浮液; 和

l) 使白蛋白晶体从所得到的冷却的晶体悬浮液中形成;

其中这些特定步骤的应用允许人白蛋白从给定的含有人白蛋白的原料流中纯化和结晶。

46. 权利要求 45 的方法, 其中所述第一磷酸盐混合物由磷酸钠盐组成。

47. 权利要求 45 的方法, 其中所述第一磷酸盐混合物是磷酸钾盐。

48. 权利要求 45 的方法, 其中所述第一磷酸盐混合物由钠盐和钾盐组成。

49. 权利要求 45 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有在一升溶液中 15-50 克范围内白蛋白的浓度。

50. 权利要求 45 的方法, 其中在添加时所述第一磷酸盐混合物的温度在 20-30℃ 的范围内。

51. 权利要求 45 的方法, 其中在添加时所述第一磷酸盐混合物具有 6.0-6.7 范围内的 pH。

52. 权利要求 45 的方法, 其中将过滤所述结晶批料后收集的所述滤液的温度冷却至至多 10℃。

53. 权利要求 45 的方法, 其中允许所述结晶批料溶液结晶至多 12 小时。

54. 权利要求 45 的方法, 其中允许所述结晶批料溶液结晶至多 24 小时。

55. 权利要求 45 的方法, 其中允许所述结晶批料溶液结晶至少 24 小时。

56. 权利要求 45 的方法, 其中通过过滤完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

57. 权利要求 45 的方法, 其中通过离心完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

58. 权利要求 45 的方法, 其中通过重力完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

59. 权利要求 45 的方法, 其中通过干燥完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

60. 权利要求 45 的方法, 其中所述第二磷酸盐混合物由磷酸钠盐组成。

61. 权利要求 45 的方法, 其中所述第二磷酸盐混合物是磷酸钾盐。

62. 权利要求 45 的方法, 其中所述第二磷酸盐混合物由钠盐和钾盐组成。

63. 权利要求 45 的方法, 其中将来自白蛋白晶体的所述第一次分离的所述溶解的晶体悬浮液冷却至至多 10℃ 的温度。

64. 权利要求 63 的方法, 其中将从所述溶解的晶体悬浮液中沉淀出来的白蛋白晶体再溶解成溶液并且重结晶至少一次。

65. 权利要求 45 的方法, 其中预先将所述含白蛋白的流体澄清以

去除杂质不在溶液中。

66. 权利要求 45 的方法，其中所述原料流是来自转基因哺乳动物的乳汁或其它体液。

67. 权利要求 66 的方法，其中将来自转基因哺乳动物的乳汁澄清以去除杂质和一些乳汁蛋白质。

68. 权利要求 66 的方法，其中在给定原料流中纯度的水平是至少 10%，也就是，其中人白蛋白构成给定溶液总蛋白质的至少 10%。

69. 权利要求 45 的方法，其中所述得到的结晶批料溶液的 pH 是 5.6-7.8。

70. 权利要求 45 的方法，其中所述得到的结晶批料溶液的 pH 是 6.0-6.5。

71. 权利要求 45 的方法，其中所述得到的结晶批料溶液的 pH 是 7.0-7.8。

72. 权利要求 45 的方法，其中所述第一磷酸盐混合物的浓度具有 2.2-3.0 M 范围内的浓度。

73. 权利要求 45 的方法，其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 2-400 克范围内的白蛋白浓度。

74. 权利要求 45 的方法，其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 3-300 克范围内的白蛋白浓度。

75. 权利要求 45 的方法，其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 3-100 克范围内的白蛋白浓度。

76. 权利要求 45 的方法，其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 3-40 克范围内的白蛋白浓度。

77. 权利要求 45 的方法，其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 2-10 克范围内的白蛋白浓度。

78. 权利要求 45 的方法，其中将所述结晶人白蛋白产品用作药物制剂中的赋形剂。

79. 权利要求 45 的方法，其中将所述结晶人白蛋白产品用作药物组合物中的治疗剂。

80. 权利要求 45 的方法, 其中所述原料流是来源于表达重组人白蛋白的宿主的培养上清液或体液。

81. 权利要求 80 的方法, 其中所述宿主是哺乳动物细胞。

82. 权利要求 80 的方法, 其中所述宿主是酵母细胞。

83. 权利要求 80 的方法, 其中所述宿主是昆虫细胞。

84. 权利要求 80 的方法, 其中所述宿主是原核细胞。

85. 权利要求 45 的方法, 其中将所述结晶人白蛋白产品用于治疗医学疾病。

86. 权利要求 85 的方法, 其中所述医学疾病选自:

- a) 水肿;
- b) 低血容量症;
- c) 血清蛋白减少;
- d) 成人呼吸窘迫综合征 (ARDS);
- e) 肾变病;
- f) 新生儿溶血性疾病 (HDN);
- g) 严重烧伤;
- h) 低蛋白血症; 和
- i) 急性胰腺炎。

87. 权利要求 85 的方法, 其中在心肺分流外科手术期间使用所述结晶人白蛋白产品。

88. 一种人白蛋白产品, 该产品包含至少一部份由如下方法形成的物质:

a) 浓缩含白蛋白的流体, 直到所述流体具有每升溶液至少 15 克白蛋白;

b) 向所述含白蛋白的流体中添加第一磷酸盐混合物, 直到所述磷酸盐混合物的浓度在 2.6-3.0 摩尔的范围内并且 pH 在 6.1-6.3 的范围内;

c) 冷却所述结晶批料溶液的所得滤液至至多 15℃ 的温度;

d) 使所述结晶批料溶液中的人白蛋白结晶; 和

e) 从任何剩下的流体中分离白蛋白晶体;

其中这些特定步骤的应用允许人白蛋白从给定的含有人白蛋白的原料流中纯化和结晶。

89. 权利要求 88 的方法, 其中所述第一磷酸盐混合物由磷酸钠盐组成。

90. 权利要求 88 的方法, 其中所述第一磷酸盐混合物是磷酸钾盐。

91. 权利要求 88 的方法, 其中所述第一磷酸盐混合物由钠盐和钾盐组成。

92. 权利要求 88 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有在一升溶液中 15-50 克范围内白蛋白的浓度。

93. 权利要求 88 的方法, 其中在添加时所述第一磷酸盐混合物的温度在 20-30℃ 的范围内。

94. 权利要求 88 的方法, 其中允许所述结晶批料溶液结晶至多 12 小时。

95. 权利要求 88 的方法, 其中允许所述结晶批料溶液结晶至多 24 小时。

96. 权利要求 88 的方法, 其中允许所述结晶批料溶液结晶至少 24 小时。

97. 权利要求 88 的方法, 其中通过过滤完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

98. 权利要求 88 的方法, 其中通过离心完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

99. 权利要求 88 的方法, 其中通过重力完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

100. 权利要求 88 的方法, 其中通过干燥完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

101. 权利要求 88 的方法, 其中将从所述溶解的晶体悬浮液中沉淀出来的白蛋白晶体再溶解成溶液并且重结晶至少一次。

102. 权利要求 88 的方法, 其中预先将来自所述原料流的所述含人白蛋白的流体澄清以去除杂质不在溶液中。

103. 权利要求 88 的方法, 其中所述原料流是来自转基因哺乳动物的乳汁或其它体液。

104. 权利要求 103 的方法, 其中将来自转基因哺乳动物的乳汁澄清以去除杂质和一些乳汁蛋白质。

105. 权利要求 103 的方法, 其中在给定原料流中纯度的水平是至少 10%, 也就是, 其中人白蛋白构成给定溶液总蛋白质的至少 10%。

106. 权利要求 88 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 2-400 克范围内的白蛋白浓度。

107. 权利要求 88 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 3-300 克范围内的白蛋白浓度。

108. 权利要求 88 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 3-100 克范围内的白蛋白浓度。

109. 权利要求 88 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 3-40 克范围内的白蛋白浓度。

110. 权利要求 88 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 2-10 克范围内的白蛋白浓度。

111. 权利要求 88 的方法, 其中将所述结晶人白蛋白产品用作药物制剂中的赋形剂。

112. 权利要求 88 的方法, 其中将所述结晶人白蛋白产品用作药物组合物中的治疗剂。

113. 权利要求 88 的方法, 其中所述原料流是来源于表达重组人白蛋白的宿主的培养上清液或体液。

114. 权利要求 113 的方法, 其中所述宿主是哺乳动物细胞培养物。

115. 权利要求 113 的方法, 其中所述宿主是转基因哺乳动物。

116. 权利要求 113 的方法, 其中所述宿主是转基因鸟。

117. 权利要求 113 的方法, 其中所述宿主是转基因植物。

118. 权利要求 113 的方法, 其中所述宿主是酵母细胞培养物。
119. 权利要求 113 的方法, 其中所述宿主是昆虫细胞培养物。
120. 权利要求 113 的方法, 其中所述宿主是原核细胞培养物。
121. 权利要求 88 的方法, 其中将所述结晶人白蛋白产品用于治疗医学疾病。

122. 权利要求 121 的方法, 其中所述医学疾病选自:

- a) 水肿;
- b) 低血容量;
- c) 血清蛋白减少;
- d) 成人呼吸窘迫综合征 (ARDS);
- e) 肾变病;
- f) 新生儿溶血性疾病 (HDN);
- g) 严重烧伤;
- h) 低蛋白血症; 和
- i) 急性胰腺炎。

123. 权利要求 88 的方法, 其中在心肺分流外科手术期间使用所述结晶人白蛋白产品。

124. 权利要求 88 的方法, 其中通过一个或多个重结晶步骤进一步纯化所述白蛋白晶体, 所述步骤包括:

- a) 将来自第一次白蛋白晶体分离的白蛋白晶体悬浮在第二磷酸盐混合物中, 其中所述第二磷酸盐混合物具有 2.7-3.0 M 的浓度并且 6.1-6.3 范围内的 pH;
- b) 加热来自第一次白蛋白晶体分离的晶体悬浮液直到温度在 40-50℃ 的范围内以溶解晶体;
- c) 对来自所述白蛋白晶体的第一次分离的溶解的晶体悬浮液提供第二次过滤;
- d) 冷却来自所述白蛋白晶体的第一次分离的所得到的溶解的晶体悬浮液至至多 15℃ 的温度;
- e) 让白蛋白晶体从所得到的冷却的晶体悬浮液中形成; 和

f) 从任何剩下流体中分离白蛋白晶体;

其中这些特定步骤的应用允许人白蛋白从给定的原料流中纯化和结晶。

125. 权利要求 124 的方法, 其中所述第二磷酸盐混合物由磷酸钠盐组成。

126. 权利要求 124 的方法, 其中所述第二磷酸盐混合物是磷酸钾盐。

127. 权利要求 124 的方法, 其中所述第二磷酸盐混合物由钠盐和钾盐组成。

128. 一种人白蛋白产品, 该产品包含至少一部份由如下方法得到的物质:

a) 浓缩含白蛋白的流体, 直到所述流体具有每升溶液至少 15 克白蛋白;

b) 向所述含白蛋白的流体中添加第一磷酸盐混合物, 直到所述磷酸盐混合物的浓度为至多 2.6 摩尔并且 pH 在 6.1-6.3 的范围内;

c) 提供所述含白蛋白的溶液的第一次过滤以致形成所得的结晶批料溶液以去除杂质;

d) 冷却所述结晶批料溶液的所得滤液至至多 15℃ 的温度;

e) 向所述结晶批料溶液中添加更多的所述第一磷酸盐混合物, 足以达到至多 3.0 摩尔的浓度;

f) 让所述结晶批料溶液中的人白蛋白结晶; 和

g) 从任何剩下流体分离白蛋白晶体;

其中这些特定步骤的应用允许人白蛋白从给定的原料流中纯化和结晶。

129. 权利要求 128 的方法, 其中所述第一磷酸盐混合物由磷酸钠盐组成。

130. 权利要求 128 的方法, 其中所述第一磷酸盐混合物是磷酸钾盐。

131. 权利要求 128 的方法, 其中所述第一磷酸盐混合物由钠盐和

钾盐组成。

132. 权利要求 128 的方法,其中所述含白蛋白的流体具有在一升溶液中 15-50 克范围内白蛋白的浓度。

133. 权利要求 128 的方法,其中在添加时所述第一磷酸盐混合物的温度在 20-30℃ 的范围内。

134. 权利要求 128 的方法,其中允许所述结晶批料溶液结晶至多 12 小时。

135. 权利要求 128 的方法,其中允许所述结晶批料溶液结晶至多 24 小时。

136. 权利要求 128 的方法,其中允许所述结晶批料溶液结晶至少 24 小时。

137. 权利要求 128 的方法,其中通过过滤完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

138. 权利要求 128 的方法,其中通过离心完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

139. 权利要求 128 的方法,其中通过重力完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

140. 权利要求 128 的方法,其中通过干燥完成所述白蛋白晶体的第一次分离。

141. 权利要求 128 的方法,其中将从所述溶解的晶体悬浮液中沉淀出来的白蛋白晶体再溶解成溶液并且重结晶至少一次。

142. 权利要求 128 的方法,其中预先将来自所述原料流中的所述含人白蛋白的流体澄清以去除杂质不在溶液中。

143. 权利要求 128 的方法,其中所述原料流是来自转基因哺乳动物的乳汁或其它体液。

144. 权利要求 103 的方法,其中将来自转基因哺乳动物的乳汁澄清以去除杂质和一些乳汁蛋白质。

145. 权利要求 103 的方法,其中在给定原料流中纯度的水平是至少 10%,也就是,其中人白蛋白构成给定溶液总蛋白质的至少 10%。

146. 权利要求 128 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 2-400 克范围内的白蛋白浓度。

147. 权利要求 128 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 3-300 克范围内的白蛋白浓度。

148. 权利要求 128 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 3-100 克范围内的白蛋白浓度。

149. 权利要求 128 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 3-40 克范围内的白蛋白浓度。

150. 权利要求 128 的方法, 其中所述含白蛋白的流体具有每升溶液 2-10 克范围内的白蛋白浓度。

151. 权利要求 128 的方法, 其中将所述结晶人白蛋白产品用作药物制剂中的赋形剂。

152. 权利要求 128 的方法, 其中将所述结晶人白蛋白产品用作药物组合物中的治疗剂。

153. 权利要求 128 的方法, 其中所述原料流是来源于表达重组人白蛋白的宿主的培养上清液或体液。

154. 权利要求 153 的方法, 其中所述宿主是哺乳动物细胞培养物。

155. 权利要求 153 的方法, 其中所述宿主是转基因哺乳动物。

156. 权利要求 153 的方法, 其中所述宿主是转基因鸟。

157. 权利要求 153 的方法, 其中所述宿主是转基因植物。

158. 权利要求 153 的方法, 其中所述宿主是酵母细胞培养物。

159. 权利要求 153 的方法, 其中所述宿主是昆虫细胞培养物。

160. 权利要求 153 的方法, 其中所述宿主是原核细胞培养物。

161. 权利要求 128 的方法, 其中将所述结晶人白蛋白产品用于治疗医学疾病。

162. 权利要求 161 的方法, 其中所述医学疾病选自:

a) 水肿;

b) 低血容量症;

- c) 血清蛋白减少;
- d) 成人呼吸窘迫综合征 (ARDS);
- e) 肾变病;
- f) 新生儿溶血性疾病 (HDN);
- g) 严重烧伤;
- h) 低蛋白血症; 和
- i) 急性胰腺炎。

163. 权利要求 128 的方法, 其中在心肺分流外科手术期间使用所述结晶人白蛋白产品。

164. 权利要求 128 的方法, 其中通过一个或多个重结晶步骤进一步纯化所述白蛋白晶体, 所述步骤包括:

g) 将来自第一次白蛋白晶体分离的白蛋白晶体悬浮在第二磷酸盐混合物中, 其中所述第二磷酸盐混合物具有 2.7-3.0 M 的浓度并且 6.1-6.3 范围内的 pH;

h) 加热来自第一次白蛋白晶体分离的晶体悬浮液直到温度在 40-50℃ 的范围内以溶解晶体;

i) 对来自所述白蛋白晶体的第一次分离的溶解的晶体悬浮液提供第二次过滤;

j) 冷却来自所述白蛋白晶体的第一次分离的所得到的溶解的晶体悬浮液至至多 15℃ 的温度;

k) 让白蛋白晶体从所得到的冷却的晶体悬浮液中形成; 和

l) 从任何剩下流体中分离白蛋白晶体;

其中这些特定步骤的应用允许人白蛋白从给定的原料流中纯化和结晶。

165. 权利要求 164 的方法, 其中所述第二磷酸盐混合物由磷酸钠盐组成。

166. 权利要求 164 的方法, 其中所述第二磷酸盐混合物是磷酸钾盐。

167. 权利要求 164 的方法, 其中所述第二磷酸盐混合物由钠盐和

钾盐组成。

168. 权利要求 1 的方法，其中所述含白蛋白的原料流含有与溶解的人血清白蛋白产品结合的化合物，所述化合物选自：

- a) 辛酸盐；
- b) 脂肪酸；和
- c) 长链醇。

169. 权利要求 1 的方法，其中将所述人白蛋白产品纯化至浓缩物，所述浓缩物为各种状态中的一种，所述条件为选自：

- a) 结晶；
- b) 凝胶；
- c) 沉淀；和。
- d) 小滴。

170. 权利要求 88 的方法，其中所述含人白蛋白的原料流含有与溶解的人血清白蛋白产品结合的化合物，所述化合物选自：

- a) 辛酸盐；
- b) 脂肪酸；和
- c) 长链醇。

171. 权利要求 88 的方法，其中将所述人白蛋白产品纯化至浓缩物，所述浓缩物为各种状态中的一种，所述条件为选自：

- a) 结晶；
- b) 凝胶；
- c) 沉淀；和。
- d) 小滴。

172. 权利要求 128 的方法，其中所述含人白蛋白的原料流含有与溶解的人血清白蛋白产品结合的化合物，所述化合物选自：

- a) 辛酸盐；
- b) 脂肪酸；和
- c) 长链醇。

173. 权利要求 128 的方法，其中将所述人白蛋白产品纯化至浓缩

物，所述浓缩物为各种状态中的一种，所述条件为选自：

- a) 结晶；
- b) 凝胶；
- c) 沉淀；和。
- d) 小滴。

174. 一种生产结晶人白蛋白的方法，该方法包括：

- a) 浓缩含白蛋白流体，直到所述流体具有每升溶液至少 15 克白蛋白；
 - b) 向所述含白蛋白的流体中添加足够量的第一化学修饰剂；
 - c) 提供所述含白蛋白的溶液的第一次过滤以致形成所得的结晶批料溶液以去除杂质；
 - d) 冷却所述结晶批料溶液的所得滤液至至多 20℃ 的温度；
 - e) 让所述结晶批料溶液中的人白蛋白结晶；
 - f) 向所述结晶批料溶液中添加更多的所述第一化学修饰剂，足以达到至多 3.0 摩尔的浓度；
 - g) 从任何剩下流体中进行白蛋白晶体的第一次分离；
 - h) 将来自第一次白蛋白晶体分离的白蛋白晶体悬浮在第二化学修饰剂中；
 - i) 加热来自第一次白蛋白晶体分离的晶体悬浮液直到温度在 40-50℃ 的范围内以溶解晶体；
 - j) 对来自所述白蛋白晶体的第一次分离的溶解的晶体悬浮液提供第二次过滤；
 - k) 冷却来自所述白蛋白晶体的第一次分离的所得到的溶解的晶体悬浮液至至多 15℃ 的温度；和
 - l) 让白蛋白晶体从所得到的冷却的晶体悬浮液中形成；
- 其中这些特定步骤的应用允许人白蛋白从给定的含有人白蛋白的原料流中纯化和结晶。

175. 权利要求 174 的方法，其中所述第一化学修饰剂是聚乙二醇并且所述第二化学修饰剂是癸醇。

176. 权利要求 174 的方法, 其中所述第一化学修饰剂是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 并且所述第二化学修饰剂是癸醇。

177. 权利要求 174 的方法, 其中所述第一化学修饰剂是聚乙二醇并且所述第二化学修饰剂是辛酸。

178. 权利要求 174 的方法, 其中所述第一化学修饰剂是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 并且所述第二化学修饰剂是辛酸。

179. 权利要求 174 的方法, 其中所述第一化学修饰剂是 2-丙醇并且所述第二化学修饰剂是 MgCl_2 。

180. 权利要求 174 的方法, 其中所述第一化学修饰剂是苺醇并且所述第二化学修饰剂是 MgCl_2 。

181. 权利要求 174 的方法, 其中所述第一化学修饰剂是氯化钾并且所述第二化学修饰剂是氯化钾。

182. 权利要求 174 的方法, 其中所述第一化学修饰剂是聚乙二醇并且所述第二化学修饰剂是乙酸铵。

183. 权利要求 174 的方法, 其中所述第一化学修饰剂是聚乙二醇并且所述第二化学修饰剂是聚乙二醇。

184. 权利要求 174 的方法, 其中所述第一化学修饰剂是聚乙二醇并且所述第二化学修饰剂是 2-丙醇。

结晶人血清白蛋白的方法

发明领域

本发明涉及用于提供一种结晶人白蛋白的高度可靠的方法和商业上可行的方法的方法。更具体地说，本发明提供一种生产晶体人白蛋白的方法，所述人白蛋白纯化自各种白蛋白来源，具体包括自转基因动物或其它重组来源。

发明背景

本发明涉及一种改进的结晶人血清白蛋白（“hSA”）的方法（在本申请中，hSA 将被与术语人血清白蛋白互换地使用）。优选进行这种方法以加强重组 hSA 的纯化程序，该重组 hSA 然后可被用于治疗应用或作为药物制剂中的赋形剂。就药物制剂来说，如本发明所纯化的人白蛋白可被用作治疗剂或用作赋形剂。在每一种情况下，适合的制剂可以在 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (16th 和 18th 版, Mack Publishing, Easton, Pa. (1980 和 1990)), 以及在 INTRODUCTION TO PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS (4th 版, Lea & Febiger, Philadelphia (1985)) 中找到，在此全部引入以供参考。

关于 hSA 的治疗应用，白蛋白施用的目的主要是通过维持血浆胶体渗透压 (colloid oncotic pressure) 来维持循环血浆容量，以及通过使腔内和间质的流体进入血管来治疗其他抗性严重的水肿。

通过在急性低蛋白血症引起的病理状况中，以及在对其他治疗方法耐受的慢性低蛋白血症引起的病理状况中补充白蛋白，白蛋白产品被用来获得暂时的状况改善。

白蛋白是第一个临床上用作血容量扩充剂的自然胶体成分，并且与其他胶体产品相比它是标准的胶体物质。一些特定的医学适应症（在该适应症中白蛋白可被用来增加患者中血管内胶体渗透压 (oncotic

pressure) 并由此扩充血管内容量) 包括: 低血容量性休克; 严重烧伤; 成人呼吸窘迫综合征 (ARDS); 腹水; 肝衰竭; 胰腺炎和正在经历心肺分流术的患者。(Cochrane 等, 1998)。白蛋白也可被用来治疗新生儿高胆红素血症、低蛋白血症和肾病综合征。(Vermeulen 等, 1995)。

人血液中的白蛋白部分起三种主要的生理作用: (1) 维持血浆胶体渗透压, (2) 运输和螯合胆红素, 以及 (3) 运输脂肪酸和其他中间代谢产物例如激素和酶。(Peters, T 等)。因为白蛋白引起大约 80% 的血浆膨胀压, 所以血清白蛋白浓度 50% 的减少会随之产生胶体渗透压 66% 的下降。(Rainey T.G., 等, 1994)。在重症病患者中, 死亡的危险与血清白蛋白浓度呈反相关。(Cochrane 等, 1998)。Goldwaster 和 Feldman 估计对于血清白蛋白浓度的每 2.5g/dL 减少, 有 24%-56% 死亡危险的增加。(Goldwaster 等, 1997)。这种估计是在关于其他共变量 (例如, 肾功能, 血清氨基转移酶, 乳酸酸中毒) 调整后做出的, 它强有力地表明白蛋白输注可能具有直接的细胞保护作用。(Cochrane 等, 1998)。

如上所述, 清楚的是, 根据可以得到的描述它的科学文献的数量和通过它享有的工业应用的数目来判断, hSA 也许是所有血浆蛋白质中最为人们所知的。然而, 这种大量的知识主要集中于它的生理学和白蛋白的临床应用, 而不是血浆分级分离以外的从任何来源纯化它或获得所述分子所用的方法学。最熟知的并且仍然被广泛使用的纯化方法是 60 年前由 Cohn 和他的同事们开发 (Cohn E. J. 等, 1947)。Cohn 血浆分级分离方法主要被用来生产纯化的血浆产品, 用于多种临床应用。Cohn 还开发了一种被广泛使用的用于人血清白蛋白的结晶方法, 该方法利用与从血浆分级分离方法熟知的那些类似的原理。然而, 该方法具有明显的效率低并且经常不能提供足够的高度纯化的 hSA 的供应。

pH 的影响

pH 的影响是蛋白质结晶中的主要因素之一。通常蛋白质晶体在特定的 pH 有一个界定很好的溶解度最小的点。在蛋白质结晶的通常文献中，最常见的情况是这个最小溶解度是在靶蛋白质的等电点。然而，hSA 在其等电点是高度可溶的，跨越大范围的离子强度。因此，白蛋白的结晶特性比许多其他蛋白质的特性更复杂的多，使可靠的结晶和/或纯化成问题。

白蛋白具有变化的等电点，取决于它接受的化学处理。带有全部足量的 6 个结合脂肪酸，hSA 的 pI 通常是 4.6，然而，当被全部脱脂时，它的 pI 可高达 5.6。因此，hSA 的结晶特性在它的“天然的”状态和脱脂状态之间变化，并且文献中报道的 hSA 本身结晶的最适 pH 实质上在低值 4.6 至高值 8.0 之间变化，并且高度依赖于以每批为基础的 hSA 的分子状态。因此，存在于文献中的被认为是 hSA 结晶的最适 pH 范围是混乱的并且明显依赖于不同的沉淀试剂，使用的每种沉淀剂具有可变化的浓度，也许只最适合于 hSA 分子可能状态中的一种。

例如，用低离子强度的 hSA 时，像在 Cohn 醇方法中期望的那样，结晶最适在 pH4.9-5.3 进行，该 pH 接近于天然白蛋白的等电点。在具有更高离子强度的状况中和当被强缓冲时，通过 PEG 溶液结晶的最适 pH 是 7.4。总之，报道的关于 hSA 最适结晶的 pH 影响以这样一种表面上看来不合常规的方式依赖于试剂组成，所述方式通过参考现有技术和现有技术方法学不能得出可靠的结论。事实上，鉴于现有技术的教导的状态，每一种新试剂和技术必须根据特定 pH 或其他单变量进行大量的优化，以在得出结晶条件时被保持一致。

沉淀试剂的影响

应该注意到，hSA 在变化的盐浓度中具有很高的溶解度。它在低离子强度下加入乙醇（Cohn 方法；Cohn E. J. 等，1947）或其他溶剂，它可被沉淀或结晶。或者，用很高盐浓度的盐析出是可能的，并且描述了早期文献大多数使用的硫酸铵或乙醇。在更近的文献中，不同分子量的 PEG 溶液已被广泛地应用。然而，因为残余的污染物，列于文

献中的试剂对于所得到的 hSA 临床应用来说是不可接受的。在现有技术的沉淀试剂中，只有乙醇和硫酸铵在 hSA 的生产中是有用的。然而，它们都有明显的实际问题。用乙醇结晶需要加入有毒的有机变性剂例如苯或重金属。硫酸铵对于最终白蛋白制剂来说不是合适的盐，因此需要被去除。

特定试剂的影响

除了它的其他特征以外，白蛋白具有与许多较小的分子和离子结合和附着的超常能力。不同的长链醇和脂肪酸与 hSA 的结合强烈影响分子 hSA 的结晶特征，并且再次起使临床级人血清白蛋白的生产高度可变和不可预测的作用。能够显著影响 hSA 结晶特征的试剂的例子包括：癸醇，棕榈酸和辛酸。

温度的影响

还应该注意到，现有技术试图在乙醇溶液中结晶 hSA，该溶液典型地是在 0-10℃ 范围内的低温度下制备的。高盐和 PEG 操作经常在 4-20℃ 的宽温度范围内进行。在这些现有技术努力中，不清楚温度对白蛋白沉淀的真正影响。在乙醇中晶体溶解度在低温下看起来较低。存在于现有技术中的 PEG 和盐方法中没有清楚描述温度的影响。对于生产效率和商业可行的方法来说，温度是主要的因素之一。总之，温度的意义没有被现有技术解释或公开。

动力学和放入晶种 (seeding)

根据现有技术，在将要完成的给定反应中结晶白蛋白所需的时间占几天时间。然而，现有技术方法中那些应用乙醇的方法也许是最快的，只需要 12 到 24 小时开始结晶。还根据现有技术方法，没有添加剂，包括用从先前反应中形成的晶体接种反应混合物，白蛋白的实际结晶也许是根本不可能的。另外，依赖 PEG 的结晶方法，可能利用或可能不利用这种类型的添加剂。应注意到，加入晶种确实显著加快晶体生长，尽管鉴于本技术领域中的混乱，通常没有可被利用的参考文

献, 给出了一致地可靠结果或产生高收率的晶体。

表 1.

在文献中找到的结晶试剂和条件的实例一览表。

沉淀剂	添加物	缓冲剂 0.05 ~ 0.1 M	pH	温度℃	参考文献
(NH ₄) ₂ SO ₄ 50% Na ₂ SO ₄ 15-20% K-磷酸盐 2.2M Na-磷酸盐 3M	癸醇	磷酸盐 乙酸盐	4.6-7.7 5.0-6.8 5.9 6.8	4-6 20 4-6	Haupt, H. 和 Heide, K.Klin. Wochenschr. (1967), 45(14), pp. 726-729
PEG 180-800 40% PEG 400 40%		K-磷酸盐 Na-乙酸盐 Na-柠檬酸盐, Tris	4.6- 7.2 6.8 5.5-7.2	4	(1) Carter, D. C. EP 0 357 857 A1 和 (2) Carter, D. C. 等, Science 244 (4909) (1989) p.1195
PEG 3350 17.5%	长链脂肪酸	K-磷酸盐 Na-乙酸盐 Na-柠檬酸盐, Tris	7.5 4.6-8.0 7.0-7.5	22	(1) Carter, D. C. U.S. 5.585.466 和 (2) Carter, D. C. 等, Eur. J. Biochem. 226(3) (1994) p.1049
PEG 3350 28-30%		K-磷酸盐	7	4	Bhattacharya 等 J. Biol. Chem. 275(49) (2000) p.38731
PEG 400, 4000 20-38%		K-磷酸盐	5.0-5.5 7.0-8.0	15-20	Sugio, S. 等 Prot. Eng. 12(6) (1999) P.439
(NH ₄) ₂ SO ₄ 45%饱和的	癸醇	K-磷酸盐	6	4	Rao, S. 等 J. Biol. Chem. 251(10) (1976) p.3191
MPD	癸醇 0.1%		5.2	1	McClure, R. J. 等, J. Mol. Biol. 83(4) (1974) p.551
乙醇			5.2	2	Low, B. W. J. Am. Chem. Soc. 74 (1952) p.4830
(NH ₄) ₂ SO ₄ 54%饱和的	癸醇 0.2%		6.8	1	Low, B. W. 和 Weichel, E. J. Am. Chem. Soc. 73 (1951) p.3911
甲醇 乙醇 5 ~ 30% 丙酮	许多化合物 重金属	乙酸盐	4.4-6.5 4.9-5.1	-5 ... +5	Lewin, J. J. Am. Chem. Soc. 73 (1951) p.3906
乙醇, 摩尔份 0.02 ~ 0.163	CHCl ₃ 癸醇 苯		4.9 5.3	-5 ... +10	Cohn, E. J. 等 J. Am. Chem. Soc. 69 (1947) p.1753
乙醇 15%	癸醇 HgCl ₂		5.2	<0	Hughes, W. L. J. Am. Chem. Soc. 69 (1947) p.1836

使用无机盐的现有技术方法学

现有技术 (Haupt 和 Heide (1967)) 提供了用不同无机盐结晶人

血清白蛋白的方法，所述无机盐包括：50%饱和的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ；15-20% Na_2SO_4 ；2.2 M K-磷酸盐 pH 6.8 和 3M Na-磷酸盐 pH 5.0。在这些现有技术结晶方法中发现癸醇是必需的结晶辅助剂。发现在它们的分子主链上多于5个碳原子的其它脂肪醇也是适用的。然而，非常有限地描述了结晶条件和步骤。没有呈现物料平衡。在可从本引文中获得的数据的基础上，以充分可控或可靠的方式进行白蛋白的结晶是不可能的。

现有技术文献的综述显示，尽管有多种建议的结晶方法，但相关的引文没有教导在工业或商业规模上有效的方法，教导了不适用于生产治疗产品或赋形剂的方法，或教导了仅适用于生产仅在X-射线衍射研究中有用的单晶的方法。因此现有技术的局限阻止了结晶条件的广博知识的发展，所述结晶条件是在设计治疗剂、药物赋形剂或医疗辅助剂作用中hSA的大规模结晶方法中必需的。此外，现有技术没有提供这样的教导，该教导提供了来自人血浆以外来源的用途。因此，存在了解可靠并且在商业规模上由各种各样的来源生产白蛋白晶体的物理和化学条件的需要。

发明概述

本发明提供了改进的生产晶体人白蛋白的方法。该方法适合于各种白蛋白来源包括：人血浆，以及来自重组白蛋白来源例如培养的哺乳动物细胞、转基因哺乳动物的乳或其它体液、转基因植物、转基因鸟类、重组细菌细胞培养物、重组酵母细胞培养物或重组昆虫细胞培养物。也就是，它适用于生产结晶的和药物级hSA，不论它来自的原料流(feedstream)。所述方法具有高纯化力，以致于能将晶体白蛋白与存在于特定原料或原料流中的其它蛋白质、细菌、脂肪酸或其它分子种类有效地分离。在本发明的另外实施方案中，通过在结晶介质中的加热和冷却循环，可以将白蛋白溶解并再结晶。按照本发明使用者的需要，可以重复这种，重结晶步骤无限数次。在重结晶步骤中常规地改进白蛋白的纯度。

本发明的方法还提供试剂和条件的精确组合, 允许晶体人白蛋白生产的最佳化。在这些方法中重要的方法参数例如 pH 和温度被精确操作。本发明的另外实施方案提供了磷酸钠或磷酸钾和/或辛酸或辛酸盐的沉淀试剂的最佳浓度。

本发明的方法是基于某些影响人白蛋白结晶的关键因素。优选地, 本发明的方法以特定的方式优化了如下变量以便优化结晶方案参数如下:

1. 以计划步骤改变磷酸盐浓度;
2. 以计划步骤变化反应混合物的温度, 其中连续地应用加热和冷却过程;
3. 以计划的步骤方式控制反应混合物的 pH 或变化其 pH;
4. 其中这些特定步骤的应用允许人白蛋白从特定原料流中纯化和结晶。

参照附图, 在下面本发明优选实施方案的详细描述中, 本发明的其它特征和优点将变得显而易见。

附图简要说明

图 1 显示了结晶重组人血清白蛋白的方法流程图。

图 2 显示了在 pH 6.2, 不同的温度下的白蛋白溶解度, 和指数趋势线。

图 3 显示了在 pH 6.2, 不同的温度下的白蛋白溶解度, 和线性趋势线。

图 4 显示了在 15℃ 下白蛋白晶体的 pH 溶解度。

图 5 提供了洗涤的白蛋白晶体在不同的磷酸盐溶液 pH 6.2 中的溶解度研究。

图 6 提供了洗涤的白蛋白晶体在具有变化的辛酸盐浓度的 2.63 M 磷酸盐溶液中的溶解度研究。

图 7 显示了 hSA 晶体浆液在 2.7 M 磷酸盐 pH 6.2 中的热沉淀研究。

图 8 显示了白蛋白的制备性结晶的方法流程图。

图 9 显示了重组人血清白蛋白结晶的方法流程图。

图 10 显示了重结晶重组人血清白蛋白的方法流程图。

图 11 显示了在溶液混合物中的结晶的人白蛋白，该溶液混合物是 2.3 摩尔 Na-K-磷酸盐 pH 6.2；辛酸盐 1.4mg/ml；hSA 80 mg/ml，在 4℃ 结晶过夜，有两小时在室温（RT）下在空气密封室中。

图 12 显示了结晶的人白蛋白。显示了在溶液混合物中的结晶的人白蛋白，该溶液混合物是 2.5 摩尔 Na-K-磷酸盐 pH 6.2；用辛酸盐饱和；hSA 46.5 mg/ml，在 4℃ 结晶过夜。

图 13 显示了在溶液混合物中的结晶的人白蛋白，该溶液混合物是 2.3 摩尔 Na-K-磷酸盐 pH 6.2；辛酸盐 1.4mg/ml；hSA 80 mg/ml，在 4℃ 结晶过夜，有 0 小时在室温（RT）下在空气密封室中。

图 14 显示了，本发明的白蛋白晶体以及更多的非晶形沉淀。典型的晶体大小大约是 0.1 × 0.4 mm。沉淀随时间消失成为结晶。在 4℃ 下，在 2.7 摩尔含有 0.08% 癸醇的硫酸铵；0.05 M Na-K-磷酸盐 pH 7.4 中制备晶体。在 4℃ 下结晶，hSA 58.7 mg/ml。

优选实施方案的描述

在本说明书中下列缩写具有指定的含义。

缩写：

pH 按照熟知的科学参数描述化学物或化合物氢离子活性的所用术语。

PEG 聚乙二醇的缩写

术语的解释：

胶体 -指不能轻易穿过毛细管壁的大分子。这些化合物发挥渗透（oncotic）（即它们吸引流体）负载的作用并且通常被施用以恢复血管内容量和改善组织灌注。

渗滤 -一种结合超滤膜从大分子溶液中有效去除盐或其它

小分子的操作。目的是从白蛋白溶液中去除小分子并且调节缓冲剂，用于下一个步骤。

组织灌流 - 流至组织的血液的量

原料流 - 提供过程或方法并且含有目的蛋白质的原料或原溶液。

本发明结晶 hSA 的方法提供了高度理想的从含有各种各样的其它蛋白质组分的原料流中分离和纯化白蛋白的方法。晶体是蛋白质的最纯的形式，一旦被沉淀，晶体比非晶形沉淀具有显著更好的机械操作特性并且可通过各种各样的本领域中已知的方法被分离。例如，在工业过滤器上可有效地分离和洗涤晶体。结晶是被最多使用的精细化学物质和药物的最终纯化方法。

按照本发明的优选实施方案，用磷酸钠和磷酸钾的混合物结晶白蛋白。通过使用本发明的方法条件和方法以系统方式优化结晶。如果条件没有被最佳地调节，白蛋白可以非晶形相、液滴或凝胶的形式沉淀。非晶形沉淀是非常难以操作的，在过滤器上不能有效地分离和洗涤它。非晶形相不轻易地转化为晶体。当按照本发明调节方法条件时，晶体产生是最佳的。下面提供了本发明的不同实施方案。

1. 磷酸盐：

尽管单独用磷酸钠或单独用磷酸钾可进行结晶，但优选使用磷酸钠和磷酸钾的混合物。优选磷酸盐 NaH_2PO_4 和 K_2HPO_4 ，因为它们可被溶解呈直到 4 摩尔水溶液的浓度。可以所有的比例混合这些 4 M 的磷酸盐以制备具有各种希望的 pH 值的 4 M 结晶缓冲剂。

优选地，以相对高的磷酸盐浓度结晶白蛋白，典型地约 2.7 M 或更高。在图 1 和图 2 中最清楚地揭示了磷酸盐浓度的重要性，它们描述了白蛋白晶体在具有不同摩尔浓度的磷酸盐中的溶解度。图 2 的半对数图显示，通过增加磷酸盐摩尔浓度系统地降低晶体的溶解度。通过使用不断增加的磷酸盐的摩尔浓度，在方法中可以将白蛋白收率调

节至理想的水平。借助磷酸盐的溶解度，设置可使用磷酸盐浓度的上限。通过降低温度和增加白蛋白浓度，降低磷酸盐溶解度。在本发明方法的一个实施方案中，通过将试剂的温度降低至 10℃ 以下，显著地降低磷酸盐的溶解度。通过降低试剂的温度和增加白蛋白浓度，可获得的水浓度也被降低。

按照本发明的优选实施方案，在磷酸盐浓度 2.0-2.7 M 的范围内，原料中的大多数杂质有效地沉淀，白蛋白在室温（25-30℃）下不轻易地结晶。通过被过滤（在调节磷酸盐浓度 2.0-2.7 M 后）去除杂质。此后将滤液致冷至 10℃，在该温度下白蛋白结晶。此外为了增加晶体白蛋白收率，可以增加磷酸盐浓度（利用图 1 和图 2 的信息），还参见表 2 和图 4。

2. pH 的重要性：

按照本发明，用磷酸盐混合物充分控制结晶批料（batch）的 pH。将具有不同 pH 值的混合物的实例和得到的对白蛋白晶体的影响呈现在表 1 中。将 pH 对白蛋白晶体溶解度的影响图解地呈现在图 2 中，还参见表 2。通过降低 pH 从 pH 5.6 至大约 6.6 降低了白蛋白晶体溶解度。直到至少 pH 7.4 晶体溶解度仍然在很低的水平。在低于 pH 5.5 晶体完全溶解。

pH 对结晶动力学具有特异的作用，因此不能以简单的方式使用更高的 pH 范围 6.3-7.4。在更高的 pH 范围内，如果恰好在方法的开始调节这样的 pH，白蛋白以非晶形相（液滴）的形式沉淀。因此结晶方法优选最初用磷酸盐 pH 6.2 进行（见表 1 磷酸盐的混合配方以及图 2 和图 3）。过后当白蛋白大多数被结晶时，增加磷酸盐浓度并且调节 pH 至更高的值，以增加晶体收率。当洗涤晶体时，还有利地使用更高的 pH，因为减少了蛋白质的丢失。

3. 温度的影响

将白蛋白晶体在不同温度和磷酸盐浓度下的溶解度图解地呈现在

图 3 中。在更高的温度下，白蛋白晶体溶解度增加。最低的溶解度存在于约 0℃。然而，优选的结晶温度是约 10℃，因为在更低的温度下磷酸盐可结晶并且使方法失去控制。实例操作约 0℃是可能被进行的，因为磷酸盐结晶相对地慢。

白蛋白的结晶动力学在室温下非常慢。因此可以在室温下将磷酸盐浓度调节至 2.6-2.7，不沉淀或结晶白蛋白。然而，杂质在室温下轻易地沉淀。过滤后，将白蛋白溶液致冷优选至 10℃。搅拌溶液，白蛋白结晶。

通过利用加热循环可以将白蛋白再结晶。通过加热至 45℃溶解晶体。致冷至 10℃后，白蛋白再次结晶。可以使用再结晶以提高晶体纯度。在每次结晶后，通过进行过滤可以去除母液。可在滤器上用冷的 3 M 磷酸盐洗涤晶体。可以重复无数次再结晶循环。可以使用再结晶以提高白蛋白纯度。为方便，请参见表 7 和表 8 以及图 7。

白蛋白相对热稳定。它能被加热直到 65-70℃持续长时间。在这样的高温下，大多数其它的蛋白质变性和沉淀。因此可以使用 65-70℃的加热处理以在结晶前纯化白蛋白溶液。最高的可耐受温度与白蛋白的组成和 pH 有关。在高磷酸盐浓度 pH 6.2 下，最高的温度是 65℃。在低盐媒介和 pH 5.4 下，在 70℃加热 2-3 小时是可能的。将热处理影响的实例呈现在表 2 和表 3 以及图 6 中。

4. 辛酸盐

白蛋白需要用辛酸盐饱和以便能够结晶。辛酸盐对白蛋白，具体对热稳定性还具有稳定作用。其它的长链脂肪酸和长链醇也是有用的。在现有技术中癸醇是非常有效和熟知的。辛酸盐具有双重作用，这取决于如何使用它。当仅将它用来饱和白蛋白的结合位点时，它是有益的。然而，过量的辛酸盐将溶解晶体并减少白蛋白收率。

辛酸盐的作用很好地揭示在图 4 中。向洗涤的晶体中添加辛酸盐明显增加晶体溶解度。当辛酸盐增加至 10 mM 时，晶体溶解度快速增加。当辛酸盐增加从 10 mM 至 20 mM 时，溶解度增值较小但仍然明显。

在磷酸盐浓度 2.63 M 和温度 10℃ 下, 白蛋白溶解度增加从 10 mM 辛酸盐中的 9 mg/ml 至 10 mM 辛酸盐中的 21 mg/ml。在更高的磷酸盐浓度 2.82 M 和温度 10℃ 下, 白蛋白溶解度增加从 0 mM 辛酸盐中的 2 mg/ml 至 10 mM 辛酸盐中的 12 mg/ml。

辛酸盐的溶解影响是这样的重要, 以致于游离辛酸盐的浓度应被很好地控制并在结晶步骤中维持尽可能低。当其它方面的条件使白蛋白晶体溶解度非常低时, 低水平的游离辛酸盐, 1-2 mM, 也许是可接受的。请参见图 2 至图 7。

5. 白蛋白: 浓度、纯度

在实验溶液中, 将起始溶液中的白蛋白浓度设定至比所用条件下晶体的溶解度更高的水平。按照本发明, 当用来源于转基因动物或细胞培养物的原料流工作时, 通常使用最初的澄清步骤以提供一种溶液, 在该溶液中白蛋白浓度和其它化学参数被调节或被操作以致于它也比 hSA 晶体的溶解度高。在这两种情况下, 通过使用相图 (图 1-4) 中的溶解度信息可以估计白蛋白的回收。按照本发明, 在原料流溶液中的白蛋白的浓度水平通常在一升结晶批中 15-300 克白蛋白的范围内。在来自生物来源并且适用于商业或产业生产 hSA 的原料流中, 遇到了这些相同的范围。

此外, 按照本发明的优选实施方案, 在结晶过程中白蛋白不需要是纯的。可利用本发明开发并提供的方法以结晶出在原料中的白蛋白, 其中纯度水平大约是 10%, 也就是, 白蛋白仅构成给定溶液总蛋白质的 10%。例如, 用来源自转基因来源或细胞培养物的 hSA, 在澄清步骤后留下的大多数杂质在第一次添加磷酸盐直到 2.6 M 浓度水平后可被去除。还应注意到, 转基因来源, 典型地是乳汁, 但也包括其它体液例如血液或尿, 可含有 hSA, 该 hSA 是被设计以引起 hSA (或其它目的蛋白质) 在那些体液或组织中稳定表达的 DNA 构建体的插入的结果。在沉淀和被过滤后, 通过超滤进一步浓缩滤液以增加白蛋白浓度水平。此后按照本发明将浓缩的白蛋白溶液冷却并结晶。

实施例 1

优选的结晶方法

本方法描述了纯化的白蛋白溶液的结晶并为所述目的描述了仅磷酸盐溶液的用途。然而，按照本发明，添加本文提供的另外的步骤，可以在不纯或只是部分纯化的原料上使用本方法，如可从转基因或细胞培养原料流中见到的原料。下面呈现了例如利用具有明显不纯物质的起始溶液的本发明方法的变异。

步骤 1. 沉淀

在结晶中使用了磷酸盐储备溶液，该溶液含有溶解在水中并被补充至 1.0 升的 2.8 摩尔的 NaH_2PO_4 和 1.2 摩尔的 K_2HPO_4 。当被稀释成 0.5 M 后测量时，该 4 M 磷酸盐溶液具有 pH 6.2。此后，通过添加 371 ml pH 6.2 的 4.0M 磷酸盐储备溶液，沉淀 200 ml 纯化的白蛋白溶液。在所添加体积的基础上，磷酸盐浓度是 2.6 M。使溶液在室温下沉淀 4-18 小时，就本发明的这种变异来说，目的时间相对于现有技术方法是短的，在所有情况下少于 24 小时。所产生的沉淀的量与白蛋白溶液中杂质的量直接有关。

步骤 2. 过滤

此后，通过具有大约 $1\ \mu\text{m}$ 孔径的玻璃纤维或纤维素纤维纸过滤沉淀的 hSA。然后将过滤的溶液用于按照本发明优选的结晶方法。

步骤 3. 结晶

在 10°C 的恒温的温箱中进行结晶。用顶部驱动的螺旋桨缓慢搅拌（大约 70 rpm）所述批料（batch）。通过添加 229 ml pH 6.2 的 4 M 磷酸盐从 2.6 M 至 3 M 逐渐增加磷酸盐浓度。使结晶批料持续 4 天，然后收获和洗涤。

步骤 4. 晶体的收获和洗涤

按照本发明优选的实施方案，通过用玻璃纤维（1 μm 孔大小，142 mm 直径）过滤所述批料而收获 hSA 晶体。过滤后，然后约 80 ml 冷的 3 M 磷酸盐 pH 6.2 洗涤晶体。然后将晶体悬浮在约 150 ml 冷的 3 M 磷酸盐 pH 6.2。

关于下表 2 和本发明的优选结晶方法，优选保持混合体积比例固定。优选地，在制备缓冲剂混合物后不应调节 pH。就本发明的这个实施方案来说，pH 是大约的，因为该值将随磷酸盐浓度的改变而变化。在 pH 对晶体溶解度的研究中使用本发明的缓冲剂。如从下表 2 中所见，缓冲剂 No: 10 提供了为晶体形成一致地优化的条件并且提供该缓冲剂的条件是本发明标准缓冲剂的优选条件。（还参见，图 11-13）。

表 2. 4 M 磷酸盐缓冲液的混合表

缓冲液 No:	稀释的	4M A 和 B 的混合体积		hSA 晶体在 2.6-2.8 缓冲液中的行为
	pH	A 4M NaH_2PO_4	B 4M K_2HPO_4	
1	5.3	95	5	hSA 溶解
2	5.4	94	6	hSA 溶解
3	5.5	92	8	hSA 溶解
4	5.6	90	10	hSA 结晶
5	5.7	87	13	hSA 结晶
6	5.8	84	16	hSA 结晶
7	5.9	80	20	hSA 结晶
8	6.0	77	23	hSA 结晶
9	6.1	74	26	hSA 结晶
10	6.2	70	30	hSA 结晶
11	6.3	65	35	hSA 结晶
12	6.4	60	40	hSA 结晶
13	6.5	55	45	hSA 晶体是稳定的
14	6.6	50	50	hSA 晶体是稳定的
15	6.7	43	57	hSA 晶体是稳定的
16	6.8	39	61	hSA 晶体是稳定的
17	6.9	35	65	hSA 晶体是稳定的
18	7.0	30	70	hSA 晶体是稳定的
19	7.1	27	73	hSA 晶体是稳定的
20	7.2	24	76	hSA 晶体是稳定的
21	7.3	21	79	hSA 晶体是稳定的
22	7.4	18	82	hSA 晶体是稳定的

磷酸盐缓冲剂

稀释的缓冲剂的 pH 值是在 0.1-0.4 M 的范围内。

缓冲剂 No: 11. pH 6.3 不太受稀释的影响。

当 M 更高时, 缓冲剂 No: 1-10 具有更低的 pH。

当摩尔浓度更高时, 缓冲剂 No: 12-30 具有更高的 pH。

还应注意到, 在本公开的图 6 中提供了作为辛酸盐浓度和温度的函数的白蛋白在 2.63 M 磷酸盐中溶解度的曲线: 开放的圈 (o) 为在 10°C 下温育的样品的标记并且黑色正方形 (■) 为在 5°C 下温育的样品的标记。

实施例 2

用微扩散 (microdiffusion) 方法结晶白蛋白

按照本领域中已知的悬滴微扩散 (hanging drop microdiffusion) 法由 48 份样品制备了结晶样本。样品溶液含有纯化的 198 mg/ml 的白蛋白和 3.2 mg/ml 辛酸钠。通过将 3 μ l 的白蛋白溶液与 3 μ l 的 1.8-2.3 M 磷酸盐混合制备了白蛋白的水溶液。允许滴在封闭的微扩散孔中平衡并在 5°C 下冷却。按照本发明的优选实施方案, 在少于 24 小时内产生晶体。按照本发明, 来自其它来源物质, 特别是转基因来源和细胞培养来源的原料流也可以与悬滴法结合被使用。

用显微镜观察晶体并用数字照相机拍照。在表 19 和 20 上提供了关于晶体发展的信息。这些样本显示, 辛酸盐饱和的白蛋白在 1.8 M 至 2.3 M 磷酸盐, 在精确限定的 pH 范围, 即从 5.0-6.4 内结晶。结晶形成的最优的 pH 是在 pH 6.2, 如在下表 3 中所见。有效提供的实验条件的范围覆盖了在其它原料流来源中所见的浓度和溶液参数的范围, 见表 4。

表 3.

样品: 将 90 μ l hSA 浓缩物 210 mg/ml 和 10 μ l 辛酸盐溶液 (32 mg/ml pH 7.3) 混合。 最终辛酸盐浓度是 3.2 mg/ml。 滴: 3 μ l 样品+ 3 μ l 试剂		显微镜观察 C = 晶体 A = 非晶形沉淀 L = 液相分离, 球形滴 d= 天 G = 凝胶, 玻璃状固体不规则颗粒 N = 没有相分离, 澄清的溶液 X = 实验失败, 中断, 干燥, 微生物污染 等。			
温度 5 °C					
最初蛋白质浓度: 95 mg/ml					
最终蛋白质浓度: 198 mg/ml					
孔	试剂:	天数(d), 温度(°C)			
		1 d, 5 °C	3d, 5°C	8d, 5°C	18d, 5°C
A1	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 5.0	L	L	C, G	A, G
A2	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 5.6	L	L	C, L, A	C, L, G
A3	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 6.2	L	C	C	C, G
A4	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 7.0	L, G	L, G	L, G	G
A5	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 7.4	G	G	G	G
A6	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 8.2	G	G	G	G
B1	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 5.0	L	L	G	A, G
B2	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 5.6	L, A	L, A	L, G	A, G
B3	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 6.2	L, C	C	C, G	C, G
B4	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 7.0	A, G	A, G	G	G
B5	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 7.4	A, G	A, G	G	G
B6	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 8.2	A, G	A, G	G	G
C1	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 5.0	L, A	L, A	L, A	A, G
C2	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 5.6	L, A	L, A	L, A	A, G
C3	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 6.2	L, C	C	C	C, G
C4	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 7.0	A, G	A, G	G	G
C5	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 7.4	A, G	A, G	G	G
C6	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 8.2	A, G	A, G	G	G
D1	2.3 M Na-K-磷酸盐 pH 5.0	L, A	L, A	L, A	A, G
D2	2.3 M Na-K-磷酸盐 pH 5.6	L	L	L	A, G
D3	2.3 M Na-K-磷酸盐 pH 6.2	L, C	C	C	C, G
D4	2.3 M Na-K-磷酸盐 pH 7.0	A, G	A, G	G	G
D5	2.3 M Na-K-磷酸盐 pH 7.4	A, G	A, G	G	G
D6	2.3 M Na-K-磷酸盐 pH 8.2	A, G	A, G	G	G

表 4.

盒代码: MCSA35		显微镜观察			
样品: GTC hSA: 7F4AC, 使用 PEG20k 透析浓缩。将 45 μ l hSA 浓缩物, 45 ml 水和 10 μ l 辛酸盐溶液 (32 mg/ml pH 7.3) 混合。最终辛酸盐浓度是 3.2 mg/ml。		C = 晶体			
滴: 3 μ l 样品+3 μ l 试剂		A = 非晶形沉淀			
温度: 5 $^{\circ}$ C		L = 液相分离, 球形滴			
最初蛋白质浓度: 49 mg/ml		d= 天			
最终蛋白质浓度: 98 mg/ml		G = 凝胶, 玻璃状固体不规则颗粒			
		N = 没有相分离, 澄清的溶液			
		X = 实验失败, 中断, 干燥, 微生物污染等。			
孔	试剂:	天数(d), 温度 ($^{\circ}$ C)			
		1 d, +5C	2d, +5C	3d, +5C	13d, +5C
A1	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 5.9	L	C, L	C, L	C, G
A2	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 6.0-6.1	L	C, L	C, L	C, G
A3	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 6.2	L	C, L	C, L, G	C, G
A4	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 6.3-6.4	L	C, L	L, C	C, G
A5	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 6.4-6.5	L	L	L	C, G
A6	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 6.6	L	L, A	L	G
B1	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 5.9	L	C, L	C, L	C, G
B2	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 6.0-6.1	L	C, L, A	C, L, G	C, G
B3	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 6.2	L	C, L, G	C, L G	C, G
B4	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 6.3-6.4	L	L, G	L, G	G
B5	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 6.4-6.5	L	L, G	L, G	G
B6	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 6.6	L	L, G	L, G	G
C1	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 5.9	L	C, L, A	C, L, A	C, G
C2	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 6.0-6.1	L	C, L, G	C, L, G	C, G
C3	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 6.2	L, C	C, L, G	C, L, G	C, G
C4	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 6.3-6.4	L	L, G, C	C, L, G	G
C5	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 6.4-6.5	L	L, G	L, G	G
C6	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 6.6	L	L, G	L, G	G
D1	2.3 M Na-K-磷酸盐 pH 5.9	L	C, L, A	C, L, A	C, G
D2	2.3 M Na-K-磷酸盐 pH 6.0-6.1	L, C	C, LG	C, L, G	C, G
D3	2.3 M Na-K-磷酸盐 pH 6.2	L, C	C, LG	C, L, G	C, G
D4	2.3 M Na-K-磷酸盐 pH 6.3-6.4	L	C, L, G	C, L, G	G
D5	2.3 M Na-K-磷酸盐 pH 6.4-6.5	L	L, G	L, G	G
D6	2.3 M Na-K-磷酸盐 pH 6.6	L, G	L, G	L, G	G

实施例 3

在不纯原料中结晶白蛋白

从重组 hSA 原料起始进行下面的方法描述, 该原料含有许多干扰结晶的杂质。需要最先的方法步骤用于去除杂质。如果使用更纯的白

蛋白，相应地减少步骤的数目。

步骤 1. 浓缩

应通过尽可能多的超滤过滤浓缩原料。高蛋白质浓度将减少磷酸盐的使用并增加可结晶 rhSA 的收率。在浓缩步骤的末尾还应用水过滤材料，以减少来源于前面方法步骤的盐。蛋白质浓缩的标准：

$A_{280_{nm}}=150-200$ 。

步骤 2. 用磷酸盐的最初沉淀

向 1.5 体积的 rhSA 浓缩物中添加 2.5 体积的 4 M 磷酸盐 (pH 6.2)。在本步骤中的最终磷酸盐浓度是 2.5 M，该浓度沉淀杂质但不沉淀白蛋白。优选在室温下进行该步骤。

步骤 3. 过滤

去除用布氏漏斗或压力室滤器滤出的沉淀。使用硅藻土作为助滤剂，因为沉淀是非常细粒状的物质。因为沉淀将浮在液体的上面，所以离心不是一种方便的选择。

步骤 4. 结晶

通过在滤液中添加更多的 4 M 磷酸盐 (pH 6.2) 直到浓度为 2.8 M，开始 hSA 的结晶。在冷却的温度，优选约 5.0℃ 下进行结晶。hSA 的结晶，按照本发明的实施方案在 24 小时内自发开始。在另一个实施方案中，晶种的添加将使该过程更迅速。

步骤 5. 晶体的洗涤

按照本发明的优选实施方案，通过离心或优选通过过滤洗涤晶体。在离心中，晶体浮在磷酸盐缓冲剂的上面。在约 +5℃ 下用新鲜 2.8 M 磷酸盐溶液进行洗涤。应该用小于 0.1 bar 的低压差进行晶体洗涤。重复洗涤 3-4 次直到滤液中的可溶性蛋白质保持在接近恒定的低水

平, $A_{280\text{nm}}=1.0$ 或更小。

步骤 6. 晶体贮存物的配制

将洗涤过的晶体分散在小体积的 2.8 M 磷酸盐缓冲剂中。可以在这种溶液中贮藏晶体直到被配置用于下一步骤。

实施例 4

加热处理后结晶不纯的白蛋白

原料

本实施例使用的原料流物质具有显著量的作为杂质的蛋白质。白蛋白为存在的蛋白质的大约 30%。如已所述, 这在由澄清的或部分纯化的转基因或细胞培养物来源提供的原料流物质的典型范围内。将使用的包括 107 ml 4 M 磷酸盐 pH 6.2 的溶液添加到 200 ml 原料溶液中 (此步骤前它是在 2 M 磷酸盐中) 以得到 2.70 M 溶液。按照本发明, 将这种沉淀的溶液用作结晶的原料溶液。

热处理

在 55℃ 将沉淀的起始溶液 (在 2.70 M 磷酸盐中) 温育 90 分钟。作为这种热处理的结果, 形成了大量的棒条样晶体以及非晶形沉淀。总蛋白质的大约 75% 至 80% 结晶或沉淀。当它还是热的时候, 通过玻璃纤维滤器过滤浆液去除晶体和沉淀。使用一些硅藻土作为助滤剂。只取含白蛋白的上清液滤液用于下一步骤。

浓缩和过滤

过滤后, 溶液具有太低的白蛋白浓度用于结晶。因此, 要将它浓缩并用 Fresenius Polysulfone UF 6.2 Hemoflow F5HPS 透析筒在 55℃ 渗滤。方法步骤的详细数据显示在表 6 中。

hSA 结晶

增加浓缩溶液的磷酸盐浓度并将其缓慢调节至 2.8。同时在冷却器中轻轻地搅拌该批料使 hSA 结晶。

收获 hSA 晶体并通过过滤的真空洗涤。洗涤溶液是 2.88 M 磷酸盐 pH 6.4。如在下表 5 和图 7 中所显示的，杂质的热结晶在技术上是容易的并且是去除原料的主要杂质的快速方法。

表 5. 原料和洗涤的晶体的纯度分析。ELISA 试验的结果。

ELISA 试验	不纯的原料	洗涤的晶体样品 101-98
BSA (ppm)	85000	14300
β -乳球蛋白 (ppm)	3488000	4500
α -乳清蛋白 (ppm)	143000	>100
IgG (ppm)	69000	>1700

原料: Genzyme 转基因 hSA: 白蛋白浓度 lot # X1131FF,
蛋白质浓度试验: TP 84 g/l 和 79 g/l, ALB 28.58 g/l 和 28.75g/l.

表 6. 不纯的白蛋白从原料到晶体

批号和步骤	溶液的组成, 注释	体积 (ml)	总蛋白质: A 280 x 体积	原料的蛋白质%
从一批产品浓缩物开始, 渗滤	来自 Sigma 的原料	200	14750	100
添加 4 M 磷酸盐 pH 6.2	磷酸盐 2.7M	307	14736	43.7
在 55℃ 加热 90 分钟	强沉淀, 大多数结晶	307	14736	43.7
添加助滤剂并趁热过滤	澄清的滤液	260	3276	22
用超滤浓缩	澄清的浓缩物, 1.9 M 磷酸盐	111	3024	20
逐渐地添加 4 M 磷酸盐, 浓缩	磷酸盐 2.8 M	90.8	3024	20
滤液中的蛋白质	晶体浆液的 0.45 μ m 滤液	90.8	1843	10
晶体中的蛋白质	通过 A280nm 33.3-20.3 的差异计算的晶体	90.8	1180	8

用 200 ml 等份样品溶液计算全部序列步骤的物料平衡。

实施例 5

通过使用加热和冷却循环重结晶白蛋白

将先前在 2.7 M 磷酸盐 pH 6.2 中制备的 hSA 晶体浆液，蛋白质浓度为 37.5 g/l，用作按照本发明的优选实施方案进行的本研究的原料。将五份所述晶体浆液的样品，每份 0.50 ml，在 40、45、55、65 或 70 °C 培育 60 分钟。在全部测试温度下溶解晶体。在加热结束时，通过 0.45 μ m 滤器过滤样品。通过测量在 280nm 处的吸收测定滤液的可溶性蛋白质。

如在表 7 和表 8 以及图 13 中所见，当在 40-55 °C 温育所述晶体浆液时，总蛋白质的约 10% 沉淀。在这种温度范围内该值非常恒定并且它表示在加热过滤步骤中被去除的杂质。当将温度从 65 增加至 70 °C，样品中的可溶性蛋白质从 83% 降低至 37%。因此，在 70 °C 白蛋白也开始不可逆地沉淀。

过滤后，样品 1 至 5 加热达到 65 °C，在设定在 5 °C 的冷却器中 18 小时后样品全部重结晶良好。当在 70 °C 温育样品 5 时，在滤液中没有晶体产生，这表明白蛋白在所述温度下在 2.7 M 磷酸盐中不稳定，参见表 8。这些例子显示白蛋白可以，按照本发明的优选实施方案，通过使用加热达到 65 °C，此后过滤并通过合适的重结晶循环而被很好地纯化。

表 7. hSA 晶体浆液的加热沉淀研究的结果

样品 编号:	加热温度	在被过滤前，热 处理后的观察	滤液 0.45 μ m 的 A 280	总蛋白质中的 可溶性蛋白质 (%)
1	40 °C	轻度浑浊的溶液。大多数的 晶体被溶解	17.08	86
2	45 °C	轻度浑浊的溶液，没有晶体。	17.90	90
3	55 °C	轻度浑浊的溶液，没有晶体。	17.70	89
4	65 °C	增加地浑浊的溶液，没有晶 体。	16.60	83
5	70 °C	强沉淀的浆液，没有晶体	7.42	37

表 8. 被加热并过滤的样品的观察，在低温下重结晶。

实例的滤液编号	加热温度	冷却器中结晶后的显微镜观察
1	40 °C	很好地形成了晶体
2	45 °C	不同尺寸，大的和非常小的晶体
3	55 °C	大晶体和晶簇
4	65 °C	晶体和晶簇
5	70 °C	澄清的溶液，没有晶体

实施例 6

在更高的 pH 下结晶白蛋白

按照本发明进行的本研究显示，白蛋白晶体的溶解度和结晶可能依赖 pH。另一个问题是在磷酸盐缓冲剂存在下的辛酸盐的分离。在更高的 pH 下辛酸盐的溶解度增加。因此，甚至轻微更高的 pH 对最佳结晶形成将是理想的。按照本发明，用三个不同的磷酸盐摩尔浓度水平在 pH 6.2-6.6 的范围内制备了试验结晶。如下表 9 中呈现了实验细节。

结果的评价

如下表 9 中所见，当将 pH 增加至值 6.4 和 6.5 时，白蛋白非常有效地结晶。在 pH 6.4 以上时，白蛋白溶解度非常低。不幸的是，在更高的 pH 水平时，白蛋白结晶为非常小的针形（参见图 10-13）。可能通过在较低的 pH 6.2 或 6.3 开始结晶，可发展成较大的晶体尺寸。在实现接近平衡时，通过逐渐地添加 4M K_2HPO_4 将 pH 调节至更高的水平。

表 9. 白蛋白浓缩物 102-5 的试管结晶。

样品 No#. 每个实验 3 ml RhSA 31 mg/ml	可溶性蛋白质 20 h (nd=未测定)	磷酸盐		显微镜观察 N = 没有相分离 A = 非晶形沉淀 C = 晶体 L = 液相分离 G = 凝胶颗粒分离
	A280nm	M	pH	
102-9-1	nd	2.46	6.2	N
102-9-2	nd	2.46	6.3	N
102-9-3	17.6	2.46	6.4	最初 L, 最后 C
102-9-4	6.2	2.46	6.5	L, C, 非常细的针状体
102-9-5	1.5	2.46	6.6	C, 非常细的针状体, A
102-9-6	nd	2.57	6.2	最初 L, 最后 C
102-9-7	16.2	2.57	6.3	最初 L, G, 最后 C
102-9-8	9.0	2.57	6.4	L, G, C 针状体
102-9-9	0.3	2.57	6.5	C, 短的针状体或棒条
102-9-10	nd	2.57	6.6	C, 短的针状体或棒条
102-9-11	nd	2.67	6.2	最初 G, 最后 C
102-9-12	14.9	2.67	6.3	最初 L, G, 最后 C
102-9-13	0.3	2.67	6.4	C, 许多非常小的针状体
102-9-14	nd	2.67	6.5	C, 许多非常小的针状体
102-9-15	nd	2.67	6.6	C, 许多非常小的针状体

实施例 7

白蛋白晶体的重结晶和洗涤

重结晶和洗涤

在 45℃ 加热洗涤的晶体 (102-12) 5 分钟。晶体快速溶解。在还温的时候, 用 0.45 μm 注射器滤器过滤溶液。在 2℃ 搅拌经过滤的溶液直到结晶 (3 天)。该批结晶很好 (图 2)。通过过滤收获晶体并在 0.45 μm (50 mm 直径) Sartorius 膜上用 2.82 M pH 6.2 磷酸盐洗涤。将洗涤过的晶体分散在 2.82 M 磷酸盐缓冲剂中。

表 10. 白蛋白晶体的重结晶和洗涤

步骤	MI	A 280nm	白蛋白 g
以 102-12 开始	26.9	36.9	1.877
步骤 1. 在 45℃ 加热 5 分钟	26.9		
步骤 2. 过滤 0.45μm	26		
步骤 3. 在 2℃ 搅拌 3 天 (见: 图 2)	26		
步骤 4. 收获并洗涤、过滤	37.8	3.6	0.256
在 2.82 M 中的晶体悬浮液	22.1	34.8	1.451
样品 102-13 至 Sigma 7	18	34.8	1.182

适应症和用途

低血容量症

低血容量症是通过本发明的方法纯化并可制备得到的白蛋白, 25% 的溶液, Buminate 25% 的可能适应证。它在逆转低血容量症的有效性在很大程度上取决于它将肠液吸入循环中的能力。它对水合很好的患者最有效。当低血容量症是长时间持续并且血白蛋白减少存在, 伴随大量的水合或浮肿, 25% 白蛋白比 5% 蛋白质溶液优选。然而, 在缺乏大量或过度水合的情况下, 应该使用 5% 蛋白质溶液或应用拟晶体稀释 25% 白蛋白。虽然在休克的紧急处理中可以使用拟晶体溶液和含胶体的血浆替代物, 但白蛋白具有延长的静脉内半衰期。当血容量缺失是出血造成的时候, 应尽可能快速地给予适合的红血细胞或全血。

血清蛋白减少

血清蛋白减少是使用通过本发明方法纯化和可制得的白蛋白 (25% 的溶液, Buminate 25%) 的另一种可能的适应症。血清白蛋白减少可由下面所述的一种或多种引起: 产生不足 (营养不良、烧伤、大手术、感染等); 过量的分解代谢 (烧伤、大手术、胰腺炎等); 从身体的丢失 (出血、过量的肾排泄、烧伤渗出物等); 以及身体内的重分布

(大手术、各种炎性状况等)。

当白蛋白缺失是过量蛋白质丢失的结果时，施用白蛋白的效果将是暂时的，除非逆转了潜在的病症。在大多数情况下，伴随潜在病症的治疗的增加的氨基酸和/或蛋白质的营养性替代将比白蛋白溶液更有效地恢复正常血浆白蛋白水平。偶然地伴随严重损伤、感染或胰腺炎的血清蛋白减少不能快速地逆转并且营养补充剂可能不能恢复血清白蛋白水平。在这些情况下，白蛋白(人)，25%的溶液，Buminate 25%可能是一种有用的辅助剂。

烧伤

还没有建立在烧伤的早期治疗中使用白蛋白、电解质和流体的最佳方案，但是，结合适当的类晶体疗法，白蛋白(人)，25%的溶液，Buminate 25%可能被表明在广泛烧伤后起始24小时期间后用于胶体渗透压缺陷的治疗和替代伴随任何严重烧伤的蛋白质丢失。

成人呼吸窘迫综合征 (ARDS)

ARDS的特征是血蛋白过少状态，该状态在原因上可能与间质性肺水肿有关。虽然关于在这些患者中白蛋白输注的精确适应症存在不确定性，但如果有伴随有血白蛋白减少的肺过载，当与利尿剂一起使用时，25%白蛋白溶液可能具有治疗效果。

肾变病

在治疗有严重肾变病的患者中的浮肿中，白蛋白(人)，25%的溶液可能是一种有用的辅助，所述患者正接受类固醇类和/或利尿剂。

心肺分流外科手术

在心肺分流手术之前或心肺分流手术过程中推荐白蛋白(人)，25%的溶液，Buminate 25%，尽管没有显示它相对于类晶体溶液的优点的明确数据。

新生儿的溶血病 (HDN)

在患有严重的 HDN 的婴儿中可给予白蛋白 (人), 25%的溶液, Buminat 25%以试图结合未缀合胆红素并使其解毒。

将通过本发明方法纯化的白蛋白用作药物给药的赋形剂也是可能的。

晶体筛选实验

在具有被分成 4 排 (A、B、C、D) 和 6 列的 24 孔盒中进行悬滴筛选。在初步报告中, 仅以如下试剂列表的形式呈现所述筛选。提供了对结果的简要评论。在最终报告中, 在表中用类似于下面实施列表的完全细节提供结果。

显微术和表

在实验的开始用 2-3 天的频率以及后来一周一次进行了用显微术的样品评价。表中的显微术观察结果为使用下面字母的缩写形式:

N=没有沉淀或其它相分离

C=一些沉淀存在

CC=显著量的晶体存在

A=非晶形沉淀, 看起来像云或棕色烟的非透明颗粒云, 颗粒的大小接近光学显微镜分离能力的最低限。

AA=显著量的非晶形沉淀

L=液相分离, 球形透明滴, 看起来像水中的油。

LL=明显的液相分离

G=凝胶块, 直径几微米的不规则玻璃状透明颗粒

GG=显著量的凝胶

X=污染或干燥的滴, 中断的实验

表 11.

对非晶形沉淀的可逆温度影响。在显微术下，在较高的温度下沉淀增加。晶体是非常温度敏感的，它们在较高的温度下溶解。

开始日期(日,月,年): 17. 8. 2001		显微术观察 C = 晶体 A = 非晶形沉淀 L = 液相分离, 球形滴 G = 凝胶, 玻璃状固体不规则颗粒 N = 没有相分离, 澄清的溶液 X = 实验失败, 中断, 干燥, 微生物污染等。			
样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC					
滴: 8 μ l 样品+2 μ l 试剂					
温度: +25℃或+4℃					
最初蛋白质浓度: 11.7 mg/ml 最终蛋白质浓度: 58 mg/ml 缓冲剂: 0.05 M K-Na 磷酸盐 pH 7.4					
孔	试剂	3d+25℃	3d+4℃	8d, +4℃	27d, +4℃
A1	17% PEG 3350 0.08%癸醇	N	N	L, G	N
A2	18% PEG 3350 0.08%癸醇	N	N	L	N
A3	19% PEG 3350 0.08%癸醇	N	N	C	CC
A4	22% PEG 3350 0.08%癸醇	N	N	L, G	N
A5	25% PEG 3350 0.08%癸醇	N	N	G	N
A6	30% PEG 3350 0.08%癸醇	AA	A, GG	G	GG
B1	17% PEG 3350 0.36%癸醇	N	N	N	N
B2	18% PEG 3350 0.36%癸醇	N	N	N	N
B3	19% PEG 3350 0.36%癸醇	N	N	N	N
B4	22% PEG 3350 0.36%癸醇	N	N	A	N
B5	25% PEG 3350 0.36%癸醇	N	L, GG	G	N
B6	30% PEG 3350 0.36%癸醇	AA	A	L, G	GG, LL
C1	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.08%癸醇	N	N	N	N
C2	1.65M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.08%癸醇	N	N	N	N
C3	1.8 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.08%癸醇	N	N	N	N
C4	2.1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.08%癸醇	N	N	N	N
C5	2.4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.08%癸醇	G	A, GG	C, A	C, L
C6	2.7 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.08%癸醇	GG	CC, G 图 14	CC, G	CC, G
D1	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.36%癸醇	N	N	N	N
D2	1.65M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.36%癸醇	N	N	N	N
D3	1.8 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.36%癸醇	N	N	N	N
D4	2.1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.36%癸醇	N	A	N	N
D5	2.4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.36%癸醇	AA	C, G	L	LL
D6	2.7 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.36%癸醇	L, A, GG	CC, G	C, G	CC, G

MCS 23 AAT, 样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC; 用 0.05 M K-Na-磷酸盐 pH 7.4 缓冲的 PEG 3350 或 (NH₄)₂SO₄, 癸醇添加物的影响。A 排: 在 0.05 M K-Na-磷酸盐 pH 7.4 中的 17、18、19、22、25 或 30%的 500

μl PEG 3350; 向每 $500\mu\text{l}$ A 试剂中添加 $10\mu\text{l}$ 4%癸醇以得到最终 0.08%癸醇。B 排: 和 A 排一样, 但向每 $500\mu\text{l}$ A 试剂中添加 $50\mu\text{l}$ 4%癸醇以得到最终 0.36%癸醇。C 排: $500\mu\text{l}$ 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 在 0.05 M K-Na-磷酸盐 pH 7.4 中的 1.5、1.65、1.8、2.1、2.4 或 2.7 M; 向每 $500\mu\text{l}$ A 试剂中添加 $10\mu\text{l}$ 4%癸醇以得到最终 0.08%癸醇。D 排: 和 C 排一样, 但向每 $500\mu\text{l}$ A 试剂中添加 $50\mu\text{l}$ 4%癸醇以得到最终 0.36%癸醇。

结果: 用 2.4M 和 2.7M 硫酸铵-癸醇组合产生了高质量的晶体(图 14) 用 19%PEG, 0.08%癸醇生产了不同习性的晶体。用两种试剂还生产了非晶形或凝胶沉淀。结晶与试剂浓度和温度非常显著地相关。

表 12.

开始日期（日,月,年）：17. 8. 2001		显微术观察 C = 晶体 A = 非晶形沉淀 L = 液相分离，球形滴 G = 凝胶，玻璃状固体不规则颗粒 N = 没有相分离，澄清的溶液 X = 实验失败，中断，干燥，微生物污染等。			
样品：Sigma A-9511					
滴：2 μl 样品+ 2 μl 试剂					
温度：+25℃或+7℃					
最初蛋白质浓度：55 mg/ml 最终蛋白质浓度：110 mg/ml 缓冲剂：0.05 M K-Na-磷酸盐 pH 7					
孔	试剂	3d +25℃	3d +7℃	8d, +7℃	27d, +7℃
A1	17% PEG 3350 0.08%癸醇	N	N	G	N
A2	18% PEG 3350 0.08%癸醇	N	N	L	A
A3	19% PEG 3350 0.08%癸醇	N	N	A	N
A4	22% PEG 3350 0.08%癸醇	N	N	A	N
A5	25% PEG 3350 0.08%癸醇	N	N	A	N
A6	30% PEG 3350 0.08%癸醇	AA	AA	A	AA
B1	17% PEG 3350 0.36%癸醇	N	N	N	N
B2	18% PEG 3350 0.36%癸醇	N	N	N	N
B3	19% PEG 3350 0.36%癸醇	N	N	N	N
B4	22% PEG 3350 0.36%癸醇	N	N	A	N
B5	25% PEG 3350 0.36%癸醇	N	N	N	N
B6	30% PEG 3350 0.36%癸醇	N	N	L, G	GG
C1	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.08%癸醇	N	N	N	N
C2	1.65M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.08%癸醇	N	N	N	N
C3	1.8 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.08%癸醇	N	N	N	N
C4	2.1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.08%癸醇	N	A	A	N
C5	2.4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.08%癸醇	GG	GG	GG	LL, AA
C6	2.7 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.08%癸醇	GG	G G	GG	GG
D1	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.36%癸醇	GG	GG	C	C
D2	1.65M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.36%癸醇	N	N	N	N
D3	1.8 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.36%癸醇	N	N	N	N
D4	2.1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.36%癸醇	N	A	N	N
D5	2.4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.36%癸醇	N	A	L	L, A, G
D6	2.7 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.36%癸醇	LL, G	LL, GG	GG	GG

上表 12, MCS 22 AAS, 样品: Sigma hSA, A-9511; 用 0.05 M K-Na-磷酸盐 pH 7.4 缓冲的 PEG 3350 或 (NH₄)₂SO₄ 癸醇添加物的影响 与表 11 相似的筛选。

结果: Sigma hSA 以及 GTC hSA 7F-5AC 不结晶。只有一个在 1.5 M (NH₄)₂SO₄, 0.36%癸醇中的样品产生了高质量的晶体。

表 13.

对非晶形的可逆温度影响。在显微术下，在较高的温度下沉淀增加。
晶体是非常温度敏感的，它们在较高的温度下溶解。

盒代码: MCS 22AT 开始日期 (日,月,年): 17. 8. 2001		显微术观察 C = 晶体 A = 非晶形沉淀 L = 液相分离, 球形滴 G = 凝胶, 玻璃状固体不规则颗粒 N = 没有相分离, 澄清的溶液 X = 实验失败, 中断, 干燥, 微生物污染等。			
样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC					
滴: 8 μ l 样品+2 μ l 试剂					
温度: +25℃或+7℃					
最初蛋白质浓度: 11.7 mg/ml 最终蛋白质浓度: 58 mg/ml 缓冲剂: 0.05 M K-Na-磷酸盐 pH 7.4					
孔	试剂	1d +25℃	4d +25℃	30d, + 7℃	d, ℃
A1	17% PEG 3350	N	N	N	
A2	18% PEG 3350	N	N	N	
A3	19% PEG 3350	N	N	N	
A4	22% PEG 3350	N	N	A	
A5	25% PEG 3350	N	N	N	
A6	30% PEG 3350	LL	LL	A, G	
B1	17% PEG 3350 0.4%辛酸	N	N	A	
B2	18% PEG 3350 0.4%辛酸	N	N	A	
B3	19% PEG 3350 0.4%辛酸	N	N	A	
B4	22% PEG 3350 0.4%辛酸	N	N	N	
B5	25% PEG 3350 0.4%辛酸	N	N	A, L	
B6	30% PEG 3350 0.4%辛酸	LL	LL	A, L	
C1	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	N	N	N	
C2	1.65M (NH ₄) ₂ SO ₄	N	N	N	
C3	1.8 M (NH ₄) ₂ SO ₄	N	N	N	
C4	2.1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	N	N	A	
C5	2.4 M (NH ₄) ₂ SO ₄	A	N	A, G	
C6	2.7 M (NH ₄) ₂ SO ₄	GG	C, G	A, G	
D1	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4%辛酸	N	N	N	
D2	1.65M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4%辛酸	N	N	N	
D3	1.8 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4%辛酸	N	N	N	
D4	2.1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4%辛酸	N	N	A	
D5	2.4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4%辛酸	N	LL, GG	A	
D6	2.7 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4%辛酸	L, G	LL, GG	A	

关于表 13, MCS 22 AT, 样品: GTC hSA; 标记 7F-5AC; 用 0.05 M K-Na-磷酸盐 pH 7.4 缓冲的 PEG 3350 或 (NH₄)₂SO₄ 辛酸添加物的影响。

结果: 只在没有辛酸的 2.7 M (NH₄)₂SO₄ 中产生了不稳定的晶体。

表 14.

开始日期(日,月,年): 17. 8. 2001		显微术观察 C = 晶体 A = 非晶形沉淀 L = 液相分离, 球形滴 G = 凝胶, 玻璃状固体不规则颗粒 N = 没有相分离, 澄清的溶液 X = 实验失败, 中断, 干燥, 微生物污染等。			
样品: Sigma A-9511					
滴: 2 μ l 样品+ 2 μ l 试剂					
温度: +25℃或+7℃					
最初蛋白质浓度: 55 mg/ml 最终蛋白质浓度: 110 mg/ml 缓冲剂: 0.05 M K-Na-磷酸盐 pH 7.4					
孔	试剂	1d +25℃	4d +25℃	30d, +7℃	d, ℃
A1	17% PEG 3350	N	N	A, G	
A2	18% PEG 3350	N	N	N	
A3	19% PEG 3350	N	X	X	
A4	22% PEG 3350	N	X	X	
A5	25% PEG 3350	N	X	X	
A6	30% PEG 3350	GG	AA	X	
B1	17% PEG 3350 0.4%辛酸	N	N	A, G	
B2	18% PEG 3350 0.4%辛酸	N	N	A, G	
B3	19% PEG 3350 0.4%辛酸	N	N	A, G	
B4	22% PEG 3350 0.4%辛酸	N	N	N	
B5	25% PEG 3350 0.4%辛酸	N	N	N	
B6	30% PEG 3350 0.4%辛酸	A	A	N	
C1	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	N	N	N	
C2	1.65M (NH ₄) ₂ SO ₄	N	N	N	
C3	1.8 M (NH ₄) ₂ SO ₄	N	N	N	
C4	2.1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	A	N	A	
C5	2.4 M (NH ₄) ₂ SO ₄	GG	GG	AA	
C6	2.7 M (NH ₄) ₂ SO ₄	GG	GG	AA	
D1	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4%辛酸	N	N	N	
D2	1.65M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4%辛酸	N	N	N	
D3	1.8 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4%辛酸	N	N	N	
D4	2.1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4%辛酸	A, G	A, G	A, G	
D5	2.4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4%辛酸	A, G	GG	AA	
D6	2.7 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4%辛酸	GG	GG	AA	

MCS 22 AT, 样品: Sigma hSA, A-9511

用 0.05 M K-Na-磷酸盐 pH7.4 缓冲的 PEG 3350 或 (NH₄)₂SO₄ 辛酸添加物的影响。与表 3 相似的筛选。

结果: 没有晶体产生。在较高试剂浓度下只有沉淀。

表 15.

开始日期（日，月，年）：10. 8. 2001		显微镜观察 C = 晶体 A = 非晶形沉淀 L = 液相分离，球形滴 G = 凝胶，玻璃状固体不规则颗粒 N = 没有相分离，澄清的溶液 X = 实验失败，中断，干燥，微生物污染等。			
样品：GTC hSA：标记 7F-5AC					
滴：5 μl 样品 + 1 μl 试剂					
温度：+7℃					
最初蛋白质浓度：12.2 mg/ml 最终蛋白质浓度：73 mg/ml 缓冲剂：0.1 M Na - K-磷酸盐 pH 5.0-7.0					
孔	试剂	天数（d），温度（℃）			
		3d, +7℃	8d, +7℃	10d, +7℃	40d, +7℃
A1	1.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 5.0	N	A	A, G	A, G
A2	1.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 5.6	N	N	N	N
A3	1.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 5.9	N	N	N	N
A4	1.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 6.2	N	N	A	N
A5	1.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 6.6	N	N	N	N
A6	1.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 7.0	N	N	N	N
B1	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 5.0	N	AA, GG	G	A, G
B2	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 5.6	N	N	A	A
B3	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 5.9	N	N	A	A
B4	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 6.2	N	N	A	A
B5	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 6.6	N	N	A	A
B6	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 7.0	N	N	A	A
C1	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 5.0	AA	AA	GG	A, G
C2	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 5.6	N	AA, G	GG	A
C3	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 5.9	N	AA, C	GG	A
C4	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 6.2	AA, C	AA	GG, C	A
C5	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 6.6	A	A	CC	A
C6	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 7.0	A	A	CC	A
D1	3.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 5.0	AA, L	AA, GG	GG	A, G
D2	3.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 5.6	AA, L	AA, GG	GG	A
D3	3.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 5.9	AA, L	AA, GG	GG	A, G
D4	3.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 6.2	A	AA, GG	GG	A
D5	3.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 6.6	A	AA, GG	GG	A, G
D6	3.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 7.0	AA, L	AA, GG	GG	A, G

MCS16 样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC;

用磷酸盐缓冲的硫酸铵

4 排: A 1, 0 M, B 1, 5 M, C 2, 0 M, D 3, 0 M

6 栏: 0, 1 M 磷酸盐 pH 5.0 pH 5.6 pH 5.9 pH 6.2 pH 6.6 pH

7.0

结果：在 2M 以上非晶形沉淀。一些不稳定的质量不好的晶体在 40 天贮藏中消失了。

表 16.

注：晶体不稳定。

开始日期(日,月,年): 10. 8. 2001		显微术观察 C = 晶体 A = 非晶形沉淀 L = 液相分离, 球形滴 G = 凝胶, 玻璃状固体不规则颗粒 N = 没有相分离, 澄清的溶液 X = 实验失败, 中断, 干燥, 微生物污染等。			
样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC					
滴: 5 μ l 样品 + 1 μ l 试剂					
温度: +7 $^{\circ}$ C					
最初蛋白质浓度: 12.2 mg/ml 最终蛋白质浓度: 73 mg/ml 缓冲剂: 0.1 M Na - K-磷酸盐 pH 5.0-7.0					
孔	试剂	天数(d), 温度($^{\circ}$ C)			
		3d, +7 $^{\circ}$ C	6d, +7 $^{\circ}$ C	10d, +7 $^{\circ}$ C	40d, +7 $^{\circ}$ C
A1	1.0 M 硫酸钠 pH 5.0	N	N	N	N
A2	1.0 M 硫酸钠 pH 5.6	N	N	N	N
A3	1.0 M 硫酸钠 pH 5.9	N	N	N	N
A4	1.0 M 硫酸钠 pH 6.2	N	N	A	N
A5	1.0 M 硫酸钠 pH 6.6	N	N	N	N
A6	1.0 M 硫酸钠 pH 7.0	N	N	N	N
B1	1.5 M 硫酸钠 pH 5.0	N	N	AA	A
B2	1.5 M 硫酸钠 pH 5.6	N	N	AA	A
B3	1.5 M 硫酸钠 pH 5.9	N	N	AA	A
B4	1.5 M 硫酸钠 pH 6.2	N	N	AA	A
B5	1.5 M 硫酸钠 pH 6.6	N	N	AA	A
B6	1.5 M 硫酸钠 pH 7.0	N	N	AA	A
C1	1.75 M 硫酸钠 pH 5.0	N	G, C	AA	A
C2	1.75 M 硫酸钠 pH 5.6	N	A, G	AA	A
C3	1.75 M 硫酸钠 pH 5.9	N	A	AA	A
C4	1.75 M 硫酸钠 pH 6.2	N	N	AA	A
C5	1.75 M 硫酸钠 pH 6.6	N	N	AA	A
C6	1.75 M 硫酸钠 pH 7.0	N	N	AA	A
D1	2.0 M 硫酸钠 pH 5.0	AA, L	GG, C	LL, GG	A
D2	2.0 M 硫酸钠 pH 5.6	AA, L	GG	LL, GG	A
D3	2.0 M 硫酸钠 pH 5.9	AA, L	GG, C	A, GG	A
D4	2.0 M 硫酸钠 pH 6.2	AA, LL	GG, L, C	L, GG	G, A
D5	2.0 M 硫酸钠 pH 6.6	AA, LL	G, L, C	L, GG	G, A
D6	2.0 M 硫酸钠 pH 7.0	A, LL	GG	AA	G, A

MCS17, 样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC;

用磷酸盐缓冲的硫酸钠

4 排: A 1, 0 M, B 1, 5 M, C 1.75 M, D 2.0 M Na₂SO₄

6 栏: 0, 1 M 磷酸盐 pH 5.0 pH 5.6 pH 5.9 pH 6.2 pH 6.6 pH 7.0

结果: 在 1.75 M 和 2.0 M Na_2SO_4 中的不稳定晶体

在 1.5-2.0 M Na_2SO_4 中的沉淀、非晶形和凝胶

表 17.

注: 当将晶体移至室温进行显微镜观察时, 晶体不稳定。

开始日期(日,月,年): 28. 8. 2001		显微术观察			
样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC		C = 晶体			
滴: 5 μl 样品 + 2 μl 试剂		A = 非晶形沉淀			
温度: +7 $^{\circ}\text{C}$		L = 液相分离, 球形滴			
最初蛋白质浓度: 10.3 mg/ml		G = 凝胶, 玻璃状固体不规则颗粒			
最终蛋白质浓度: 36 mg/ml		N = 没有相分离, 澄清的溶液			
缓冲剂: 0.1 M Na - K-磷酸盐 pH 6.6-7.8		X = 实验失败, 中断, 干燥, 微生物污染等。			
孔	试剂: 在所有样品中 0.36% 癸醇	天数(d), 温度($^{\circ}\text{C}$)			
		12d, +7 $^{\circ}\text{C}$	22d, +7 $^{\circ}\text{C}$	28d, +7 $^{\circ}\text{C}$	
A1	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 6.6	L	N	N	
A2	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 7.0	L	N	N	
A3	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 7.2	L	N	N	
A4	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 7.4	L	N	N	
A5	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 7.6	L	N	N	
A6	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 7.8	G	N	N	
B1	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 6.6	L	N	N	
B2	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 7.0	L	N	N	
B3	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 7.2	N	N	N	
B4	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 7.4	N	N	N	
B5	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 7.6	N	N	N	
B6	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 7.8	L, G	N	N	
C1	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 6.6	L	N	N	
C2	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 7.0	L	N	N	
C3	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 7.2	L	N	N	
C4	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 7.4	L	N	N	
C5	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 7.6	L	N	N	
C6	2.0 M Na-K-磷酸盐 pH 7.8	L, G	N	N	
D1	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 6.6	L	N	L	
D2	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 7.0	CC	N	L	
D3	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 7.2	CC	N	L	
D4	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 7.4	CC	N	L	
D5	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 7.6	CC	N	CC, L	
D6	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 7.8	CC	N	CC, L	

MCSA30, 样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC

在所有滴中 1.6-2.2 M K-Na-磷酸盐 pH 6.6-7.8, 0.36%癸醇

结果: 在 2.2 M 磷酸盐 pH 7.0-7.8 中好质量的晶体。晶体是非常温度敏感的, 在室温下显微术后它们溶解并且在致冷器中又结晶。
表 18.

注: 可逆温度影响; 显微术下在更高温度下非晶形沉淀增加。晶体不稳定, 显微术下在较高温度下它们溶解。

开始日期(日,月,年): 10. 8. 2001		显微术观察			
样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC		C = 晶体			
滴: 5 μ l 样品 + 1 μ l 试剂		A = 非晶形沉淀			
温度: +7 $^{\circ}$ C		L = 液相分离, 球形滴			
最初蛋白质浓度: 12.2 mg/ml		G = 凝胶, 玻璃状固体不规则颗粒			
最终蛋白质浓度: 73 mg/ml		N = 没有相分离, 澄清的溶液			
缓冲剂: Na-K 磷酸盐 pH 4.3-6.2 pH		X = 实验失败, 中断, 干燥, 微生物污染等。			
孔	试剂	天数(d), 温度($^{\circ}$ C)			
		3d, +7 $^{\circ}$ C	8d, +7 $^{\circ}$ C	10d, +7 $^{\circ}$ C	40d, +7 $^{\circ}$ C
A1	1.2 M Na-K-磷酸盐 pH 4.3	N	N	N	G, A
A2	1.2 M Na-K-磷酸盐 pH 5.0	N	N	N	N
A3	1.2 M Na-K-磷酸盐 pH 5.3	N	N	N	N
A4	1.2 M Na-K-磷酸盐 pH 5.6	N	N	A	N
A5	1.2 M Na-K-磷酸盐 pH 5.9	N	N	N	N
A6	1.2 M Na-K-磷酸盐 pH 6.2	N	N	N	N
B1	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 4.3	N	A	A	G, A
B2	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 5.0	N	N	A	G, A
B3	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 5.3	N	N	A	A
B4	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 5.6	N	N	N	N
B5	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 5.9	N	N	N	A
B6	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 6.2	N	N	N	A
C1	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 4.3	N	AA, GG	A	A, G
C2	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 5.0	N	AA	A	A, G
C3	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 5.3	N	N	A	A
C4	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 5.6	N	N	A	A
C5	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 5.9	N	N	A	A
C6	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 6.2	N	N	A	A
D1	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 4.3	AA	AA, GG	GG	A, G
D2	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 5.0	N	AA	AA	A, G
D3	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 5.3	N	GG, C	G	A, G
D4	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 5.6	N	N	A	A
D5	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 5.9	N	N	A	A
D6	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 6.2	N	N	A, G	A, G

表 19.

注：可逆温度影响；显微术下在较高温度下非晶形沉淀增加。晶体不稳定，显微术下在较高温度下它们溶解。

开始日期(日,月,年): 10. 8. 2001		显微术观察 C = 晶体 A = 非晶形沉淀 L = 液相分离, 球形滴 G = 凝胶, 玻璃状固体不规则颗粒 N = 没有相分离, 澄清的溶液 X = 实验失败, 中断, 干燥, 微生物污染等。			
样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC					
滴: 5 μ l 样品 + 1 μ l 试剂					
温度: +7 $^{\circ}$ C					
最初蛋白质浓度: 12.2 mg/ml 最终蛋白质浓度: 73 mg/ml 缓冲剂: Na-K 磷酸盐 pH 6.6-8.2					
孔	试剂	天数(d), 温度($^{\circ}$ C)			
		3d, +7 $^{\circ}$ C	8d, +7 $^{\circ}$ C	10d, +7 $^{\circ}$ C	40 d, +7 $^{\circ}$ C
A1	1.2 M Na-K-磷酸盐 pH 6.6	N	N	N	N
A2	1.2 M Na-K-磷酸盐 pH 7.0	N	N	N	N
A3	1.2 M Na-K-磷酸盐 pH 7.4	N	N	N	N
A4	1.2 M Na-K-磷酸盐 pH 7.7	N	N	N	N
A5	1.2 M Na-K-磷酸盐 pH 8.2	N	N	N	N
A6					
B1	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 6.6	N	N	A	A
B2	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 7.0	N	N	A	A
B3	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 7.4	A	AA, GG	A	A
B4	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 7.7	N	N	N	N
B5	1.6 M Na-K-磷酸盐 pH 8.2	N	N	N	N
B6					
C1	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 6.6	N	N	A	A
C2	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 7.0	N	N	A	A
C3	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 7.4	AA	AA, GG	CC, GG	AA
C4	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 7.7	N	AA	GG	A
C5	1.8 M Na-K-磷酸盐 pH 8.2	N	AA	GG	A
C6					
D1	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 6.6	A	CC, A	GG	G, A
D2	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 7.0	A	CC, G	GG	G, A
D3	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 7.4	AA, L	GG, LL	GG	G, A
D4	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 7.7	AA	AA	GG	AA
D5	2.2 M Na-K-磷酸盐 pH 8.2	AA	AA	GG	AA
D6					

表 18 和 19

MCS 15/1 和 MCS 15/2, 样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC

没有任何添加物的磷酸盐

pH 4.3-8.2 Na-K-PO₄ 浓度 1, 2 M-2, 2 M

4 排: A 1, 2M, B 1, 6M, C 1, 8 M, D 2, 2 M

11 栏: pH 4.3 (NaH₂ PO₄) 含有: pH 5.0 pH 5.3 pH 5.6 pH 5.9 pH 6.2 pH 6.6 pH 7.0 pH 7.4 pH 7.7 pH 8.2

结果: 在 pH 7.4 为沉淀的精确最佳值。在 pH 6.6 以上和在 pH 5.3 不稳定的晶体。存在进一步研究的很大潜力。

表 20.

开始日期 (日, 月, 年): 14. 8. 2001		显微镜观察 C = 晶体 A = 非晶形沉淀 L = 液相分离, 球形滴 G = 凝胶, 玻璃状固体不规则颗粒 N = 没有相分离, 澄清的溶液 X = 实验失败, 中断, 干燥, 微生物污染等。			
样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC					
滴: 5 μ l 样品 + 1 μ l 试剂					
温度: +25 $^{\circ}$ C 或 +7 $^{\circ}$ C					
最初蛋白质浓度: 12.2 mg/ml 最终蛋白质浓度: 73 mg/ml 缓冲剂: 0.03 Na-HEPES pH 7.5-7.8					
孔	试剂	天数 (d), 温度 ($^{\circ}$ C)			
		6d, +25 $^{\circ}$ C	30d, +7 $^{\circ}$ C		
A1	25% 2-丙醇, 20 mM MgCl ₂	N	N		
A2	30% 2-丙醇, 20 mM MgCl ₂	G	G, A		
A3	35% 2-丙醇, 20 mM MgCl ₂	G	L, A		
A4	1.5% 苺醇, 20 mM MgCl ₂	N	A		
A5	1.5% 苺醇, 50 mM MgCl ₂	N	N		
A6	1.5% 苺醇, 100 mM MgCl ₂	N	N		
B1	25% 2-丙醇, 100 mM MgCl ₂	N	N		
B2	30% 2-丙醇, 100 mM MgCl ₂	G	G, A		
B3	35% 2-丙醇, 100 mM MgCl ₂	L	L, A		
B4	1.5% 苺醇, 200 mM MgCl ₂	N	N		
B5	1.5% 苺醇, 300 mM MgCl ₂	N	N		
B6	1.5% 苺醇, 400 mM MgCl ₂	N	N		
C1	25% 2-丙醇, 200 mM MgCl ₂	N	N		
C2	30% 2-丙醇, 200 mM MgCl ₂	G	G, A		
C3	35% 2-丙醇, 200 mM MgCl ₂	G	G, A		
C4	1.25% 苺醇, 20 mM MgCl ₂	N	N		
C5	1.25% 苺醇, 100 mM MgCl ₂	N	N		
C6	1.25% 苺醇, 300 mM MgCl ₂	N	N		
D1	25% 2-丙醇, 300 mM MgCl ₂	N	N		
D2	30% 2-丙醇, 300 mM MgCl ₂	N	N		
D3	35% 2-丙醇, 300 mM MgCl ₂	N	N		
D4	1.0% 苺醇, 20 mM MgCl ₂	N	N		
D5	1.0% 苺醇, 100 mM MgCl ₂	N	N		
D6	1.0% 苺醇, 300 mM MgCl ₂	N	N		

MCS21, 样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC

与氯化镁的试剂组合并含有 2-丙醇或苄醇

结果: 只在用含有 2-丙醇的样品时沉淀。用苄醇没有影响。

表 21.

开始日期 (日,月,年): 10. 8. 2001		显微术观察 C = 晶体 A = 非晶形沉淀 L = 液相分离, 球形滴 G = 凝胶, 玻璃状固体不规则颗粒 N = 没有相分离, 澄清的溶液 X = 实验失败, 中断, 干燥, 微生物污染等。			
样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC					
滴: 5 μ l 样品 + 1 μ l 试剂					
温度: +7 $^{\circ}$ C					
最初蛋白质浓度: 12.2 mg/ml 最终蛋白质浓度: 73 mg/ml 缓冲剂: 0.1 M Na-K-磷酸盐 pH 5.0-7.0					
孔	试剂	天数 (d), 温度 ($^{\circ}$ C)			
		3d, +7 $^{\circ}$ C	4d, +7 $^{\circ}$ C	10d, +7 $^{\circ}$ C	40 d, +7 $^{\circ}$ C
A1	1.5 M NaCl pH 5.0	N	N	N	N
A2	1.5 M NaCl pH 5.6	N	N	N	N
A3	1.5 M NaCl pH 5.9	N	N	N	N
A4	1.5 M NaCl pH 6.2	N	N	N	N
A5	1.5 M NaCl pH 6.6	N	N	N	N
A6	1.5 M NaCl pH 7.0	N	N	N	N
B1	2.0 M NaCl pH 5.0	N	N	N	N
B2	2.0 M NaCl pH 5.6	N	N	N	N
B3	2.0 M NaCl pH 5.9	N	N	N	N
B4	2.0 M NaCl pH 6.2	N	N	N	N
B5	2.0 M NaCl pH 6.6	N	N	N	N
B6	2.0 M NaCl pH 7.0	N	N	N	N
C1	3.0 M NaCl pH 5.0	N	N	N	N
C2	3.0 M NaCl pH 5.6	N	N	N	N
C3	3.0 M NaCl pH 5.9	N	N	N	N
C4	3.0 M NaCl pH 6.2	N	N	N	N
C5	3.0 M NaCl pH 6.6	N	N	N	N
C6	3.0 M NaCl pH 7.0	N	N	N	N
D1	4.0 M NaCl pH 5.0	N	N	N	N
D2	4.0 M NaCl pH 5.6	N	N	N	N
D3	4.0 M NaCl pH 5.9	N	N	N	N
D4	4.0 M NaCl pH 6.2	N	N	N	N
D5	4.0 M NaCl pH 6.6	N	N	N	N
D6	4.0 M NaCl pH 7.0	N	N	N	N

样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC

用磷酸盐缓冲的氯化钠

4 排: A 1,5 B 2.0 M, C 3.0 M, D 4,0 M

6 栏: 0,1 M 磷酸盐 pH 5.0 pH 5.6 pH 5.9 pH 6.2 pH 6.6 pH 7.0

结果: 没有沉淀或相分离

表 22.

开始日期（日,月,年）：10. 8. 2001		显微术观察 C = 晶体 A = 非晶形沉淀 L = 液相分离，球形滴 G = 凝胶，玻璃状固体不规则颗粒 N = 没有相分离，澄清的溶液 X = 实验失败，中断，干燥，微生物污染等。			
样品：GTC hSA: 标记 7F-5AC					
滴：5 μ l 样品 + 1 μ l 试剂					
温度：+7 $^{\circ}$ C					
最初蛋白质浓度：12.2 mg/ml 最终蛋白质浓度：73 mg/ml 缓冲剂：0.1 M Na-K-磷酸盐 pH 5.0-7.0					
孔	试剂	天数（d），温度（ $^{\circ}$ C）			
		3d, +7 $^{\circ}$ C	4d, +7 $^{\circ}$ C	10d, +7 $^{\circ}$ C	40 d, +7 $^{\circ}$ C
A1	1.5 M KCl pH 5.0	N	N	N	N
A2	1.5 M KCl pH 5.6	N	N	N	N
A3	1.5 M KCl pH 5.9	N	N	N	N
A4	1.5 M KCl pH 6.2	N	N	N	N
A5	1.5 M KCl pH 6.6	N	N	N	N
A6	1.5 M KCl pH 7.0	N	N	N	N
B1	2.0 M KCl pH 5.0	N	N	N	N
B2	2.0 M KCl pH 5.6	N	N	N	N
B3	2.0 M KCl pH 5.9	N	N	N	N
B4	2.0 M KCl pH 6.2	N	N	N	N
B5	2.0 M KCl pH 6.6	N	N	N	N
B6	2.0 M KCl pH 7.0	N	N	N	N
C1	3.0 M KCl pH 5.0	N	N	N	N
C2	3.0 M KCl pH 5.6	N	N	N	N
C3	3.0 M KCl pH 5.9	N	N	N	N
C4	3.0 M KCl pH 6.2	N	N	N	N
C5	3.0 M KCl pH 6.6	N	N	N	N
C6	3.0 M KCl pH 7.0	N	N	N	N
D1	4.0 M KCl pH 5.0	N	N	N	N
D2	4.0 M KCl pH 5.6	N	N	N	N
D3	4.0 M KCl pH 5.9	N	N	N	N
D4	4.0 M KCl pH 6.2	N	N	N	G, A
D5	4.0 M KCl pH 6.6	N	N	N	G, A
D6	4.0 M KCl pH 7.0	N	N	N	N

样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC

用磷酸盐缓冲的氯化钾

4 排: A 1, 5M, B 2.0 M, C 3.0 M, D 4, 0 M

6 栏: 0, 1 M 磷酸盐 pH 5.0 pH 5.6 pH 5.9 pH 6.2 pH 6.6 pH 7.0

结果: 大多数没有沉淀或相分离。在 3.9 M KCl pH 6.2-6.6 中 40 天后, 凝胶沉淀。

表 23.

开始日期 (日, 月, 年): 15. 8. 2001		显微镜观察	
样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC		C = 晶体	
滴: 5 μ l 样品 + 1 μ l 试剂		A = 非晶形沉淀	
温度: +25 $^{\circ}$ C 或 +4 $^{\circ}$ C		L = 液相分离, 球形滴	
最初蛋白质浓度: 12.2 mg/ml		G = 凝胶, 玻璃状固体不规则颗粒	
最终蛋白质浓度: 73 mg/ml		N = 没有相分离, 澄清的溶液	
缓冲剂: 0.035M TrisHCl pH 8.0 或 8.4		X = 实验失败, 中断, 干燥, 微生物污染等。	
孔	试剂	日期或天数 (温度)	
		5d, +25 $^{\circ}$ C	30d, +4 $^{\circ}$ C
A1	10% PEG 6000 50mM 乙酸铵 pH 8.0	N	N
A2	10% PEG 6000 100mM 乙酸铵 pH 8.0	N	N
A3	10% PEG 6000 300mM 乙酸铵 pH 8.0	N	N
A4	10% PEG 6000 50mM 乙酸铵 pH 8.4	A, G	N
A5	10% PEG 6000 100mM 乙酸铵 pH 8.4	A, G	A
A6	10% PEG 6000 300mM 乙酸铵 pH 8.4	N	N
B1	15% PEG 6000 50mM 乙酸铵 pH 8.0	N	N
B2	15% PEG 6000 100mM 乙酸铵 pH 8.0	A	N
B3	15% PEG 6000 300mM 乙酸铵 pH 8.0	LL	L, A
B4	15% PEG 6000 50mM 乙酸铵 pH 8.4	A, G	N
B5	15% PEG 6000 100mM 乙酸铵 pH 8.4	A, G	A
B6	15% PEG 6000 300mM 乙酸铵 pH 8.4	N	N
C1	20% PEG 6000 50mM 乙酸铵 pH 8.0	A, L	X
C2	20% PEG 6000 100mM 乙酸铵 pH 8.0	N	A
C3	20% PEG 6000 300mM 乙酸铵 pH 8.0	L	L, A
C4	20% PEG 6000 50mM 乙酸铵 pH 8.4	L	A, G
C5	20% PEG 6000 100mM 乙酸铵 pH 8.4	G	A, G
C6	20% PEG 6000 300mM 乙酸铵 pH 8.4	L	L
D1	25% PEG 6000 50mM 乙酸铵 pH 8.0	LL	L, G
D2	25% PEG 6000 100mM 乙酸铵 pH 8.0	LL	L, G
D3	25% PEG 6000 300mM 乙酸铵 pH 8.0	LL	L, G
D4	25% PEG 6000 50mM 乙酸铵 pH 8.4	LL	A, G
D5	25% PEG 6000 100mM 乙酸铵 pH 8.4	LL	L, G, A
D6	25% PEG 6000 300mM 乙酸铵 pH 8.4	L	L, G

样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC

10-25% PEG 6000, 0.05-0.3 M 乙酸铵, 0.035 M Tris-HCl pH 8.0-8.4,

结果: 没有晶体。在大多数样品中有不同的沉淀。

表 24.

开始日期(日,月,年): 14. 8. 2001		显微术观察			
样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC		C = 晶体			
滴: 5 μ l 样品 + 1 μ l 试剂		A = 非晶形沉淀			
温度: +25 $^{\circ}$ C 或 +4 $^{\circ}$ C		L = 液相分离, 球形滴			
最初蛋白质浓度: 12.2 mg/ml		G = 凝胶, 玻璃状固体不规则颗粒			
最终蛋白质浓度: 73 mg/ml		N = 没有相分离, 澄清的溶液			
缓冲剂: 0.1 M 磷酸盐 pH7.4		X = 实验失败, 中断, 干燥, 微生物污染等。			
孔	试剂	4d, +25 $^{\circ}$ C	10d, +4 $^{\circ}$ C	30d, +4 $^{\circ}$ C	d, $^{\circ}$ C
A1	10% PEG 400	N	N	A	
A2	10% PEG 600	N	N	N	
A3	10% PEG 1000	N	N	N	
A4	10% PEG 4000	N	N	N	
A5	10% PEG 6000	N	N	A	
A6	10% PEG 20,000	N	N	N	
B1	20% PEG 400	G	A	A	
B2	20% PEG 600	N	N	N	
B3	20% PEG 1000	N	N	N	
B4	20% PEG 4000	N	N	N	
B5	20% PEG 6000	N	N	N	
B6	20% PEG 20000	N	N	A	
C1	30% PEG 400	N	A	N	
C2	30% PEG 600	N	N	L	
C3	30% PEG 1000	N	A	N	
C4	30% PEG 4000	A, G, L	N	N	
C5	30% PEG 6000	N	N	N	
C6	30% PEG 20000	N	N	A	
D1	40% PEG 400	N	N	N	
D2	40% PEG 600	L	L	L	
D3	40% PEG 1000	N	N	N	
D4	40% PEG 4000	N	N	N	
D5	40% PEG 6000	L	N	N	
D6	40% PEG 20000	LL	A, G	A, G	

样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC

样品中的不同分子量 400-20000 的 PEG, 磷酸盐缓冲剂 pH 7.4。

结果：没有晶体并且大多数没有沉淀，在最高浓度的 PEG6000 下非晶形形成。

表 25.

开始日期(日,月,年): 15. 8. 2001			显微术观察 C = 晶体 A = 非晶形沉淀 L = 液相分离, 球形滴 G = 凝胶, 玻璃状固体不规则颗粒 N = 没有相分离, 澄清的溶液 X = 实验失败, 中断, 干燥, 微生物污染等。			
样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC						
滴: 5μl 样品 + 1μl 试剂						
温度: +25℃或+4℃						
最初蛋白质浓度: 12.2 mg/ml						
最终蛋白质浓度: 73 mg/ml						
缓冲剂: 0.1 M K-Na-磷酸盐 pH 4.8-8.2						
孔	试剂		5d, +25℃	30d, +4℃	d, ℃	d, ℃
A1	25% PEG 6000	10%2-丙醇 pH4.8	LL	L, G, A		
A2	25% PEG 6000	10%2-丙醇 pH5.3	LL	L, G, A		
A3	25% PEG 6000	10%2-丙醇 pH6.2	LL	L, G, A		
A4	25% PEG 6000	10%2-丙醇 pH7.0	LL	L, G, A		
A5	25% PEG 6000	10%2-丙醇 pH7.4	LL	L, G, A		
A6	25% PEG 6000	10%2-丙醇 pH8.2	L	L, A		
B1	25% PEG 6000	15%2-丙醇 pH4.8	LL	L, G, A		
B2	25% PEG 6000	15%2-丙醇 pH5.3	LL	L, G, A		
B3	25% PEG 6000	15%2-丙醇 pH6.2	LL	L, G, A		
B4	25% PEG 6000	15%2-丙醇 pH7.0	LL	L, G, A		
B5	25% PEG 6000	15%2-丙醇 pH7.4	L	L, G, A		
B6	25% PEG 6000	15%2-丙醇 pH8.2	L	L, G, A		
C1	25% PEG 6000	20%2-丙醇 pH4.8	LL	L, G, A		
C2	25% PEG 6000	20%2-丙醇 pH5.3	LL	L, G, A		
C3	25% PEG 6000	20%2-丙醇 pH6.2	LL	L, G, A		
C4	25% PEG 6000	20%2-丙醇 pH7.0	LL	L, A		
C5	25% PEG 6000	20%2-丙醇 pH7.4	LL	L, A		
C6	25% PEG 6000	20%2-丙醇 pH8.2	L	L, A		
D1	25% PEG 6000	30%2-丙醇 pH4.8	L, G	X		
D2	25% PEG 6000	30%2-丙醇 pH5.3	L	L, G		
D3	25% PEG 6000	30%2-丙醇 pH6.2	LG	L, G, A		
D4	25% PEG 6000	30%2-丙醇 pH7.0	L	L, A		
D5	25% PEG 6000	30%2-丙醇 pH7.4	LG	A, G		
D6	25% PEG 6000	30%2-丙醇 pH8.2	LG	X		

样品: GTC hSA: 标记 7F-5AC

用 0.1 M K-Na-磷酸盐 pH 4.8-8.2 缓冲的 25% PEG 6000 和 10-30% 2-丙醇

排 A: 25% PEG 6000 和 10% 2-丙醇, 缓冲剂 pH 4.8、5.3、6.2、7.0、7.4 和 8.2

排 B: 25% PEG 6000 和 15% 2-丙醇, 缓冲剂 pH 4.8、5.3、6.2、7.0、7.4 和 8.2

排 C: 25% PEG 6000 和 20% 2-丙醇, 缓冲剂 pH 4.8、5.3、6.2、7.0、7.4 和 8.2

排 D: 25% PEG 6000 和 30% 2-丙醇, 缓冲剂 pH 4.8、5.3、6.2、7.0、7.4 和 8.2

结果: 在所有样品中的强液相分离, 在 30% 2-丙醇中的凝胶相。

重组生产

越来越多的重组蛋白质正被开发用于治疗 and 诊断应用。然而, 使用常规方法, 这些蛋白质的许多可能难以以功能形式和/或以所需要的量生产或生产费用昂贵。常规方法涉及将负责特定蛋白质产生的基因插入宿主细胞例如细菌、酵母或哺乳动物细胞, 例如, COS 或 CHO 细胞中, 然后使细胞在培养基中生长。然后培养的细胞合成所需要的蛋白质。传统的细菌或酵母系统不能产生呈功能形式的许多复合体蛋白质。尽管哺乳动物细胞可以产生复合体蛋白质, 但他们一般难以生长和生长费用昂贵, 并且通常只产生 mg/L 量的蛋白质。另外, 非分泌的蛋白质相对地难以从原核细胞或哺乳动物细胞中纯化, 因为它们不被分泌到培养基中。

一般地, 转基因技术的特征在于, 制造和分泌正常情况下不被分泌的蛋白质(非分泌的蛋白质)的方法。该方法包括从核酸构建体中表达蛋白质, 所述核酸构建体包括:

(a) 启动子, 例如, 乳上皮特异性启动子, 例如, 乳汁蛋白启动子;

(b) 能指引蛋白质分泌的信号序列, 例如, 来自乳汁特异性蛋白质的信号序列;

(c) 可选择地, 编码分泌的蛋白质的氨基末端编码区的足够部分的

序列，例如，被分泌到乳中的蛋白质，以允许，例如，在转基因哺乳动物的乳汁中，非分泌的蛋白质的分泌；以及

(d) 编码非分泌的蛋白质的序列，

其中元件(a)、(b)，可选择地(c)，以及(d)优选以所述次序可操作地连接。

在优选的实施方案中：元件 a、b、c（如果存在），以及 d 来自相同的基因；元件 a、b、c（如果存在），以及 d 来自两种或更多种基因。

在优选的实施方案中，所述分泌是至转基因哺乳动物的乳汁中。

在优选的实施方案中：所述信号序列是 β -酪蛋白信号序列；所述启动子是 β -酪蛋白启动子序列。

在优选的实施方案中，非分泌的蛋白质编码序列：是人来源的；编码截短的核或胞质多肽；编码人血清白蛋白或其它期望的目的蛋白质。

本发明的实施将使用，除非另有说明，常规的细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的技术，这些技术在本领域的技术人员技能之内。在文献中描述了这样的技术。参见，例如，*Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., 由 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis 编 (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989)；*DNA Cloning*, 卷 I 和 II (D.N.Glover 编, 1985)；*Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait 编, 1984)；Mullis 等，美国专利 No: 4,683,195；*Nucleic Acid Hybridization* (B.D.Hames & S.J.Higgins 编, 1984)；*Transcription And Translation* (B.D.Hames & S.J.Higgins 编, 1984)；*Culture Of Animal Cells* (R.I.Freshney, Alan R.Liss, Inc., 1987)；*Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986)；B.Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984)；论文，*Methods In Enzymology*, (Academic Press, Inc., N.Y.)；*Gene Transfer Vectors For*

Mammalian Cells (J.H. Miller 和 M.P. Calos 编, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 和 155 (Wu 等人编), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer 和 Walker 编, Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, 卷 I-IV (D.M. Weir 和 C.C. Blackwell 编, 1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)。

乳汁特异性启动子

在实施本发明中有用的转录启动子是在乳腺上皮细胞中优先被激活的那些启动子, 包括控制编码乳汁蛋白例如酪蛋白、 β 乳球蛋白 (Clark 等, (1989) *Bio/Technology* 7: 487-492)、乳清酸蛋白 (Gorton 等 (1987) *Bio/Technology* 5: 1183-1187)、以及乳清蛋白 (Soulier 等, (1992) *FEBS Letts.* 297: 13) 的基因的启动子。酪蛋白启动子可来源于任何哺乳动物物的 α 、 β 、 γ 或 κ 酪蛋白基因; 优选的启动子来源于山羊 β 酪蛋白基因 (DiTullio, (1992) *Bio/Technology* 10: 74-77)。在乳房组织中被特异性激活的乳汁特异性蛋白质启动子可来源于 cDNA 或基因组序列。优选地, 它们是来源基因组。

关于在至少一个, 通常是多个生物中的上面列出的所有乳腺特异性基因的 DNA 序列信息是可获得的。参见, 例如, Richards 等, *J. Biol. Chem.* 256, 526-532 (1981) (α -乳清蛋白大鼠); Campbell 等, *Nucleic Acids Res.* 12, 8685-8697 (1984) (大鼠 WAP); Jones 等, *J. Biol. Chem.* 260, 7042-7050 (1985) (大鼠 β -酪蛋白); Yu-Lee & Rosen, *J. Biol. Chem.* 258, 10794-10804 (1983) (大鼠 γ -酪蛋白); Hall, *Biochem. J.* 242, 735-742 (1987) (α -乳清蛋白人); Stewart, *Nucleic Acids Res.* 12, 389 (1984) (牛 α s1 和 κ 酪蛋白 cDNAs); Gorodetsky 等, *Gene* 66, 87-96 (1988) (牛 β 酪蛋白); Alexander 等, *Eur. J. Biochem.* 178, 395-401 (1988) (牛 κ 酪蛋白); Brignon 等,

FEBS Lett. 188, 48-55 (1977) (牛 α 2 酪蛋白); Jamieson 等, *Gene* 61, 85-90 (1987), Ivanov 等, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 425-429 (1988), Alexander 等, *Nucleic Acids Res.* 17, 6739 (1989) (牛 β 乳球蛋白); Vilotte 等, *Biochimie* 69, 609-620 (1987) (牛 α -乳清蛋白). Mercier & Vilotte, *J. Dairy Sci.* 76, 3079-3098 (1993) 综述了不同乳蛋白基因的结构和功能(为所有目全部并入以供参考)。达到可能需要另外的序列的程度,使用现有的序列作为探针,可轻易地克隆已经获得的序列侧翼区。使用已知的相关核苷酸序列,或相关蛋白质的抗体作为探针,通过筛选来自这类生物的库,同样获得来自不同生物的乳腺特异性调节序列。

信号序列

在信号序列中,适用于本发明的是乳汁特异性信号序列或导致真核或原核蛋白质分泌的其它信号序列。优选地,所述信号序列选自乳汁特异性信号序列,即,它来自编码被分泌入乳汁中的产品的基因。最优选地,所述乳汁特异性信号序列与在本发明的表达系统中使用的乳汁特异性启动子有关。对本发明来说,信号序列的大小并不关键。全部所需要的是,所述序列具有足够的大小以实现例如,乳房组织中所期望的重组蛋白质的分泌。例如,来自编码酪蛋白,例如, α 、 β 、 γ 或 κ 酪蛋白、 β 乳球蛋白、乳清酸蛋白和乳清蛋白的基因的序列适用于本发明。优选的信号序列是山羊 β -酪蛋白信号序列。

也可以使用来自其它分泌的蛋白质,例如,由肝细胞、肾细胞或胰细胞分泌的蛋白质的信号序列。

转基因哺乳动物

在本发明人血清白蛋白的情况下,将目的蛋白质的 DNA 构建体导入哺乳动物的生殖系。例如,通过标准的转基因技术,可将所述构建体的一个或多个拷贝掺入哺乳动物胚胎的基因组中。

在本发明中可以有用地使用非人类哺乳动物。本申请将哺乳动物

定义为不包括人的具有乳腺并产生乳汁的所有动物。优选地，优选产生大量的乳汁并具有长泌乳期的哺乳动物。优选的哺乳动物是奶牛、绵羊、山羊、小鼠、牛、骆驼和猪。当然，关于本发明的任何给定的表达序列，这些哺乳动物中的每一个可能与其它的不一样有效。例如，特定的乳汁特异性启动子或信号序列可能在一种哺乳动物中比在其它的哺乳动物中更有效。然而，本领域的技术人员通过本发明的教导可容易地作出这样的选择。

虽然为理解的目的用举例说明和实例在一些细节中描述了前述发明，但对本领域的技术人员来说，可以实施某些变化和修饰将是显而易见的。因此，所述描述和实例不应被解释为限制本发明的范围，该范围由所附的权利要求限定。

还应注意的是，尽管白蛋白是用不同的化合物、乙醇和包括磷酸盐的无机盐进行结晶的，但在文献中没有发现用磷酸盐结晶的产业方法。通过本发明的优选实施方案，现已发现通过最大程度地利用本发明的发明关键方法参数和/或条件，用磷酸盐可有利地结晶人白蛋白。上面列举和描述了发明的参数及其一些变异。

因此，还要理解，此处提供结晶的和纯化的人白蛋白的本发明的实施方案仅仅是举例说明本发明原理的应用。从前面的描述中明显的是，不脱离本发明的精神，或所附权利要求的范围，可以采用在形式、使用方法和所公开的元件的应用中的变化。

通过参考并入的现有技术引文

1. Andersson, 1966, "*The Heterogeneity Of Bovine Serum Albumin*," BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. 117:115-133.
2. Carter DC, et al., *Crystals Of Serum Albumin For Use In Genetic Engineering And Rational Drug Design*, US Patent # 5,585,466.
3. Carter DC, et al., *Human Serum Albumin Crystals and Method of Preparation*, European Patent Application #0 357 857 A1.
4. Carter DC, et al., *Preliminary Crystallographic Studies of Four Crystals Forms of Serum Albumin*, EUR J BIOCHEM (1994); 226: 1049-1052.
5. Carter DC, et al., *Three-Dimensional Structure of Human Serum Albumin*, SCIENCE (1989) 244: 1195-1198.
6. Cochrane et al., *Human Albumin Administration In Critically Ill Patients: Systematic Review Of Randomized Controlled Trials*. BR MED J. (1998);317:235-240.
7. Cohn EJ, et al., *Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XIII. Crystallization of Serum Albumins from Ethanol-Water Mixtures*, J. AM. CHEM. SOC. (1947) 69: 1753-1761.
8. Cohn EJ, et al., 1946, "*Preparation And Properties Of Serum And Plasma Proteins. IV. A System For The Separation Into Fractions Of The Protein And Lipoprotein Components Of Biological Tissues And Fluids*," J. AM. CHEM. SOC. 68:459-475.
9. Copelin C. et al., *Practical Points In The Use Of Albumin For Hypovolemia*. J PERANESTH NURS. (1998)13:118-120.
10. Dale LB, et al., *G Protein-Coupled Receptor Kinase-Mediated Desensitization of Metabotropic Glutamate Receptor 1A Protects Against Cell Death*, J BIOL CHEM (2000); 275: 38213-38220.
11. Emerson TE, *Unique Features of Albumin: A Brief Review*, CRIT CARE MED. (1989) 17:690-693.
12. Goldwaser P, et al., *Association of Serum Albumin And Mortality Risk*, J. CLIN EPIDEMIOL. (1997) 50:693-703.
13. Gore DC, et al., *Colloid Infusions Reduce Glomerular Being filtered In Resuscitated Burn Patients*. J. TRAUMA. (1996) 3:356-360.
14. Haupt H and K Heide, *Crystallization of Human Albumin Using Mineral Salts*, KLIN WOCHENSCHR (1967); 45: 726-729.
15. Hughes and Dintzis, 1964, "*Crystallization of the mercury dimers of human and bovine mercaptalbumin*," J. BIOL. CHEM. 239:845-849.

16. Hughes WL, *An Albumin Fraction Isolated From Human Plasma as a Crystalline Mercuric Salt*, J. AM. CHEM. SOC. (1947); 69: 1836-1837.
17. Klein GL, et al., *The Aluminum Content of Parenteral Solutions: Current Status*. NUTR. REV. (1991) 49:74-79.
18. Kovalik SG, et al., *The Cardiac Effect of Altered Calcium Hemostasis After Albumin Resuscitation*, J. TRAUMA. (1981) 21:275-279.
19. Ledgerwood AM, et al., *Post-Resuscitation Hypertension, Etiology, Morbidity, And Treatment*. ARCH. SURG. (1974);108:531-538.
20. Lewin J, *Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XXX. Crystalline Derivatives of Human Serum Albumin and of Certain Other Proteins*, J. AM. CHEM. SOC. (1951); 73: 3906-3911.
21. Low BW, *Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XXXIV. An X-Ray Study of Crystalline Human Serum Albumin Preparations*, J. AM. CHEM. SOC. (1952); 74: 4830-4834.
22. Low BW and EJ Weichel, *Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XXXI. An Optical and Morphological Study of Some Crystalline Human Serum Albumin Preparations and of Their Derivatives*, J. AM. CHEM. SOC. (1951); 73: 3911-3916.
23. Peters T. *Serum Albumin*, ADV. PROTEIN CHEM 37:161-245. (1985).
24. Rainey TG, et al., **PHARMACOLOGY OF COLLOIDS AND CRYSTALLOIDS**. In: *The Pharmacologic Approach to the Critically Ill Patient*, (Chernow B. ed); (Williams and Wilkins, Baltimore MD. Publ.) (1994) pages 272-290.
25. Rao SN, et al., *Preliminary X-Ray Investigation of an Orthorhombic Crystal Form of Human Plasma Albumin*, J BIOL CHEM (1976) 251: 3191-3193.
26. Roberts JS, et al., *Colloid Volume Expanders: Problems, Pitfalls, and Possibilities*. DRUGS. 1998;55:621-630.
27. Sollenne et al., *"Disruption Of The Tryptophan Binding Site In The Human Serum Albumin Dimer,"* ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 207:264-269 (1981).
28. Sugio S, et al., *Crystal Structure of Human Serum Albumin At 2.5 Å Resolution*, PROTEIN ENG (1999) 12: 439-446.
29. Tullis JL, et al., *Albumin: Background and Use*. JAMA. (1977) 237:355-360.
30. Vermeulen LC et al., *Guidelines for the Use of Albumin, Nonprotein Colloids, and Crystalloid Solutions*, ARCH INTERN MED. (1995) 155:373-379.

重组人血清白蛋白结晶的方法流程图

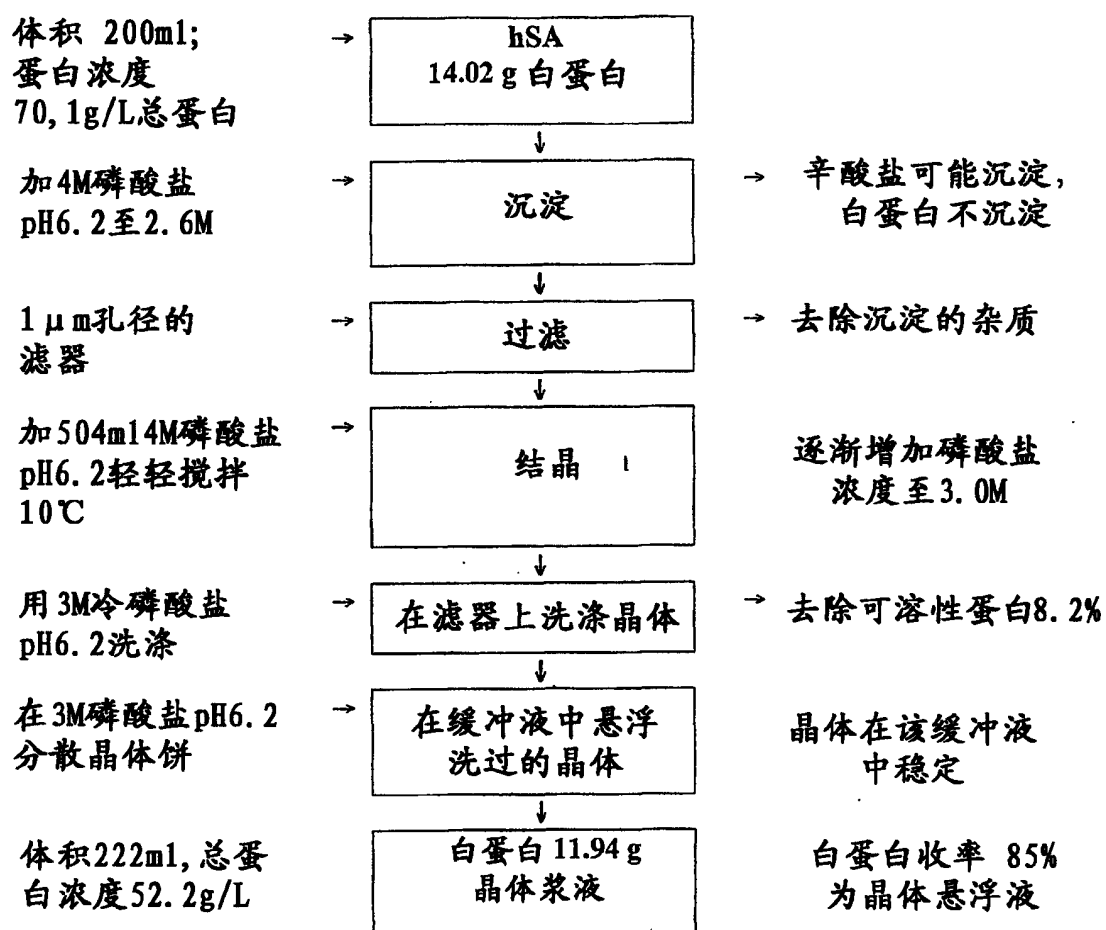


图1

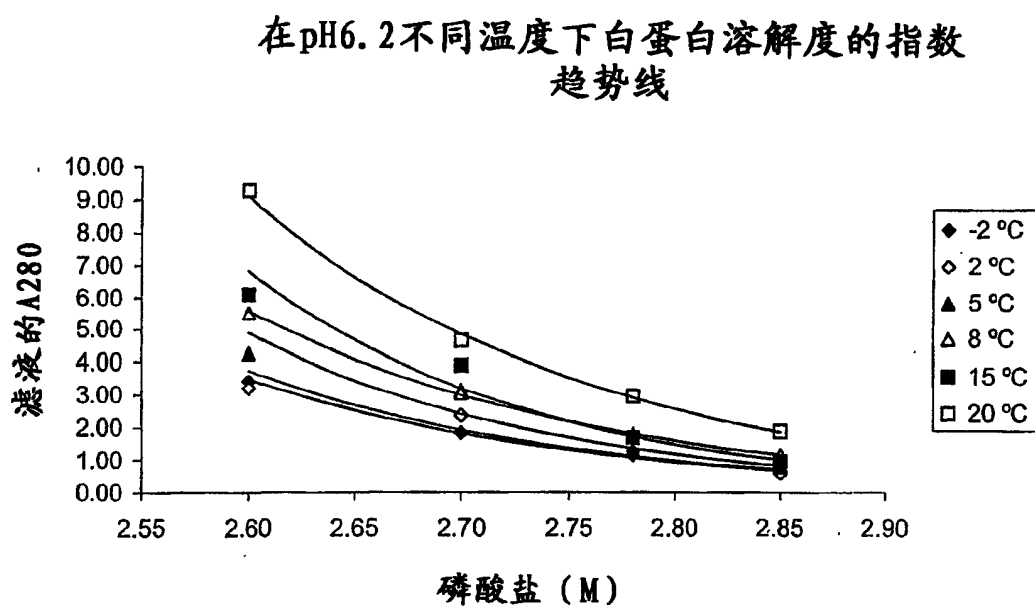


图2

在pH6.2不同温度下白蛋白溶解度的线性趋势线

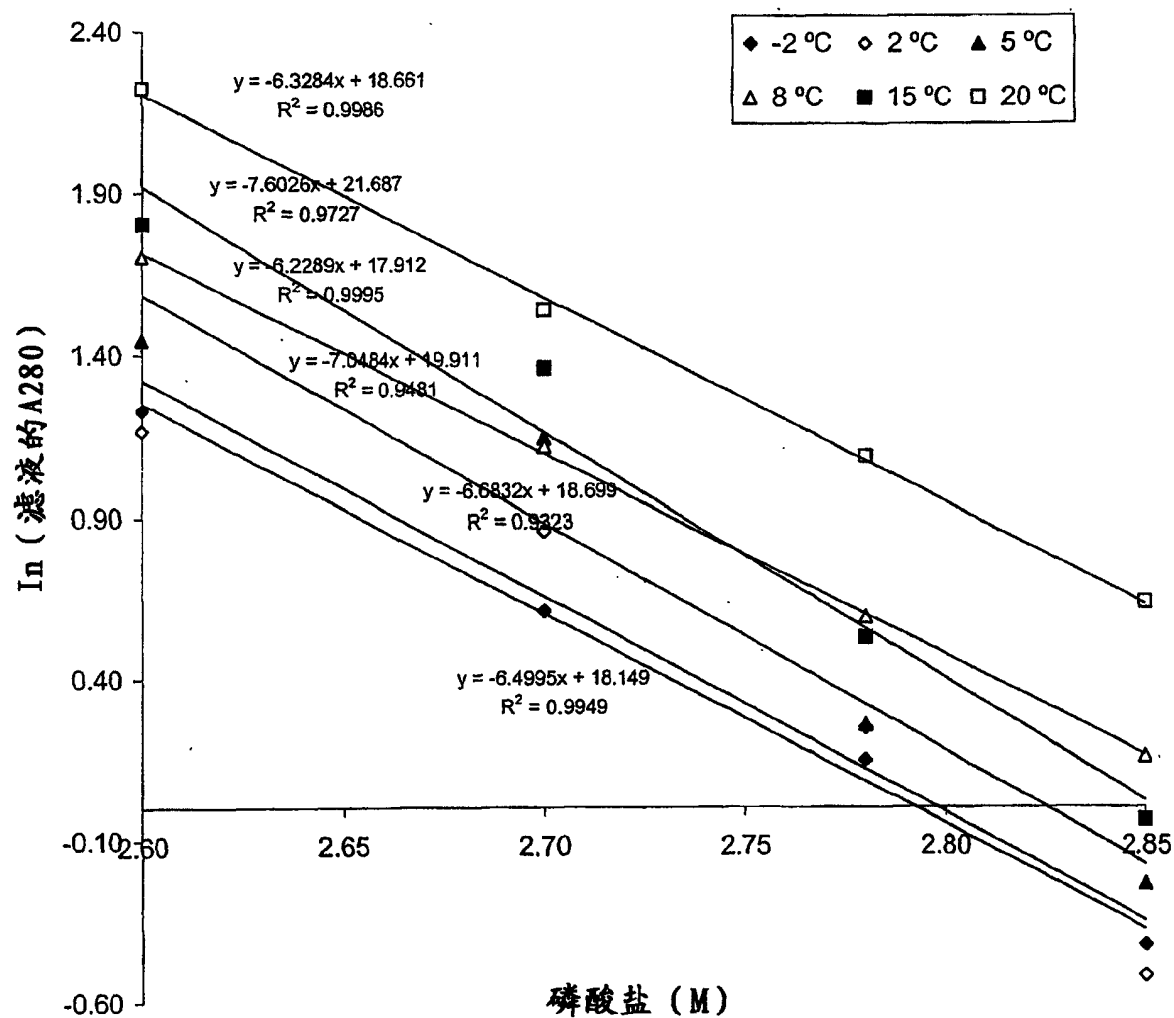


图3

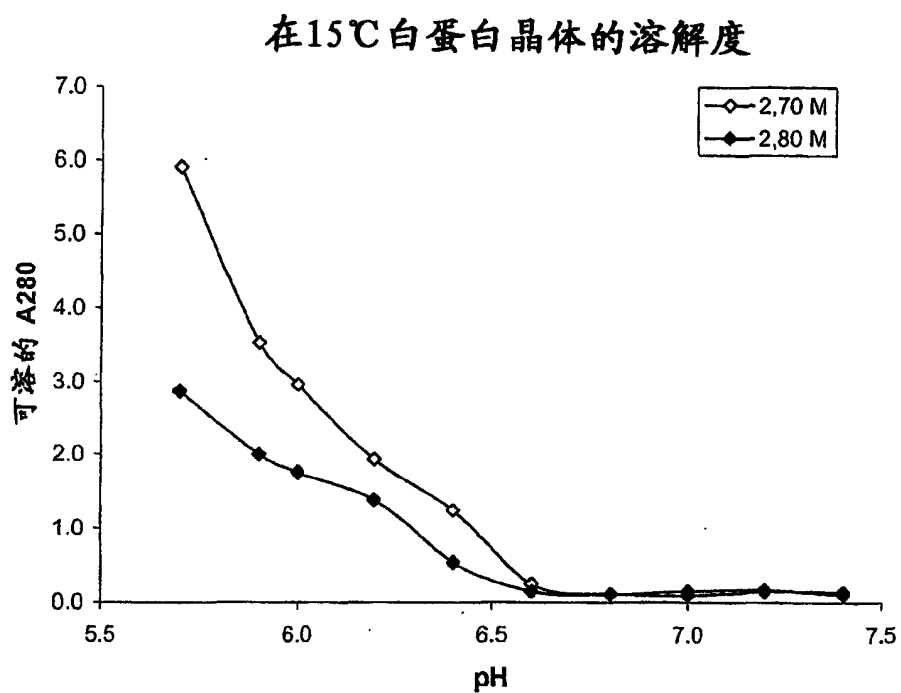


图4

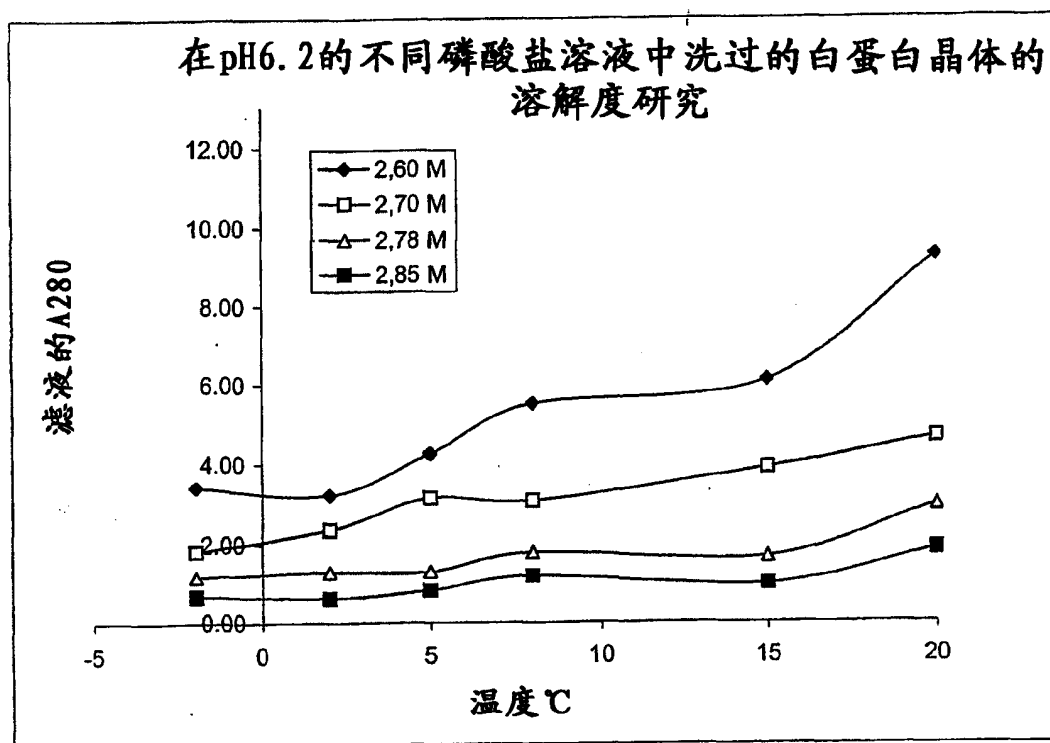


图5

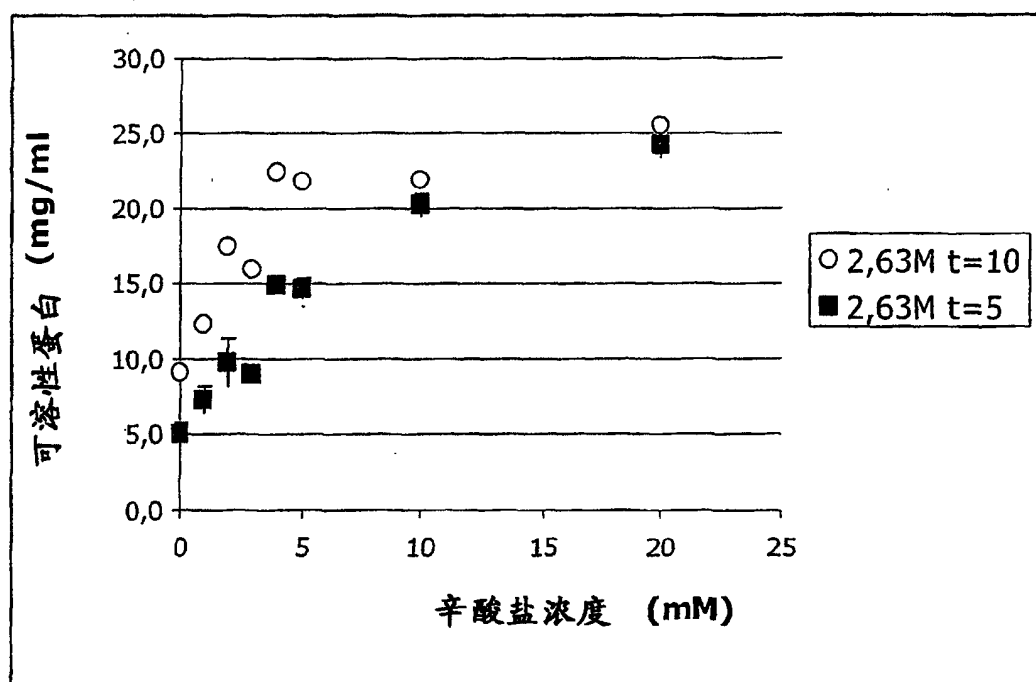


图6

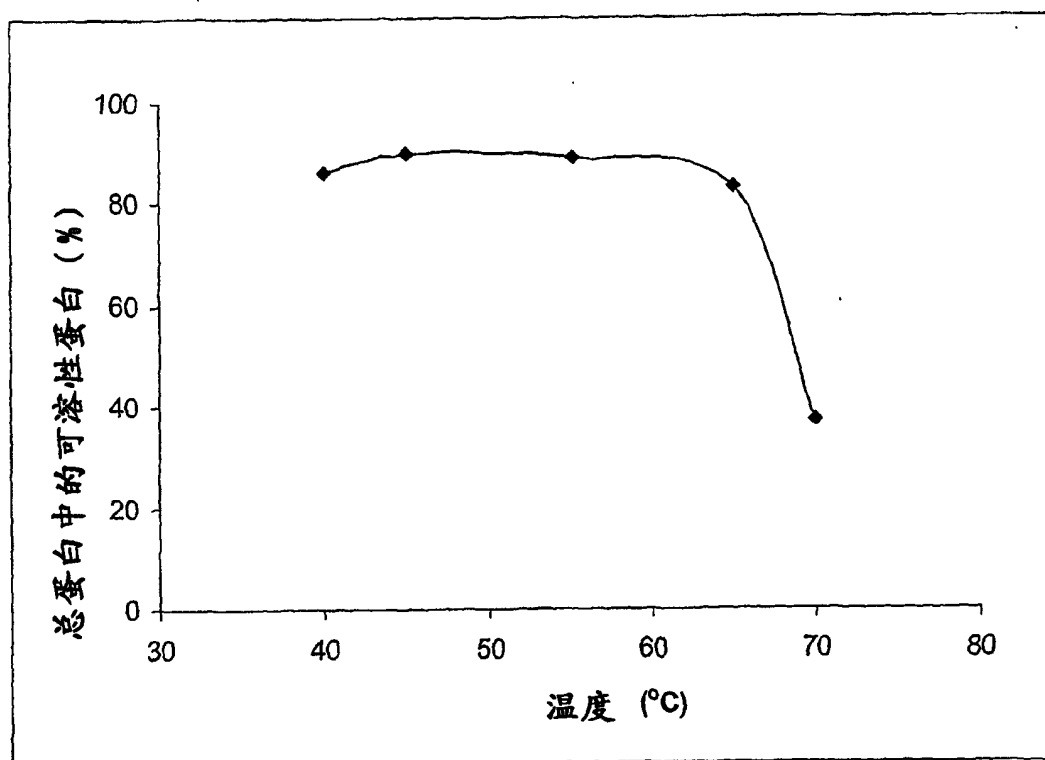


图7

白蛋白的制备性结晶的方法流程图

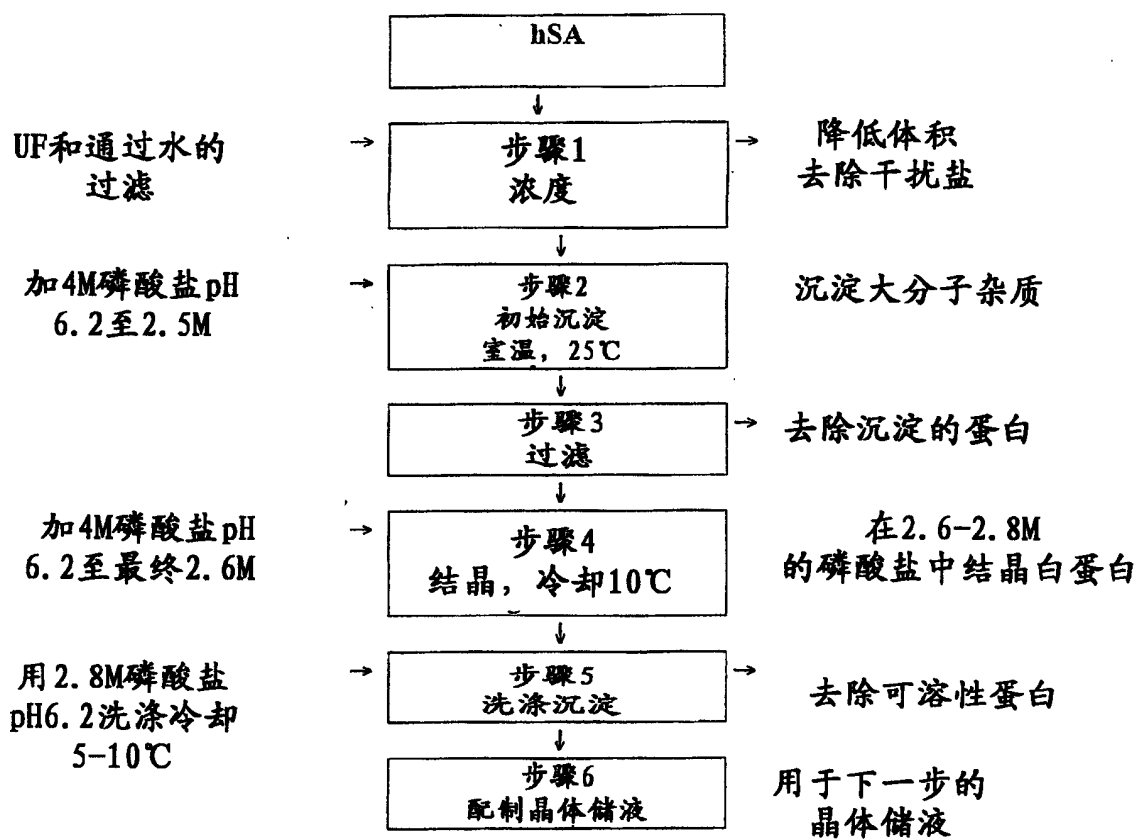


图8

重组人血清白蛋白结晶的方法流程图

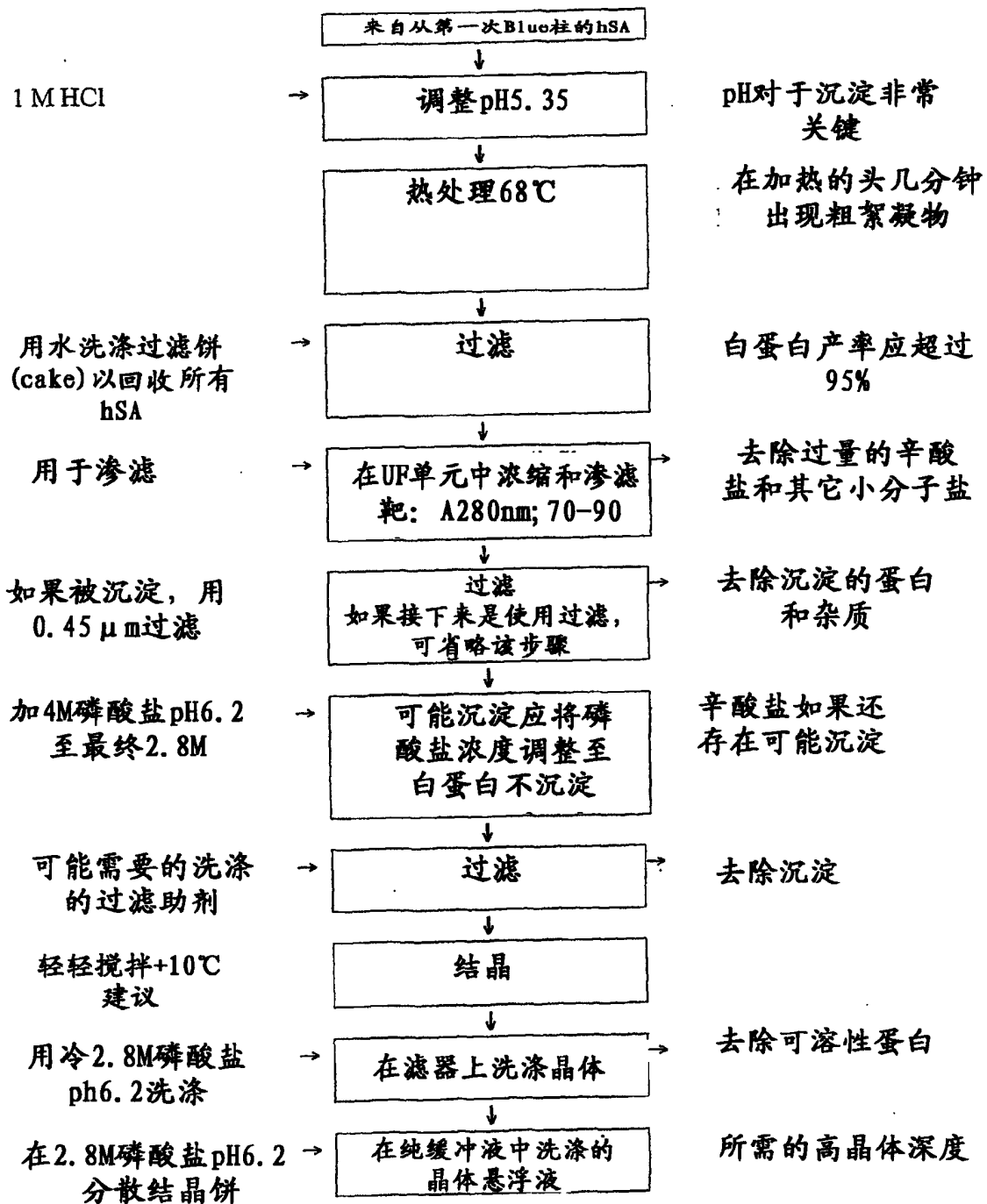


图9

重组人血清白蛋白的重结晶

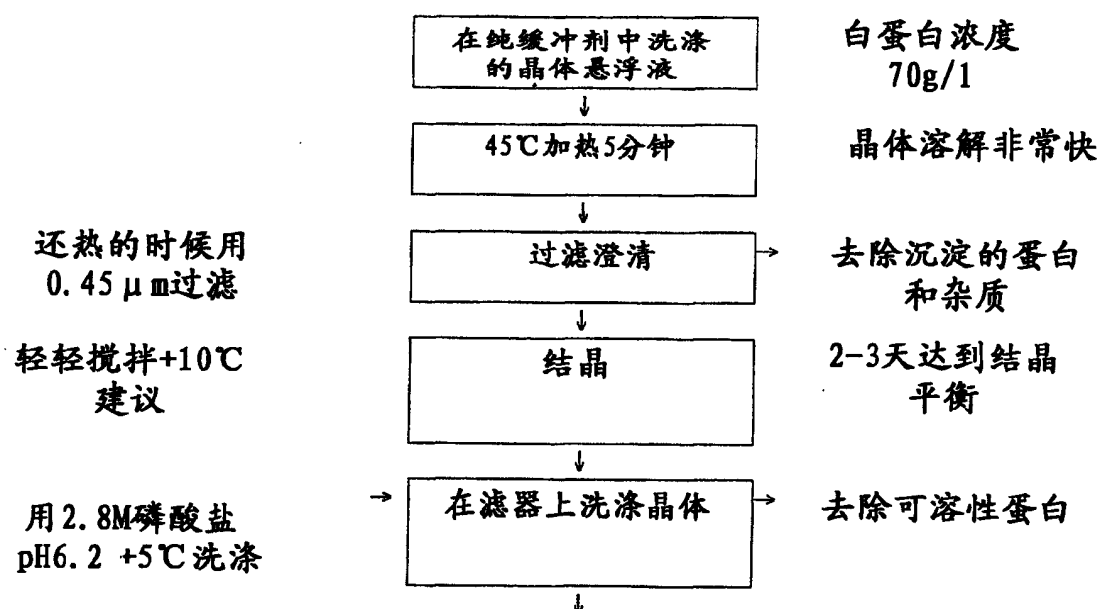


图10

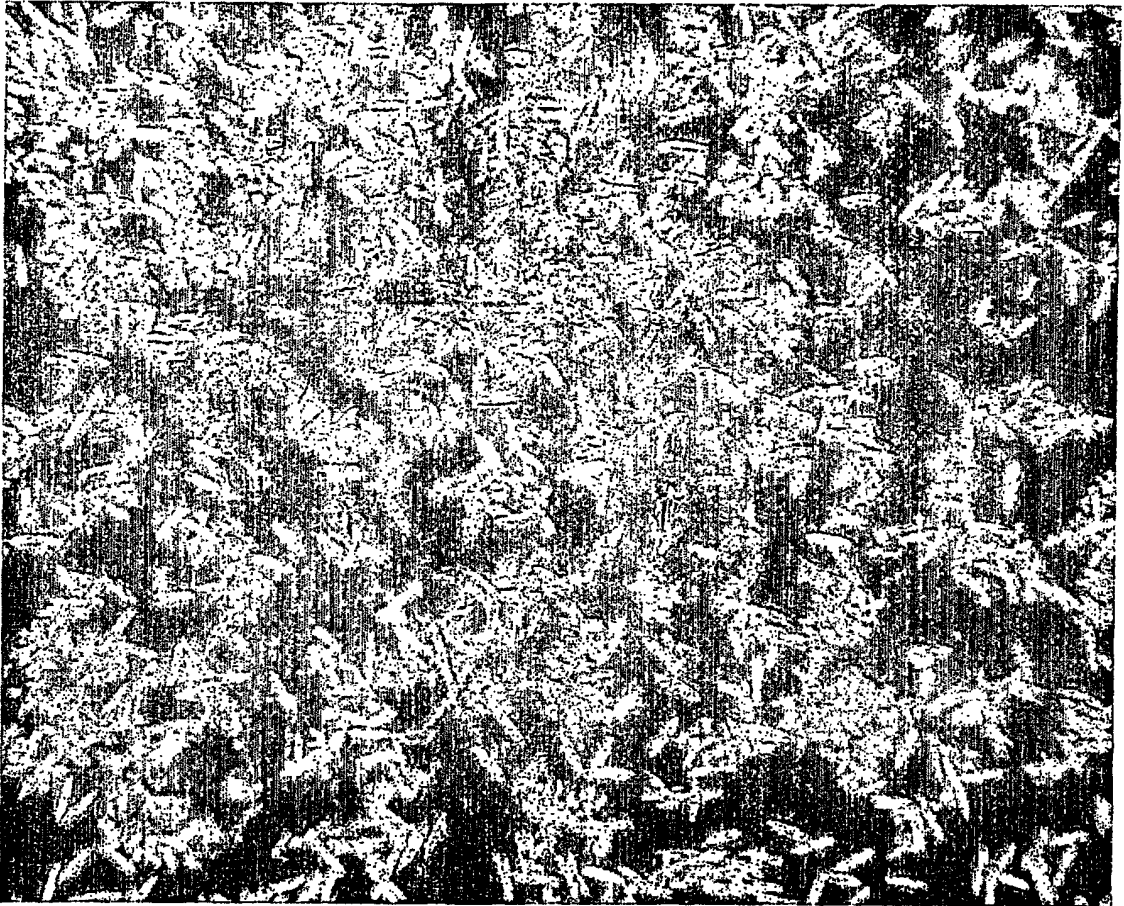


图 11

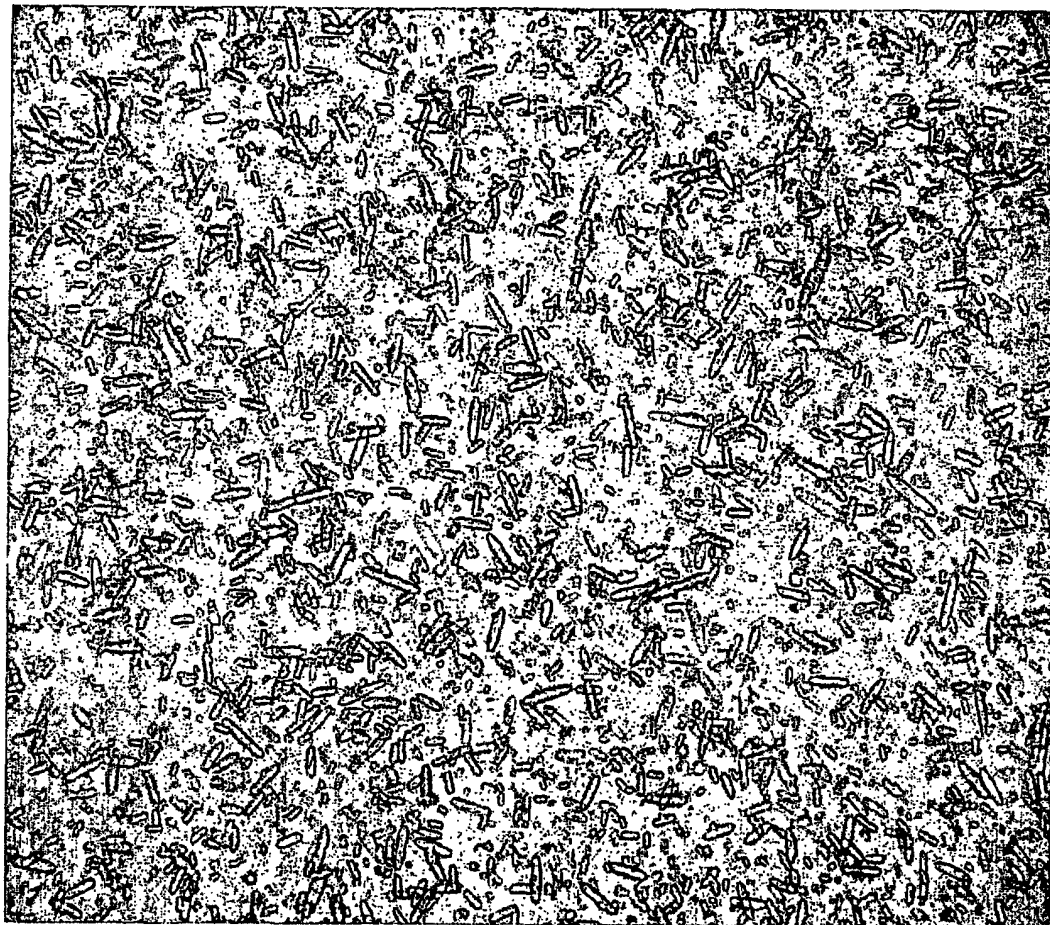


图 12

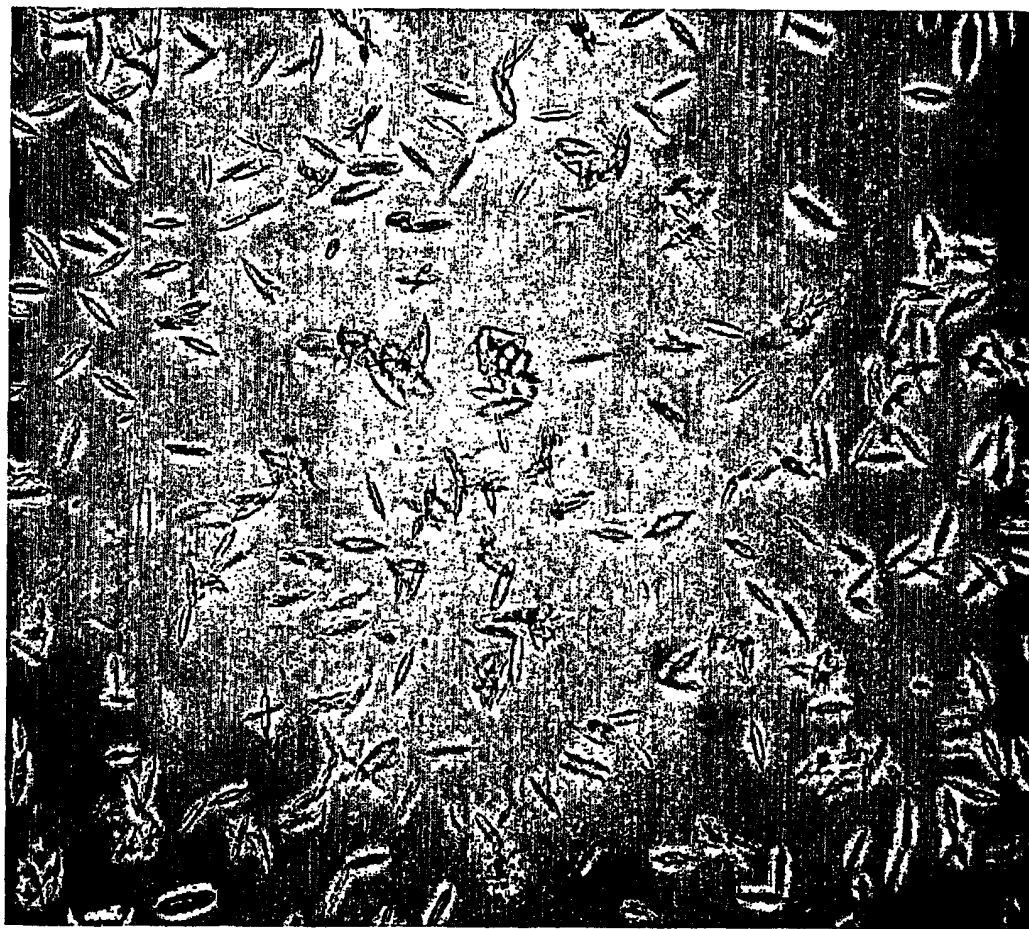


图13

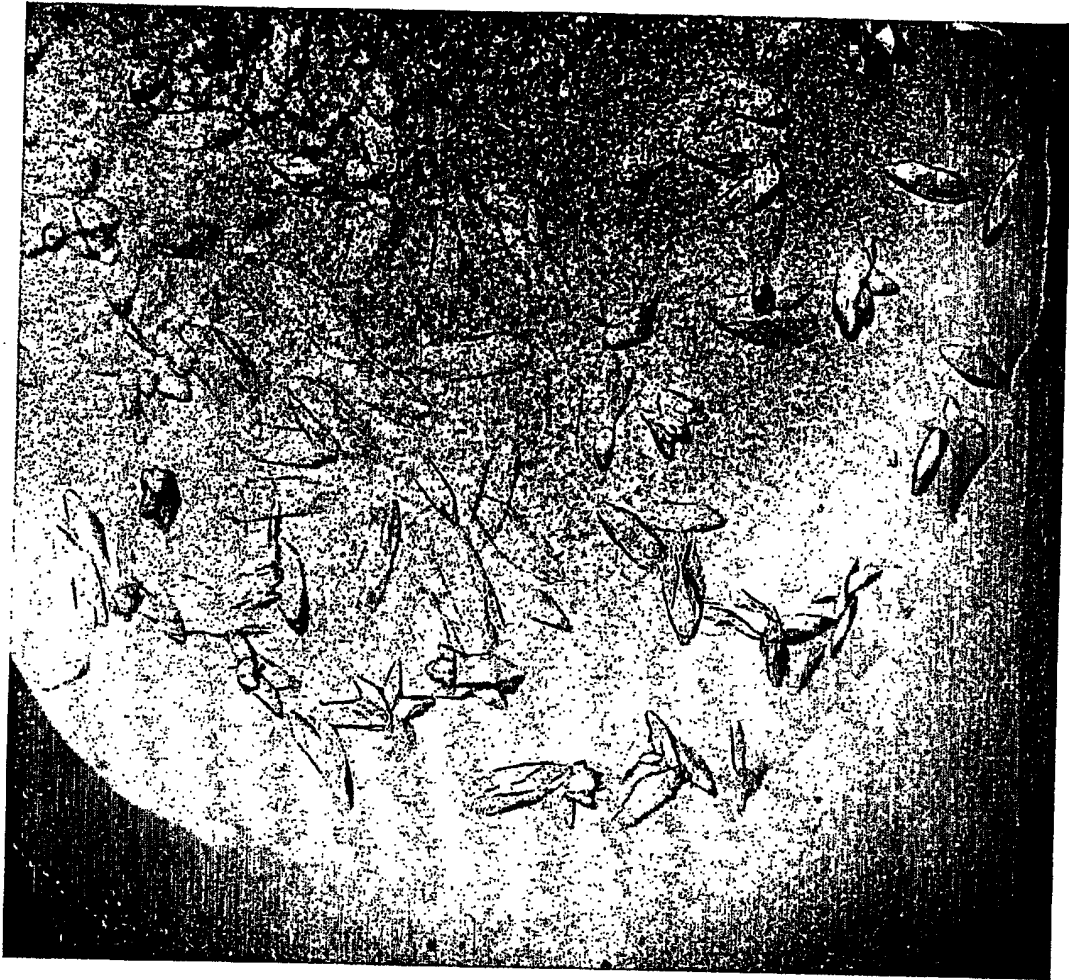


图 14