



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106103473 A

(43)申请公布日 2016.11.09

(21)申请号 201580012945.8

(22)申请日 2015.03.10

(30)优先权数据

1451997 2014.03.11 FR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.09.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2015/050598 2015.03.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/136217 FR 2015.09.17

(71)申请人 法国血液分割暨生化制品实验室

地址 法国莱尤里斯

(72)发明人 D·巴塔勒 A·施图鲁

P·圣安比恩

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 隋晓平 黄革生

(51)Int.Cl.

C07K 14/47(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/745(2006.01)

C07K 14/755(2006.01)

A61K 38/37(2006.01)

A61K 38/38(2006.01)

A61K 38/36(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

C07K 1/22(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

权利要求书4页 说明书21页 附图2页

(54)发明名称

制备人血浆蛋白的方法

(57)摘要

本发明涉及通过多柱色谱方法自血浆制备血浆蛋白浓缩物的方法。

1. 自血浆制备用于治疗用途的纯化的血浆蛋白浓缩物的方法,该方法包括对血浆或血浆成分进行多柱色谱的纯化步骤。

2. 权利要求1的方法,其中所述血浆成分选自冷沉淀的血浆上清液、再悬浮的血浆冷沉淀物、通过乙醇分馏的馏分I-V、采用辛酸和/或辛酸酯沉淀获得的上清液和沉淀物、通过色谱处理而没有保留的洗脱液或组分、滤液。

3. 权利要求1或2的方法,其中用于治疗用途的纯化的血浆蛋白浓缩物包括选自下列的血浆蛋白:免疫球蛋白、白蛋白、凝血因子,例如纤维蛋白原(因子I)、因子VII、因子VIII、因子IX、因子XI、因子XIII、血管性血友病因子、凝血酶原复合物或PPSB(因子II、VII、IX、X)、激活的凝血酶原复合物、生物粘附剂和蛋白酶抑制剂,例如 α -1抗胰蛋白酶、C1-酯酶抑制剂或抗凝血酶,单一或混合物形式、 α /巨球蛋白、抗胰凝乳蛋白酶、抗胰蛋白酶、Apo A、Apo B、Apo C、Apo D、Apo E、Apo F、Apo G、 β XIIa、C-反应蛋白、C7、C1r、C1s、C2C3、C4、C4bP、C5、C6、C1q、C8、C9、羧肽酶N、血浆铜蓝蛋白、因子B、因子D、因子H、纤连蛋白、触珠蛋白、血红素结合蛋白、肝素辅助因子II、组蛋白富集GP、激肽酶II、激肽原HPM、溶菌酶、PAI 2、PAI 1、PCI、纤溶酶、纤溶酶抑制剂、纤溶酶原、前白蛋白、前激肽释放酶、备解素、蛋白酶连接蛋白INH、蛋白C、蛋白S、蛋白Z、血清淀粉样蛋白(SAP)、TFPI、硫醇蛋白酶、血栓调节蛋白、组织因子(TF)、TPA、钴胺传递蛋白II、皮质素传递蛋白、转铁蛋白、玻连蛋白。

4. 前述权利要求中任一项的方法,其中用于治疗用途的纯化的血浆蛋白浓缩物为免疫球蛋白浓缩物。

5. 权利要求1-3中任一项的方法,其中用于治疗用途的纯化的血浆蛋白浓缩物为白蛋白和/或纤维蛋白原浓缩物。

6. 前述权利要求中任一项的方法,其中用于治疗用途的纯化的血浆蛋白浓缩物为纤维蛋白原和/或白蛋白和免疫球蛋白浓缩物。

7. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述多柱色谱为多柱亲和色谱。

8. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述血浆或冷沉淀的血浆上清液直接通过包括多柱亲和色谱的人免疫球蛋白的纯化步骤进行处理。

9. 权利要求8的方法,其中所述多柱亲和色谱的亲配体选自对IgG1、IgG2、IgG3和IgG4具有亲和性的配体。

10. 权利要求7-9中任一项的方法,其中所述多柱亲和色谱采用选自下列的亲配体:抗体、抗体片段、抗体衍生物、化学配体例如肽类、模拟肽类、类肽类、nanofitins和寡核苷酸配体,如寡核苷酸适配子。

11. 权利要求7-10中任一项的方法,其中所述多柱亲和色谱采用选自对消毒条件和/或与工业用途相匹配的多次重复利用有抗性的亲配体,特别是选自肽类、类肽类、nanofitins和寡核苷酸适配子。

12. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述多柱色谱为多柱离子交换色谱,例如多柱阴离子-或阳离子-交换色谱,或多柱疏水作用色谱,或多柱混合模式色谱或多柱排阻色谱。

13. 权利要求12的方法,其中所述多柱阴离子交换色谱在采用DEAE或TMAE或QAE基团接枝的交联多糖凝胶或乙烯基或丙烯酸聚合物凝胶上进行。

14. 权利要求13的方法,其中所述多柱阴离子交换和/或混合模式色谱在高度耐盐基质上进行以便于捕获在高盐度介质中的血浆蛋白,例如没有被色谱保留的血浆或成分。

15. 权利要求1—14中任一项的方法,其中对血浆或冷沉淀的血浆上清液直接进行人免疫球蛋白纯化的步骤,包括多柱阴离子交换色谱,任选将其中包含所述人免疫球蛋白的组分采用辛酸进行沉淀的后续步骤,并收集包含免疫球蛋白的上清液。

16. 权利要求1—15中任一项的方法,其中对血浆或冷沉淀的血浆上清液直接进行白蛋白和/或纤维蛋白原的纯化步骤,包括多柱亲和色谱或多柱阴离子交换色谱,任选将其中包含白蛋白和/或纤维蛋白原的组分采用辛酸进行沉淀的后续步骤,并收集包含白蛋白和/或纤维蛋白原的组分。

17. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述多柱色谱包括串联的3—8个柱,优选3—5个柱和/或其中多柱色谱柱为径向柱。

18. 前述权利要求中任一项的方法,该方法进一步包括至少一个下列步骤:

- 去脂和/或过滤步骤;
- 采用辛酸的沉淀步骤;
- 病毒灭活或消除步骤,任选包括进行溶剂-清洁剂处理和/或纳米过滤;
- 离子交换色谱步骤,特别是阴离子或阳离子交换色谱步骤,所述阴离子交换色谱步骤优选在采用DEAE或TMAE或QAE基团接枝的交联多糖凝胶或乙烯基聚合物凝胶上进行;
- 抗A和抗B抗体消除步骤,特别是通过亲和色谱进行消除,例如多柱亲和色谱;
- 通过超滤进行浓缩的步骤;
- 配制步骤。

19. 前述权利要求中任一项的方法,该方法还包括配制步骤,包括向有治疗用途的纯化的血浆蛋白浓缩物中加入一或多种药学上可接受的稳定剂,任选还包括在配制步骤结束时将获得的药物制剂冷冻或冷冻干燥的步骤。

20. 前述权利要求中任一项的方法,该方法依次包括:

- (a)采用溶剂/清洁剂对血浆进行灭活的第一步骤;
- (b)通过多柱亲和色谱对步骤(a)中获得的灭活的血浆的免疫球蛋白进行纯化的步骤;然后
- (c)任选地将获自步骤(b)的免疫球蛋白浓缩物中的抗A和抗B抗体消除的步骤,特别是通过亲和色谱进行消除;随后
- (d)任选地通过纳米过滤对获自步骤(b)或(c)的免疫球蛋白浓缩物进行第二个病毒消除步骤;以及
- (e)向获自步骤(b)、(c)或(d)的免疫球蛋白浓缩物中加入一或多种药学上可接受的稳定剂的步骤。

21. 前述权利要求中任一项的方法,该方法依次包括:

- (a')通过多柱亲和色谱对冷沉淀的血浆上清液中的免疫球蛋白进行纯化的步骤;然后
- (b')采用溶剂/清洁剂对获自步骤(a')的免疫球蛋白浓缩物进行灭活的第一个步骤;随后
- (c')任选地将获自步骤(b')的免疫球蛋白浓缩物中的抗A和抗B抗体消除的步骤,特别是通过亲和色谱进行消除;随后
- (d')任选地通过纳米过滤对获自步骤(b')或(c')的免疫球蛋白浓缩物进行第二个病毒消除步骤;以及

(e')向获自步骤(b')、(c')或(d')的免疫球蛋白浓缩物中加入一或多种药学上可接受的稳定剂的步骤。

22. 前述权利要求中任一项的方法,该方法依次包括:

(A)采用乙醇和/或辛酸对冷沉淀的血浆上清液进行分馏的步骤;随后

(B)任选地采用溶剂/清洁剂对步骤(A)中获得的溶液进行病毒灭活或消除的第一个步骤;随后

(C)通过多柱阴离子交换色谱对步骤(A)或(B)中获得的溶液进行免疫球蛋白纯化的步骤;随后

(D)任选地在步骤(C)结束时对获得的免疫球蛋白浓缩物中的抗A和抗B抗体进行消除的步骤,特别是通过亲和色谱进行消除;随后

(E)任选地通过纳米过滤对获自步骤(C)或(D)的免疫球蛋白浓缩物进行第二个病毒消除步骤;以及

(F)向获自步骤(C)、(D)或(E)的免疫球蛋白浓缩物中加入一或多种药学上可接受的稳定剂的步骤。

23. 前述权利要求中任一项的方法,该方法包括对血浆或冷沉淀的血浆上清液进行下列处理的步骤:

-多柱亲和色谱,其中至少一个亲和配体特异性地与免疫球蛋白结合,在结束时收集含有免疫球蛋白的组分;和/或

-通过多柱离子交换色谱或疏水作用或化学配体结合的多柱色谱(多模式),在结束时收集含有纤维蛋白原和/或白蛋白的组分,

并任选采用辛酸对含有纤维蛋白原和/或白蛋白的组分进行沉淀的后续纯化步骤,

和/或任选至少一个下列的后续步骤:

-病毒灭活或病毒消除步骤,

-离子交换色谱步骤,

-抗A和抗B抗体消除步骤,特别是通过亲和色谱进行消除,

-通过超滤进行的浓缩步骤,

-配制步骤。

24. 前述权利要求中任一项的方法,其中首先通过将血浆在-10℃至-40℃沉淀获得冷沉淀的血浆上清液,然后于0℃至+1℃之间缓慢融化,随后将融化的血浆离心以便于分离冷沉淀物和上清液。

25. 前述权利要求中任一项的方法,其中将血浆或冷沉淀的血浆上清液直接经第一个多柱色谱进行处理以便于捕获第一份血浆蛋白,然后将其中在第一个多柱色谱没有保留的组分经第二个多柱色谱进行处理以便于捕获第二份血浆蛋白。

26. 前述权利要求中任一项的方法,其中将在第二个多柱色谱没有保留的组分经第三个色谱进行处理,优选多柱色谱进行处理,或者经沉淀步骤处理,以便于纯化第三份血浆蛋白。

27. 前述权利要求中任一项的方法,其中多柱亲和或离子交换色谱保留的组分为目标血浆蛋白,优选纤维蛋白原和/或白蛋白,任选洗脱所述目标血浆蛋白。

28. 前述权利要求中任一项的方法,其中多柱亲和或离子交换色谱保留的组分含有杂

质,未保留的组分含有目标蛋白,优选白蛋白和/或纤维蛋白原。

29.分馏血浆的方法,该方法包括将血浆或冷沉淀的血浆上清液或血浆成分直接进行下列处理的步骤:

- 多柱亲和色谱,其中至少一个亲和配体是特异性地与免疫球蛋白结合的配体,在结束时收集含有免疫球蛋白的组分;和

- 任选具有高度耐盐性的多柱离子交换色谱或多柱色谱,在结束时收集含有白蛋白和/或纤维蛋白原的组分;并且任选

- 通过沉淀和/或色谱,对前述多柱色谱没有保留的含有纤维蛋白原和/或白蛋白的组分进行纯化的步骤。

30.分馏血浆的方法,该方法包括将血浆或冷沉淀的血浆上清液或血浆成分直接进行下列处理的步骤:

- 多柱亲和色谱,其中至少一个亲和配体是特异性地与免疫球蛋白结合的配体,在结束时收集含有免疫球蛋白的组分;和/或

- 多柱亲和色谱,其中至少一个亲和配体是特异性地与纤维蛋白原结合的配体,在结束时收集含有纤维蛋白原的组分;和/或

- 多柱亲和色谱,其中至少一个亲和配体是特异性地与白蛋白结合的配体,在结束时收集含有白蛋白的组分。

31.权利要求26—29中任一项的分馏方法,其中与免疫球蛋白结合的多柱亲和色谱在与白蛋白和/或纤维蛋白原结合的多柱色谱的上游进行。

32.免疫球蛋白浓缩物,其免疫球蛋白分布特征与血浆中免疫球蛋白分布特征相似或相同。

33.权利要求32的免疫球蛋白浓缩物,其中所述浓缩物为免疫球蛋白G浓缩物,其含有50—70%的IgG1、25—35%的IgG2、2—8%的IgG3和1—8%的IgG4。

34.免疫球蛋白浓缩物,其所有抗原成分与血浆中所有抗原成分相似或相同。

35.权利要求34的免疫球蛋白浓缩物,其特征在于所述浓缩物的所有抗原成分与现有技术的浓缩物的所有抗原成分相似和/或优于现有技术的浓缩物的所有抗原成分。

制备人血浆蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及自血浆或血浆成分制备用于治疗用途的人血浆蛋白的方法。

背景技术

[0002] 许多病理目前采用富含一或多种血浆蛋白的血浆成分治疗。因此,在替代疗法中通常采用凝血因子预防或治疗与凝血因子缺乏相关的出血。纤维蛋白原最常被处方用于治疗与先天性或严重无纤维蛋白原血症相关的并发症以及与低纤维蛋白原血症相关的出血综合征或出血风险。白蛋白用于恢复并维持循环血量(确诊的血量过低)。同样,许多病理目前采用富含免疫球蛋白的血浆成分治疗,特别是富含免疫球蛋白G(IgG),通常含有95%以上的Ig。

[0003] 例如,富含免疫球蛋白G或IgG浓缩物的血浆成分可以用于修正原发性免疫缺陷缺乏抗体的产生以及某些继发性免疫缺陷,例如白血病、骨髓瘤或复发性感染等。Ig的给药在下列疾病的治疗中也可以发挥有益的作用:青少年和成人特发性血小板减少性紫癜(ITP)、格林巴利综合征(Guillain-Barré syndrome)、脱髓鞘性多发性神经病变、多灶性运动神经病、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、川崎病、多发性硬化症、激素耐药性皮炎、急性肌无力、Birdshot视网膜脉络膜炎、由于胎儿-母亲ABO不相容导致的新生儿黄疸(由于ABO不相容导致的新生儿溶血性疾病)等。

[0004] 多种治疗适应症以及在某些情况下可以处方的极高剂量(多达2g的免疫球蛋白/kg/天)导致了供应的极度紧张,在欧洲和美国几乎出现了断货的情况。

[0005] 同样,已经开发了许多方法用于自血浆中纯化血浆蛋白。使其能够提取细血浆蛋白用于治疗用途的工业化方法被称为“血浆分馏法(plasma fractionation)”。现今使用的分馏技术通常自冷沉淀步骤开始,包括于低温下融化血浆以便于分离富含因子VIII、血管性血友病因子、纤维蛋白原和纤连蛋白的冷凝固蛋白。随后,上清液部分(冷上清液)的蛋白可以通过在乙醇存在下的连续沉淀进行分离(Cohn等,1946,J. Am. Chem. Soc. 68, 459)。

[0006] 同样还描述了采用乙醇分馏的经典Cohn方法的多个变通方法。因此,Tanaka K.等,2000(Braz J Med Bio Res 2000,33(1):27-30)的文章描述了用于纯化免疫球蛋白G的方法:采用根据Cohn方法的乙醇分馏后获得的“I+II+III”和“II+III”组分作为原料,通过三种类型的凝胶、二种离子交换凝胶进行色谱分离(Q-Sepharose FF和Cm-Sepharose FF)以及凝胶过滤步骤(Sephacryl S-300HR)。

[0007] 乙醇沉淀的替代路线已经经Steinbuch等报道(Rev. Franc. Et. Clin. and Biol. 1969, XIV, 1054),其采用辛酸(或辛酸/辛酸酯)沉淀。后者可以自血浆中沉淀大部分蛋白并且在上清液中保留免疫球蛋白。这些免疫球蛋白的纯化通过在阴离子交换树脂DEAE-纤维素上吸附(以“批次”的形式)进行,其也可以将免疫球蛋白留在上清液中。然后,后者可以通过超滤浓缩。

[0008] 然而,这些乙醇或辛酸沉淀物使得蛋白发生一定程度的变性并形成蛋白聚集物(特别是免疫球蛋白聚合物),这可以导致过敏反应。因此,必须进行后续处理步骤,例如采

用丙内酯或者采用还原剂和烷化剂或者于pH 4或者采用PEG来沉淀聚集物。这些额外的步骤有可能降低血浆蛋白收率。

[0009] 因此,大多数生产方法要求IgG收率为每升分馏的血浆含有3.5—5.5g的IgG(“一种具有高收率和有效病毒清除的用于自人血浆生产免疫球蛋白G的改良辛酸方法(A modified carpylic acid method for manufacturing immunoglobulin G from human plasma with high yield and efficient virus clearance)”-Vox Sang.2006Feb;90(2):97—104和“一种采用两阶段病毒灭活过程生产多价静脉注射免疫球蛋白溶液的新方法(A new methodology for polyvalent intravenous immunoglobulin solution production with a two-stage process of viral inactivation)”-Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol.46,n.4,Oct./Dec.,2010)。

[0010] 此外,乙醇分馏的使用相对昂贵。的确,1升血浆需要使用2升乙醇。因此,为了处理数千升血浆,在生产场地必须储备大量的乙醇,还必须冷却该系统以便于进行乙醇分馏。此外,工业设施必须适合于储存、处理、销毁以及有可能需要回收大量的溶剂,这些造成了严重的技术障碍和巨额的费用。

[0011] 血浆蛋白的纯度是保证使用期间疗效和安全性最好的关键指标。因此,乙醇或辛酸分馏必须通过其它纯化步骤加以补充以便于获得需要的纯度,但是由于产品额外的损失这些操作不利于获得较好的收率。就这些额外的步骤而言,色谱技术越来越多地被使用,因为它们特征在于高度的纯化以及高收率。因此,在最初的血浆处理中尽可能地采用这些色谱技术以便于提高收率和纯度,同时保留目标蛋白的完整性。这已经应用于捕获相对匮乏的血浆蛋白,例如因子XI、因子IX、因子VIII、血管性血友病因子(von Willebrand factor)、蛋白C、抗凝血酶III等。但是对于高丰度蛋白例如多价免疫球蛋白、白蛋白和纤维蛋白原而言,捕获这些分子所需要的色谱凝胶的量会非常大,导致工业设备无法盈利(设备大小和凝胶的成本高昂)。尽管某些文献描述了将用于处理大量蛋白的色谱循环进行叠加(accumulation)(“用于制备人血浆白蛋白的工业色谱单元的说明和评价(Description and assessment of an industrial chromatography unit for preparing human plasma albumin)”-Biotechnology of Blood Proteins1993,第227卷,第176—181页),但是这些方法都不是最佳的,开发的也不好。

[0012] 因此,仍然急需增加用于治疗用途的血浆蛋白的生产收率的方法,特别是免疫球蛋白、白蛋白和/或纤维蛋白原,同时保证最终产品的高纯度并且不含可能有害的杂质。

发明内容

[0013] 发明概述

[0014] 一般而言,本发明涉及以高收率制备纯化的人血浆蛋白组分的方法,所述收率特别是高于本领域技术人员已知的方法的收率。为此,申请人开发了自血浆制备纯化的人血浆蛋白浓缩物的方法,该方法包括至少一个通过多柱色谱的纯化步骤,特别是通过多柱亲和或离子交换色谱或疏水作用或化学配体结合的多柱色谱(多模式(multi-modal))。更确切地说,本发明的方法建议通过下列方法实施色谱步骤,即将常用的色谱柱分为多个较小的柱,其可以串联放置或者各自独立控制。一方面,采用多柱色谱的此类步骤使其能够最大程度地利用色谱凝胶上的官能团,另一方面,使其能够极大地减少每一血浆蛋白制备批次

所使用的色谱凝胶的体积。

[0015] 本发明还涉及以高于本领域技术人员已知方法的收率制备人免疫球蛋白(Ig)浓缩物的方法。为此,申请人开发了制备纯化的Ig的方法,其中最初的采用乙醇和/或辛酸的分馏步骤被采用多柱色谱的捕获步骤所替代,特别是多柱亲和或离子交换色谱或采用疏水作用或化学配体结合的多柱色谱(多模式)。在色谱处理之前没有进行消除蛋白杂质的步骤。将血浆或血浆冷沉淀上清液直接经多柱色谱处理。如果多柱色谱是阴离子交换色谱,那么本发明的方法最好包括采用辛酸和/或乙醇的分馏步骤,随后经上述色谱处理。

[0016] 因此,本发明涉及自血浆制备用于治疗用途的纯化的血浆蛋白浓缩物的方法,该方法包括将血浆或血浆成分经多柱色谱处理的纯化步骤。

[0017] 具体地讲,本发明涉及自血浆制备用于治疗用途的人免疫球蛋白浓缩物的方法,该方法包括将血浆或冷沉淀的血浆上清液经多柱亲和色谱处理进行免疫球蛋白纯化的步骤。

[0018] 在另一个示例性实施方案中,所述免疫球蛋白纯化步骤通过使得血浆或冷沉淀的血浆上清液经过多柱阴离子交换色谱处理而实施。随后可以进行后续的辛酸沉淀步骤,该步骤结束时收集含有免疫球蛋白的上清液。

[0019] 本发明还涉及自血浆制备用于治疗用途的人白蛋白和/或纤维蛋白原浓缩物的方法,该方法包括将血浆或冷沉淀的血浆上清液经多柱色谱处理进行白蛋白和/或纤维蛋白原纯化的步骤,特别是多柱亲和或离子交换色谱或者通过疏水作用或化学配体结合的多柱色谱(多模式)。

[0020] 根据本发明的一个特别的实施方案,多柱亲和或离子交换色谱能够捕获目标蛋白(纤维蛋白原和/或白蛋白),然后可以将其洗脱出来。根据本发明的另一个特别的实施方案,多柱亲和或离子交换色谱能够捕获杂质以便于收集未保留组分中的目标蛋白(白蛋白和/或纤维蛋白原)。根据本发明,此类方法还可以包括后续的其他步骤,其中将含有白蛋白和/或纤维蛋白原的组分经过沉淀进行纯化的步骤,在该步骤结束时所述杂质保留在溶液中。

[0021] 一般而言,根据本发明,有可能通过多柱色谱直接自下列成分进行用于治疗用途的血浆蛋白的纯化步骤:人血浆、冷沉淀上清液或乙醇或辛酸组分(任选病毒安全)或者通过中间纯化步骤获得的任何产物,特别是通过过滤、其它色谱或多柱色谱等获得的产物。

[0022] 在本发明的一个特别的实施方案中,冷沉淀的血浆上清液或血浆可以直接经过第一个多柱色谱处理以便于捕获一种血浆蛋白,然后可以将在该色谱上未保留组分经过第二个多柱色谱处理以便于捕获第二种血浆蛋白。

[0023] 随后,可以将第二个多柱色谱上未保留的组分经过色谱(特别是多柱色谱)处理或者经过沉淀步骤以便于纯化第三种血浆蛋白。

[0024] 在一个特别的示例性实施方案中,本发明的方法在于自血浆制备用于治疗用途的白蛋白和/或纤维蛋白原浓缩物,该方法包括通过多柱亲和或离子交换色谱处理冷沉淀的血浆上清液的纯化步骤,任选随后进行存在于含有白蛋白和/或纤维蛋白原的组分中的杂质的消除步骤,例如上述组分采用乙醇沉淀。在另一个示例性实施方案中,通过多柱离子交换色谱或疏水作用或化学配体结合的多柱色谱(多模式)的纯化步骤采用无免疫球蛋白血浆成分进行。有利地是,制备白蛋白和/或纤维蛋白原浓缩物的方法在制备免疫球蛋白浓缩

物之后进行,该方法任选通过多柱色谱进行,使用在所述方法结束时收集的血浆成分。

[0025] 因此,本发明还涉及分馏血浆的方法,该方法包括直接将血浆或冷沉淀的血浆上清液依次进行下列处理的步骤:

[0026] -多柱离子交换色谱或疏水作用或化学配体结合的多柱色谱(多模式(multi-modal)),在该处理结束时收集含有免疫球蛋白的组分;随后

[0027] -多柱离子交换色谱或疏水作用或化学配体结合的多柱色谱(多模式),在该处理结束时收集含有白蛋白的组分;随后

[0028] -多柱离子交换色谱或疏水作用或化学配体结合的多柱色谱(多模式),在该处理结束时收集含有纤维蛋白原的组分。

[0029] 可任选改变这三个步骤的顺序以便于促进相对于所需其它二种蛋白的另一种蛋白的提取。

[0030] 因此,本发明还涉及分馏血浆的方法,该方法包括直接将血浆或冷沉淀的血浆上清液依次进行下列处理的步骤:

[0031] -多柱离子交换色谱或疏水作用或化学配体结合的多柱色谱(多模式),在该处理结束时收集含有免疫球蛋白的组分;随后

[0032] -多柱离子交换色谱或疏水作用或化学配体结合的多柱色谱(多模式),在该处理结束时收集含有纤维蛋白原的组分;随后

[0033] -多柱离子交换色谱或疏水作用或化学配体结合的多柱色谱(多模式),在该处理结束时收集含有白蛋白的组分。

[0034] 因此,血浆成分可以依次经过三种多柱色谱处理,在处理结束时依次收集免疫球蛋白、白蛋白和随后的纤维蛋白原,或者采用另一种顺序。

[0035] 在一个特别的示例性实施方案中,本发明的方法在于自血浆制备用于治疗用途的免疫球蛋白浓缩物的方法,该方法依次包括:

[0036] (a)采用物理化学方法处理血浆的第一个病毒灭活或消除步骤,例如采用溶剂/清洁剂或单独采用清洁剂或者单独采用溶剂进行处理,不限于相关步骤的可能的组合;

[0037] (b)通过多柱亲和色谱将步骤(a)中获得的灭活血浆的冷沉淀的血浆上清液纯化的步骤;

[0038] (c)任选地将获自步骤(b)的免疫球蛋白浓缩物中的抗血凝素抗体消除的步骤,特别是通过多柱抗A和抗B亲和色谱消除;

[0039] (d)任选地通过将获自步骤(b)或(c)的免疫球蛋白浓缩物进行纳米过滤进行第二个病毒灭活或消除步骤;和

[0040] (e)向获自步骤(b)、(c)或(d)的免疫球蛋白浓缩物中加入一或多种药学上可接受的稳定剂的步骤。

[0041] 在另一个特别的示例性实施方案中,本发明的方法在于自血浆制备用于治疗用途的免疫球蛋白浓缩物的方法,该方法依次包括:

[0042] (a')通过多柱亲和色谱纯化冷沉淀的血浆上清液的步骤;然后

[0043] (b')通过对获自步骤(a')的免疫球蛋白浓缩物采用清洁剂/溶剂进行灭活或消除病毒的第一个步骤;随后

[0044] (c')任选地将获自步骤(b')的免疫球蛋白浓缩物中的抗A和抗B抗体消除的步骤,

特别是通过多柱亲和色谱消除；随后

[0045] (d')任选地对获自步骤(b')或(c')的免疫球蛋白浓缩物进行纳米过滤进行第二个病毒灭活或消除步骤；和

[0046] (e')向获自步骤(b')、(c')或(d')的免疫球蛋白浓缩物中加入一或多种药学上可接受的稳定剂的步骤。

[0047] 在另一个特别的示例性实施方案中，本发明的方法在于自血浆制备用于治疗用途的免疫球蛋白浓缩物的方法，该方法依次包括：

[0048] (A)采用乙醇和/或辛酸对冷沉淀的血浆上清液进行分馏的步骤；

[0049] (B)任选地对步骤(A)中获得的溶液采用溶剂/清洁剂进行病毒灭活或消除的第一个步骤；

[0050] (C)将步骤(A)或(B)中获得的溶液经多柱阴离子交换色谱进行纯化的步骤；

[0051] (D)任选地将在步骤(C)结束时获得的免疫球蛋白浓缩物中的抗A和抗B抗体消除的步骤，特别是通过多柱亲和色谱消除；

[0052] (E)任选地通过将步骤(C)或(D)结束时获得的免疫球蛋白浓缩物进行纳米过滤的第二个病毒灭活或消除步骤；和

[0053] (F)向获自步骤(C)、(D)或(E)的免疫球蛋白浓缩物中加入一或多种药学上可接受的稳定剂的步骤。

[0054] 本发明还涉及分馏血浆的方法，该方法包括直接将血浆或冷沉淀的血浆上清液进行下列处理的步骤：

[0055] -多柱亲和色谱，其中至少一个亲和配体是能够特异性地与免疫球蛋白结合的配体，在结束时收集含有免疫球蛋白的组分；和/或

[0056] -多柱离子交换色谱或者疏水作用或化学配体结合的多柱色谱(多模式)，称为混合模式色谱，其任选为高耐盐性色谱，在结束时收集含有纤维蛋白原和/或白蛋白的组分。

[0057] 本发明还涉及分馏血浆的方法，该方法包括直接将血浆或冷沉淀的血浆上清液进行下列处理的步骤：

[0058] -多柱亲和色谱，其中至少一个亲和配体是能够特异性地与免疫球蛋白结合的配体，在结束时收集含有免疫球蛋白的组分；和/或

[0059] -多柱亲和色谱，其中至少一个亲和配体是能够特异性地与纤维蛋白原结合的配体，在结束时收集含有纤维蛋白原的组分；和/或

[0060] -多柱离子交换色谱或者疏水作用或化学配体结合的多柱色谱(多模式)，称为混合模式色谱，其任选为高耐盐性色谱，在结束时收集含有白蛋白的组分。

[0061] 有利地是，首先进行靶向免疫球蛋白的多柱亲和色谱，然后对获自该第一个分馏步骤并且没有(depleted of)免疫球蛋白G的组分进行靶向纤维蛋白原和/或白蛋白的多柱亲和和离子交换色谱或多种色谱(chromatographies)。用于捕获白蛋白的多柱色谱最好在第三位置进行。

[0062] 本发明还涉及免疫球蛋白G浓缩物，其免疫球蛋白分布特征与血浆中免疫球蛋白分布特征相似或相同。

[0063] 优选本发明的免疫球蛋白浓缩物为IgG免疫球蛋白浓缩物，其含有50—70%的IgG1、25—35%的IgG2、2—8%的IgG3和1—8%的IgG4。

[0064] 本发明还涉及免疫球蛋白浓缩物,其所有抗原成分(antigenic repertoire)与血浆的所有抗原成分相似或相同。优选本发明的免疫球蛋白浓缩物的所有抗原成分与现有技术的浓缩物的所有抗原成分相似和/或优于现有技术的浓缩物的所有抗原成分。

附图说明

[0065] 图1(图1A-1D)用图解表示本发明方法中应用的多柱色谱的原理;

[0066] 图2用图解表示根据本发明方法的实施示例通过一系列多柱色谱对高丰度(abundant)血浆蛋白进行连续纯化的步骤的顺序;

[0067] 图3是实施例2、3和4中进行多柱色谱结束时获得的组分在非还原条件下进行SDS-PAGE凝胶并进行考马斯蓝染色的图像。

[0068] 发明详述

[0069] 定义

[0070] 根据本发明,“血浆蛋白”是指血浆中含有的任何蛋白质,更特别是指工业或治疗中相关的任何蛋白质。血浆蛋白包括白蛋白、 α /巨球蛋白、抗胰凝乳蛋白酶、抗凝血酶、抗胰蛋白酶、Apo A、Apo B、Apo C、Apo D、Apo E、Apo F、Apo G、 β XIIa、C1-抑制剂、C-反应蛋白、C7、C1r、C1s、C2、C3、C4、C4bP、C5、C6、C1q、C8、C9、羧肽酶N、血浆铜蓝蛋白、因子B、因子D、因子H、因子I、因子IX、因子V、因子VII、因子VIIa、因子VIII、因子X、因子XI、因子XII、因子XIII、纤维蛋白原、纤连蛋白、触珠蛋白、血红素结合蛋白、肝素辅助因子II、组蛋白富集GP、IgA、IgD、IgE、IgG、ITI、IgM、激肽酶II、激肽原HPM、溶菌酶、PAI 2、PAI 1、PCI、纤溶酶、纤溶酶抑制剂、纤溶酶原、前白蛋白、前激肽释放酶、备解素、蛋白酶连接蛋白INH、蛋白C、蛋白S、蛋白Z、凝血素、血清淀粉样蛋白(SAP)、TFPI、硫醇蛋白酶、血栓调节蛋白、组织因子(TF)、TPA、钴胺传递蛋白II、皮质素传递蛋白、转铁蛋白、玻连蛋白和血管性血友病因子。

[0071] 具体地讲,血浆蛋白包括凝血蛋白,即与导致血栓形成的链反应级联相关的血浆蛋白。凝血蛋白包括因子I(纤维蛋白原)、因子II(凝血素)、因子V(促凝血球蛋白原)、因子VII(前转变素)、因子VIII(抗嗜血因子A)、因子IX(抗嗜血因子B)、因子X(司徒因子)、因子XI(Rosenthal因子或PTA)、因子XII(接触因子)、因子XIII(纤维蛋白稳定因子或FSF)、PK(前激肽释放酶)、HMWK(高分子量激肽原)、因子III(促凝血酶原激酶或组织因子)、肝素辅助因子II(HCII)、蛋白C(PC)、血栓调节蛋白(TM)、蛋白S(PS)、血管性血友病因子(WF)和组织因子通路抑制剂(TFPI)或组织因子。

[0072] 在某些实施方案中,血浆蛋白包含具有酶活性的凝血蛋白。具有酶活性的凝血蛋白包括活化形式的因子II(凝血素)、因子VII(前转变素)、因子IX(抗嗜血因子B)、因子X(司徒因子)、因子XI(Rosenthal因子或PTA)、因子XII(接触因子)、因子XIII(纤维蛋白稳定因子或FSF)和PK(前激肽释放酶)。

[0073] 在本发明的情况下,术语“人免疫球蛋白”或“人Ig”是指多价免疫球蛋白,其可以是免疫球蛋白A(IgA)、免疫球蛋白E(IgE)、免疫球蛋白M(IgM)或免疫球蛋白G(IgG)。本发明的人免疫球蛋白最好是IgG,不考虑其亚类(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。它们可以是全免疫球蛋白,或者是多价免疫球蛋白生产过程中获得的任何中间组分。

[0074] “血浆成分”是指经过一或多个纯化步骤的血浆的任何部分或亚部分。因此,血浆成分包括冷沉淀的血浆上清液、血浆冷沉淀物(再悬浮的)、通过乙醇分馏的馏分I-V(根据

Cohn或Kistler&Nitschmann方法)、辛酸和/或辛酸酯沉淀后获得的上清液和沉淀物、色谱的洗脱物以及色谱柱包括多柱色谱的未吸附组分和滤液。

[0075] 根据本发明,“冷沉淀的血浆上清液”或“冷沉淀上清液”相当于冷冻血浆(冷冻沉淀物)融化后获得的液相部分。具体地讲,冷沉淀上清液可以如下获得:将血浆于-10℃至-40℃冷冻,然后于0℃至+6℃(优选0℃至+1℃)缓慢融化,随后离心融化的血浆以便于分馏冷冻沉淀物和冷冻上清液。冷冻沉淀物含有纤维蛋白原、纤连蛋白、血管性血友病因子和因子VIII,而冷沉淀上清液含有补体因子、维生素K依赖因子(例如蛋白C、蛋白S、蛋白Z、因子II、因子VII、因子IX和因子X)、纤维蛋白原和免疫球蛋白以及白蛋白。

[0076] “纯化步骤”是指使其能够在给定的组分中富集目标产物(特别是血浆蛋白)的方法的任何步骤。

[0077] 本发明的制备方法主要有赖于用于自任何血浆或任何血浆成分纯化治疗用途的血浆蛋白的多柱色谱步骤的使用。此类多柱色谱步骤的使用特别适合于免疫球蛋白浓缩物的制备。的确,根据本发明,有可能直接使得人血浆或人血浆冷沉淀上清液经多柱色谱处理。当然,也有可能多柱色谱纯化之前采用过滤步骤和/或乙醇/辛酸分馏。

[0078] 此类多柱色谱的使用通常能够减少用于治疗用途的血浆蛋白的工业化成本。具体地讲,多柱色谱能够使得可以以总饱和度(total saturation)使用所述柱的色谱载体,该种色谱需要的凝胶量少于传统色谱,传统色谱的常规操作是将容量限定在检测到目标分子有10%的流出。同样,因为洗脱、洗涤和消毒阶段在较小的柱上进行,所以溶液和缓冲液的需要与传统色谱相比大大降低。尽管已经报道了通过色谱串联分馏血浆分子的原理(John Curling等,“Cohn和采用新的亲和“串联方法”的色谱分馏的对比研究(A comparative study of Cohn and chromatographic fractionation using a novel affinity “Cascade Process”)”PPB congress May 2005),但是就工业化而言,兴趣是有限的,因为容量和产率都低。发明人发现,以特别令人惊奇的和有益的方式,根据本发明,使用多柱色谱使得串联色谱的原理更加具有吸引力,其具有更大的捕获量和/或更高的产率,表示为单位时间和凝胶量提取的产物的质量单位。

[0079] 多柱色谱的原理在图1中以图解的形式说明。此类多柱色谱将在色谱中常用的分馏柱(色谱载体)分为多个较小体积的柱(具有相同的色谱载体)并且彼此连接,这样使得一个柱的出口与另一个柱的入口连接。

[0080] 通常,多柱色谱不包括不同性质的多个色谱柱的并列(以串联或并联的方式)。

[0081] 总之,将待纯化的组分注入出口与柱2的入口串联的柱1(图1A)。因此,自柱1中离开的目标血浆蛋白的流出物在柱2(保护柱(guard column))中被收集而不是作为“未被吸附”的收集组分,残留的目标血浆蛋白能够被吸附在柱2上。柱1后面串联放置的保护柱2、3、4等的数量取决于待收集的目标蛋白流出物的比例(在本文中所述的实例中,采用3个保护柱2—4表示)。一旦柱1的上样以及随后的洗涤完成(图1A和1B),其可以与其它柱2—4分离,以便于各自进行洗脱(图1C)、再生(图1D)以及任选地平衡(没有示出)步骤。当柱1完成再平衡后,其可以再次置于串联中,作为最后的保护柱等。

[0082] 可以并行的是,随后将部分负载的柱2移动到第一个位置,然后进行血浆组分的上样,其流出物再次收集于后面的保护柱3和4等。

[0083] 因此,多柱色谱能够使得凝胶的饱和度最优化,不会由于突破(breaking

through)而损失物质,因为流出物被收集到保护柱上。

[0084] 根据本发明,可以采用多种多柱色谱技术。具体已知的技术为模拟移动床(SMB)技术,由此衍生的连续多柱色谱(SMCC)技术,其特别适合于实施本发明的方法。多柱色谱的实施方案的示例描述于专利申请W02007/144476和W02009/122281。

[0085] 根据本发明,多柱色谱可以是亲和、离子交换(阴离子或阳离子)、疏水作用、混合模式或排阻色谱。优选多柱色谱为多柱亲和、混合模式或阴离子交换色谱。

[0086] 在本发明的一个特别的示例性实施方案中,多柱色谱为径向色谱,即采用径向柱(radial columns)的色谱。根据本发明,有可能采用较大外直径(入口端)的表面积与较小内径(出口端)的表面积之间比例至少为2的径向柱。这些柱能够增加上样的流速(load flow rate),使得该方法在有大量的血浆需要处理时和/或当目标血浆蛋白(例如免疫球蛋白)必须快速纯化以便于保持其分子完整性时特别有益。同样,这能够减少纯化步骤的时间,因此使得单位时间处理的批次的数量大大增加。

[0087] 根据需要,更特别是根据待处理血浆的量,可以使用数毫升的色谱柱(例如,用于实验室规模的设备,例如5—20ml)至数百或数千升(工业化规模,例如200—2000l)。对于柱的每个范围,还可能需要调整形成固定相的凝胶床的高度,例如6cm、12cm或18cm。技术人员知道如何根据待处理的量和/或需要的流速调整柱的数目、其尺寸规格和凝胶的高度。

[0088] 在一个具体的示例中,特别是用于直接自冷沉淀上清液制备免疫球蛋白浓缩物的示例中,最好采用多柱亲和色谱。

[0089] 已经知道,大多数亲和凝胶(形成亲和色谱的固定相),特别是工业化使用的凝胶,其免疫球蛋白(Ig)的最大负载量较离子交换凝胶的负载量小4—5倍(20—30g/l对比80—100g/l)。因此,公知的是,为处理大量的血浆而需要的亲和凝胶的量使得该方法在经济上无法承受。

[0090] 然而,申请人发现,这个缺点可以通过将色谱柱分为多个较小的柱而解决,特别是分为3—8个柱,优选3—5个柱。多色谱柱的使用使得能够将一或多个主要柱串联放置,在目标蛋白上样期间保护柱能够捕获流出主要柱的目标血浆蛋白。然后,可以将该主要柱中存在的亲和配体饱和以便于达到色谱凝胶的最大容量。然后将这个(这些)柱自系统中取出分别洗脱,收集目标蛋白。然后保护柱又变成主要柱。3—50个(优选5—30个,更优选7—15个)连续循环能够最大限度地利用亲和配体,因此可以减少捕获和洗脱目标分子所需要的凝胶总量。

[0091] 有利地是,亲和配体可以选自抗体、抗体片段、抗体衍生物或化学配体,例如肽类、模拟肽类、类肽类、nanofitins或寡核苷酸配体,如寡核苷酸适配子。

[0092] 例如,包含交联琼脂糖基质的凝胶能够以高流速操作,可以与能够与目标蛋白结合的亲和配体组合使用。在一个具体实施方案中,亲和配体能够与人IgG的Fc片段结合,或者与免疫球蛋白中的任何保守序列结合。

[0093] 在另一个具体的实施方案中,使用的亲和配体为能够辨识IgG的Fc片段并且能够与基质结合的重组蛋白,例如获自GE Healthcare的IgSelect gel。

[0094] 有利地是,配体的选择应当使其能够特异性地辨识一类免疫球蛋白(例如免疫球蛋白G)和/或能够特异性地辨识一或多种免疫球蛋白亚类(例如IgG1和/或IgG2和/或IgG3和/或IgG4)。在另一个具体的实施方案中,使用的亲和配体为蛋白G,其对IgGs具有亲和性,

最好对IgAs没有亲和性。在另一个具体的实施方案中,使用的亲和配体为蛋白A,其能够特异性地与IgG1、IgG2和IgG4结合,但是不能够捕获IgG3。

[0095] 在一个特别的示例性实施方案中,多柱亲和色谱的亲和配体对免疫球蛋白G具有亲和性,最好选自对IgG1、IgG2、IgG3和IgG4有亲和性的配体。更具体地讲,根据本发明方法获得的IgG浓缩物最好与血浆的IgG亚类分布特征相似。具体地讲,本发明的IgG浓缩物最好包含50—70%的IgG1、25—35%的IgG2、2—8%的IgG3和1—8%的IgG4,或者更优选60—70%的IgG1/30—35%的IgG2/3—6%的IgG3和2—5%的IgG4。在一个具体的实施方案中,根据本发明方法获得的浓缩物与血浆相比,其IgG3和/或IgG4亚类略有降低,然而该产品与具有与血浆相似的IgG亚类所有成分的产品在疗效方面完全可以相提并论。

[0096] 在另一个特别的示例性实施方案中,多柱亲和色谱的亲和配体对纤维蛋白原或白蛋白具有亲和性。更具体地讲,本发明还涉及直接从血浆制备人纤维蛋白原和/或白蛋白浓缩物的方法,其中所述血浆或冷沉淀的血浆上清液经多柱亲和色谱处理,其中亲和配体对纤维蛋白原和/或白蛋白具有亲和性。使用的配体特别是任何可以商购的配体,例如CaptureSelect HSA(Life Technologies)亲和配体或CaptureSelect纤维蛋白原(Life Technologies)亲和基质配体。

[0097] 有利地是,本发明方法中选择的亲和配体对消毒条件具有耐受性和/或可以在工业用途中多次重复利用。因此,在一个具体的实施方案中,亲和配体最好选自肽类和/或类肽类(获自组合生物学(combinatorial biology),例如噬菌体展示技术)、nanofitins(提取自极端微生物细菌)和/或寡核苷酸适配子。

[0098] 在一个具体的示例中,所述亲和配体为适配子,特别是核适配子。本文中使用的术语“适配子”是指单链核酸分子DNA或RNA,特别是能够与目标蛋白特异性结合的单链核酸分子,例如通过与人IgG的Fc片段结合而与免疫球蛋白结合,或者与免疫球蛋白的保守序列结合。有利地是,适配子的选择应当使其能够特异性地辨识一类免疫球蛋白(例如免疫球蛋白G)和/或特异性地辨识一或多种免疫球蛋白亚类(例如IgG1和/或IgG2和/或IgG3和/或IgG4)。寡核苷酸适配子通常含有5—120个核苷酸,可以通过所谓的SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)方法在体外选择。根据本发明,“核适配子(nucleic aptamer)”是指单链核酸,特别是能够与人IgGs的Fc片段特异性结合的单链核酸。

[0099] 寡核苷酸适配子具有许多优点。由于其寡核苷酸的性质,寡核苷酸适配子具有低免疫原性,对严苛的物理化学条件(DMSO的存在,酸性或碱性非常强的pH,有机溶剂的使用或高温)具有高耐受性,因此在作为亲和配体使用的情况下可以适应不同的消毒策略。因此,与传统色谱相比,尽管多次循环使用并且负载较高,其仍然有可能增加通过进行消毒步骤的亲和凝胶的使用寿命,以便于清洗色谱柱,控制其污垢,降低病毒或朊病毒污染的风险。寡核苷酸适配子由于具有核苷酸类型的结构,特别适合于在碱性pH条件下消毒,可以100—200次循环重复使用。

[0100] 以本申请人的名义提交的专利申请FR 2970003公开了生产具有固载的核寡核苷酸适配子的亲和载体的方法。具体地讲,本申请公开了固载(immobilising)包含至少一个反应性胺官能团的核苷酸的方法,通过接枝将其固载到表面具有活化的羧酸基团的固体载体上。

[0101] 在一个具体的实施方案中,所述多柱色谱可以有益地应用于一或多个连续的纯化步骤,采用连续的色谱柱。因此,第一个多柱色谱没有保留的组分可以以最适当的顺序用于纯化其它目标血浆蛋白。在一个特别的示例性实施方案中,第一个多柱色谱用于处理血浆或冷沉淀物以便于纯化免疫球蛋白。源自该第一步纯化的血浆成分可以经第二个多柱色谱纯化以便于纯化白蛋白。源自该第二个多柱色谱的血浆成分(不含(depleted of)免疫球蛋白和白蛋白)随后可以经第三个多柱色谱处理以便于纯化纤维蛋白原等。这尤其能够连续地处理血浆,从而特别可以连续地纯化免疫球蛋白、白蛋白和/或纤维蛋白原,不会激活凝血级联。

[0102] 在另一个特别的示例性实施方案中,第一个多柱色谱可以处理血浆或冷沉淀物以便于纯化免疫球蛋白。源自该第一步纯化的血浆成分可以经第二个多柱色谱纯化以便于纯化纤维蛋白原。源自该第二个多柱色谱的血浆成分(不含免疫球蛋白和纤维蛋白原)随后可以经第三个多柱色谱处理以便于纯化白蛋白等。这尤其能够连续地处理血浆,从而特别可以连续地纯化免疫球蛋白、纤维蛋白原和/或白蛋白,不会激活凝血级联。

[0103] 根据本发明,制备用于治疗用途的人血浆蛋白浓缩物的方法还可以包括至少一个下列步骤:

[0104] (i)病毒灭活或病毒消除步骤;

[0105] (ii)离子交换色谱步骤;

[0106] (iii)抗A和抗B抗体消除步骤,特别是通过亲和色谱消除;

[0107] (iv)采用辛酸和/或辛酸酯的沉淀步骤;

[0108] (v)通过超滤的浓缩步骤;

[0109] (vi)配制步骤。

[0110] 有利地是,本发明的制备方法能够获得用于治疗用途的人蛋白浓缩物,该方法可以包括步骤(i)–(vi)中的至少一个后续步骤。

[0111] 在一个特别的示例性实施方案中,该制备方法能够获得用于治疗用途的人蛋白浓缩物,该方法任选包括步骤(i)–(vi)中的一或多个后续步骤。

[0112] 在另一个特别的示例性实施方案中,该制备方法能够获得用于治疗用途的白蛋白浓缩物,所述方法任选包括步骤(i)–(vi)中的一或多个后续步骤。

[0113] 在另一个特别的示例性实施方案中,该制备方法能够获得用于治疗用途的纤维蛋白原浓缩物,所述方法任选包括步骤(i)–(vi)中的一或多个后续步骤。

[0114] 例如,通过将血浆或冷沉淀上清液经多柱色谱(特别是多柱亲和或阴离子交换色谱)直接处理获得的人血浆蛋白浓缩物和/或免疫球蛋白浓缩物最好能够经过至少一个致病病原的至少一个消除或灭活步骤。

[0115] 在步骤(i)的目标致病病原中,可以提及的是病毒和UTAs(非常规可传播致病病原),例如朊病毒。

[0116] 病毒灭活通常包括采用化学品(例如溶剂和/或清洁剂)处理和/或采用热处理(巴氏灭菌法和/或干热灭菌)和/或通过辐射处理(γ 和/或UV-C)和/或通过pH处理(酸性pH处理)。

[0117] 优选本发明的步骤(i)包括至少一个采用溶剂和清洁剂处理的过程。采用溶剂和清洁剂处理(通常称为溶剂/清洁剂或S/D处理)特别包括采用三-正-丁基磷酸酯(TnBP)处

理和/或采用选自下列的清洁剂处理：Triton X-100、Tween(优选Tween 80)、胆酸钠和2-[4-(2,4,4-三甲基戊烷-2-基)苯氧基]乙醇(辛苯聚醇)。

[0118] 纳米过滤也可以用于除去致病原,特别是病毒和UTAs。在血浆蛋白的情况下,纳米过滤通常是指将目标蛋白浓缩物通过孔径小于80nm的滤器过滤。例如,可以使用下列滤器：BioEx、**Planova®**75nm、**Planova®**35nm、**Planova®**20nm或**Planova®**15nm(Asahi corporation)、Ultipor DV50或DV 20(Pall Corporation)、Virosart CPV(Sartorius)、Viresolve NFR或NFP(Millipore)。纳米过滤最好在单一滤器上进行,或者在孔径相同或逐渐减少的串联的多个滤器上进行。

[0119] 致病原也可以通过深层过滤除去。可用的滤器为例如再生纤维素组成的滤器,其中可以加入过滤助剂(例如硅藻土、珠光体或Kieselguhr),可以商购自Cuno(Zeta+VR系列滤器)、Pall-Seitz(P-系列深层滤器)或Sartorius(Virosart CPV,Sartoclear P深层滤器)。

[0120] 在一个具体的实施方案中,病毒灭活步骤最好直接在血浆或冷沉淀的血浆上清液或再悬浮的血浆冷沉淀物上进行,以便于待纯化的全部蛋白均可以受益于多柱色谱上游的处理。

[0121] 在另一个具体的实施方案中,未加工血浆和/或冷沉淀的血浆上清液和/或再悬浮的血浆冷沉淀物均可以经过深层过滤或者经过顺序过滤,例如多柱色谱上游的6 μ m、1 μ m以及随后的0.45–0.2 μ m的聚丙烯滤器或相同的介质。此类初步准备步骤可能有益地预防和/或减少由于多柱色谱的柱的过早污染。在另一个具体的实施方案中,使用的深层滤器为去脂深层滤器(例如Cuno或Pall-Seitz),其可以减少待处理血浆组分中的脂质。

[0122] 优选病毒灭活或消除步骤(i)在离子交换色谱步骤(ii)之后。

[0123] 在一个具体的示例中,离子交换色谱步骤(ii)为阴离子-或阳离子交换色谱。此阴离子-或阳离子交换色谱步骤由本申请人描述于专利申请EP 0703922和WO 99/64462中。

[0124] 在一个具体的示例中,阴离子交换色谱步骤(ii)可以在采用DEAE或TMAE或QAE基团接枝的交联多糖凝胶或乙烯基或丙烯酸聚合物凝胶上进行,由被申请人描述于WO2002/092632和WO2013/007740中。

[0125] 在另一个具体的示例中,多柱阴离子交换和/或混合模式色谱在高耐盐性基质上进行,这使其能够捕获高盐度介质中的血浆蛋白,例如没有被色谱保留的血浆或组分。优选高耐盐性多柱阴离子交换和/或混合色谱在PALL BIOSEPRAs的STAr AX凝胶、GE Healthcare的Capto MMC凝胶或Merck的ESHMUNO HCX凝胶或者技术人员公知的任何等价物上进行。

[0126] 具体地讲,对于用于治疗用途的免疫球蛋白浓缩物的制备而言,阴离子交换色谱步骤(ii)可以包括:

[0127] -将已经经过溶剂-清洁剂处理(步骤(i))的溶液的pH调节至8–10;

[0128] -将其上样至预先在缓冲液中平衡至pH 8–10的色谱柱上,使得免疫球蛋白被吸附,未吸附的蛋白在流出物中离开;

[0129] -采用相同的缓冲液洗涤直到所有的未吸附蛋白和溶剂/清洁剂混合物被除去;

[0130] -采用适当的缓冲液洗脱免疫球蛋白。

[0131] 该洗脱可以采用pH 4–7的磷酸盐缓冲液进行,优选pH 6.2,洗脱免疫球蛋白。

[0132] 本发明的方法还包括抗A和/或抗B抗体消除步骤(iii)。在一个具体的示例中,抗A

和/或抗B抗体消除步骤(iii)在步骤(ii)结束时获得的溶液进行。该步骤可以例如根据本申请人的专利申请WO 2007/077365所述方法进行。因此,在制备用于治疗用途的免疫球蛋白浓缩物的情况下,可以将步骤(ii)中获得的溶液通过免疫亲和的色谱进行抗A和抗B抗体消除步骤,通过将所述多价免疫球蛋白浓缩物渗滤到载体上进行,所述载体的基质与具有类似于血型A和/或B的抗原性的寡糖基团接枝,或者渗滤到其基质与具有类似于血型A和/或B的抗原性的寡糖基团接枝的载体混合物上。在一个具体的实施方案中,抗A和/或抗B抗体消除步骤(iii)通过多柱亲和色谱进行。

[0133] 在某些情况下,本发明的方法可以包括采用辛酸和/或辛酸酯的沉淀步骤(iv)。通常,在微酸性介质中加入辛酸和/或辛酸酯能够使得血浆蛋白沉淀,但是Igs仍然保留在上清液中。根据本发明,在多柱色谱进行纯化步骤之前或之后均可以进行该辛酸沉淀步骤(iv)。

[0134] 在一个特别的示例性实施方案中,通过多柱阴离子交换色谱的目标血浆蛋白的纯化步骤后面进行后续的辛酸和/或辛酸酯沉淀步骤。这种多柱离子交换色谱/辛酸沉淀的组合使用特别有益于制备Ig浓缩物(特别是IgG浓缩物)和/或白蛋白和/或纤维蛋白原浓缩物。

[0135] 具体地讲,对于制备用于治疗用途的免疫球蛋白浓缩物,采用辛酸的沉淀步骤(iv)可以包括下列步骤:

[0136] -任选将血浆组分的pH调节至3.0—6.0,优选pH 4;

[0137] -向血浆组分中加入辛酸;

[0138] -离心或过滤收集富含IgG的上清液。

[0139] 本发明的方法可以有益地包括一或多个超滤浓缩步骤(v)。例如,在制备Ig浓缩物的过程中,可以将获自多柱色谱步骤的富含Ig的组分任选在经过薄膜超滤之前预先经过步骤(i)–(iv)的一个和/或另一个。

[0140] 也可以包括将向人血浆蛋白浓缩物中添加一或多种药学上可接受的稳定剂的步骤(vi)。根据本发明,可以在配制步骤(vi)之前增加通过纳米过滤进行额外的病毒消除步骤(i)。

[0141] 药学上可接受的稳定剂是指适合于血浆蛋白浓缩物的配方,特别是描述于专利申请FR 03 08403中的赋形剂,优选适合于免疫球蛋白浓缩物的配方,特别是描述于本申请人的专利申请FR 03 04388、FR 08 59117、FR10 54721和FR 10 55825中的赋形剂。

[0142] 配制步骤(vi)后可以任选进行所述步骤(vi)中获得的药物制剂的冷冻或冷冻干燥步骤(vii)。

[0143] 有利地是,本发明的方法能够制备免疫球蛋白浓缩物和/或纤维蛋白原和/或白蛋白浓缩物,特别是回避了冷藏步骤。

[0144] 有利地是,本发明的方法能够以高于5g/l血浆的收率获得免疫球蛋白浓缩物,优选收率高于6g/l血浆。在一种非常有益的方式中,本发明的方法可以最佳化以便于获得收率接近于7—8g/l原始血浆的免疫球蛋白。

[0145] 有利地是,本发明的方法能够以高于30g/l的收率获得白蛋白浓缩物,非常有益的是高于35g/l。对于纤维蛋白原而言,因为血浆水平为约3g/l,亲和捕获步骤能够在一个步骤中有益地捕获其80%。优选连续色谱能够获得高于90%的收率。

[0146] 在一种有益的方式中,本发明方法获得的免疫球蛋白浓缩物可以具有与血浆所有抗原成分相似或相同的所有抗原成分。在一个具体的实施方案中,通过本发明方法获得的免疫球蛋白浓缩物具有的所有抗原成分相似于和/或高于现有技术的浓缩物的所有抗原成分。的确,本发明方法的过程中的免疫球蛋白的有限的损失能够保持其免疫球蛋白分布与血浆相同并且保持较宽的抗原谱。

[0147] 因此,本发明的方法特别有益于生产能够对抗特异性抗原靶点的免疫球蛋白。

[0148] 同样,本发明的方法特别有益于制备白蛋白浓缩物,特别是自己已经不含免疫球蛋白的血浆成分制备。本发明的多柱色谱的步骤能够使得捕获收率高于90%。尽管传统色谱步骤中凝胶的容量通常为25—30g/1凝胶,但是本发明的多柱阴离子交换或疏水作用色谱或化学配体结合(多模式)色谱能够获得的容量高于50g/1凝胶,即载体的动态容量的总饱和度和。

[0149] 下面的实施例对本发明进行了说明,而非限定其范围。

[0150] 实施例1:通过多柱亲和色谱自冷沉淀上清液制备免疫球蛋白浓缩物

[0151] 材料和方法

[0152] 冷沉淀上清液

[0153] 含有8—10g/l的IgG的两个批次约5升的人冷沉淀上清液(批次为13500-13L-06002和13500-13L-06007)等分为700的组分,然后于-80℃冷冻。使用的批次的特征如下面表1所示。

[0154] 表1:冷沉淀上清液中IgG亚类的分布

[0155]

原料	批次编号	总IgGs (%)	IgG1 (%)	IgG2 (%)	IgG3 (%)	IgG4 (%)
冷沉淀上清液	13L06002	100.0	57.9	32.0	3.5	6.6
冷沉淀上清液	13L06007	100.0	57.2	32.3	4.0	6.6

[0156] 在测试期间,将所需体积的冷沉淀上清液在水浴中于37℃融化20—30分钟,产品内部温度不超过25℃。

[0157] 缓冲液

[0158] 亲和色谱方法的各个步骤期间使用的缓冲液的组成如下面表2中所示。

[0159] 表2:用于亲和色谱的缓冲液

[0160]

阶段	组成	目标值
平衡和洗涤	Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O: 16.7 mM NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O: 3.34 mM 150 mM NaCl	pH=7.4
洗脱液	0.1 M 甘氨酸	pH=3
洗脱物调节	0.1 M 甘氨酸	pH=11

[0161] 离子交换色谱方法的各个步骤期间使用的缓冲液的组成如下面表3中所示。

[0162] 表3:用于离子交换色谱的缓冲液

[0163]

阶段	组成	目标值
预平衡	甘氨酸.NaCl	pH: 9.0 ± 0.1 电导率: 8.5 ± 0.5 mS/cm
平衡和洗涤	甘氨酸.NaCl	pH: 9.0 ± 0.1 电导率: 1000 ± 100 μ S/cm
洗脱液	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O: NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	pH: 6.2 ± 0.1 电导率: 1600 ± 100 μ S/cm

[0164] 色谱凝胶

[0165] 对于亲和色谱,采用获自GE Healthcare的**IgSelect®**凝胶(批次编号10035817和10017479)。使用的亲和配体为获自BAC(BioAffinity Company)的配体,其能够特异性地结合人IgGs的Fc片段。该配体为14kD重组蛋白,通过长链碳连接基与能够有助于IgS吸收的基质偶合。后者与连接基通过多点酰胺键结合。

[0166] 对于离子交换色谱,采用强阴离子交换凝胶**Fractogel®** EMD TMAE(批次编号09L03583)。该凝胶由交联聚甲基丙烯酸酯树脂组成,该树脂上接枝了三甲基氨乙基(TMAE)基团。

[0167] 柱

[0168] 对于多柱亲和色谱,采用获自公司Proxycys的3—5个径向柱,参考 μ -RFC 5.0—6.0(批次1303B014-凝胶量:10ml;凝胶高度:12cm;入口直径与出口直径的比例:2:1),与BioSc Lab自动化系统(Novasep)结合使用。

[0169] 对于TMAE色谱,采用XK 16柱(GE Healthcare)(凝胶量41ml,高度20.4cm,表面积2.0cm²)以及AKTA Purifier 10自动化系统(GE Healthcare)。

[0170] 超滤

[0171] 采用Millipore Biomax 30(PES)套盒,30kDa的截留值(cut-off),表面积为50cm²(参考C1PA45544)。

[0172] 消毒过滤

[0173] 采用Sartorius Minisart滤器,表面积为5cm²,孔隙率为0.45 μ m和0.2 μ m(参考16537和16532)。

[0174] 实验

[0175] 多柱亲和色谱

[0176] 实验在4个柱上进行,它们在凝胶吸附和洗涤阶段的过程中按顺序串联连接,负载量为26g的IgG/1凝胶,接触时间为5分钟,结合pH为7.3—7.8,洗脱采用pH 3的0.1M甘氨酸溶液。

[0177] 每次色谱处理后将凝胶再生。

[0178] 再生采用2CV的2M氯化钠溶液进行。

[0179] 该色谱通过于280nm记录OD并且通过计算IgG收率(浊度测定法分析)监测。

[0180] 工作速率为2.3ml/min,其相当于吸附过程中接触时间为2分钟。

[0181] 多柱亲和色谱步骤如下面表4所示进行。

[0182] 表4:多柱亲和色谱步骤

[0183]

步骤	溶液	体积	附注
平衡	平衡缓冲液	至少2 CV	确认pH (7.4 ± 0.2)
吸附	冷沉淀上清液	3 ml - 22 ml 根据实验决定	通过于280 nm监测OD收集未被吸附的组分
洗涤	平衡缓冲液	2 - 4 CV	直到恢复基线
洗脱	0.1 M甘氨酸, pH 3.0	2 CV	收集直到恢复到基线
再生	2 M NaCl	2 CV	/
柱的再-平衡	平衡缓冲液	至少2 CV	确认pH (7.4 ± 0.2)
储存	20% 乙醇	至少2 CV	如果柱不是立即使用可以不进行

[0184] CV:柱体积

[0185] S/D处理和TMAE色谱

[0186] S/D处理进行30分钟以便于灭活包膜病毒。然后在注入到TMAE凝胶上之前调节产物的pH和电导率。

[0187] 然后收集TMAE凝胶的未吸附组分(被除去的组分);恢复到基线并洗涤柱后,收集凝胶洗脱物用于后面的阶段。

[0188] 超滤

[0189] 超滤步骤能够透析并浓缩中间产物的浓度为80—120g/l的TMAE柱的洗脱物。

[0190] 配制

[0191] 通过加入配方缓冲液(甘露醇、甘氨酸、聚山梨醇酯80)配制产物。将产物的终浓度调节至50g/l。

[0192] 将获得的产物在0.45和0.22μm的滤器上顺序无菌过滤。然后取样并以液态于4.0—7.0℃储存。

[0193] 结果

[0194] 对终产物进行分析,与采用乙醇分馏作为第一个纯化步骤的方法获得的50g/l的免疫球蛋白IgG(参比产物)对比。

[0195] -通过浊度法测定总IgGs和亚类(表6)。

[0196] -通过ELISA(酶联免疫吸附法)测定IgAs、IgMs和IgEs(表7)。

[0197] 表5:IgG亚类的分布

[0198]

实验	总IgGs (%)	IgG1 (%)	IgG2 (%)	IgG3 (%)	IgG4 (%)
终产物 (IgSelect负载: 26 g/l)	100.0	53.4	33.4	1.2	1.7
参比产物	100.0	59.7	36.8	2.4	1.9

[0199] 表6:污染蛋白含量测定

[0200]

实验	Ig G (g/l)	Ig A(mg/l)	Ig M (mg/l)	Ig E (IU/ml)
终产物 (IgSelect负载: 26 g/l)	57.6	< 13	< 8	1.5
参比产物	46.1	8.5	< 8	< 0.8

[0201] 应当注意,用于直接自冷沉淀上清液纯化IgGs的这些条件获得的产物与参比产物的质量相同。而且,如上面表6所示,观察所有的IgG亚类的保留(conservation),其分布与血浆相似。

[0202] 更有趣地是,使用的IgSelect凝胶的多柱亲和色谱的步骤收率高于90%,每升冷沉淀上清液收集7.4g的IgG。注意到亲和凝胶的未吸附组分中完全不含IgG。

[0203] 表7:多柱IgSelect亲和和收率

[0204]

IgSelect实验负载 26 g/l	Ig G (g/l)	体积(l)	Ig G (mg)	步骤收率 (%) /每升血浆中IgG的g数
冷沉淀上清液	8.0	880	6500	100/8.0
多柱IgSelect 亲和洗脱物	4.8	1245	6010	92.6/7.4

[0205] 总之,通过多柱色谱直接自血浆冷沉淀上清液纯化IgGs完全可能以工业化规模进行,特别是每天处理数千升体积的血浆。

[0206] 例如,为了处理工业批次为4500升的人血浆,可以采用如下步骤:50l和凝胶高度为12cm的4个柱,其冷沉淀上清液负载相当于每升凝胶27g的IgG,线性吸附流速为100—300cm/h,凝胶洗涤和洗脱步骤的线性流速较高,为200—600cm/小时。

[0207] 由3个70升的凝胶柱或5个40升的凝胶柱组成的配置排列是合理的,处理全部批次所需要进行的循环的数目取决于使用的原料的量。

[0208] 此类操作即使在工业规模下也能够获得满足法规要求的免疫球蛋白浓缩物,具有治疗用途所需要的所有质量特性(纯度,生物安全性,IgG亚类的分布等)。特别的是,观察到血浆的四种IgG亚类的保留。然后为了清除溶剂/清洁剂混合物、IgAs和IgEs,可以采用TMAE色谱。

[0209] 此外,可以提供采用80%聚山梨醇酯洗涤凝胶的步骤,同时采用NaCl的预洗脱,或者作为脲/乙酸组分中的混合物。

[0210] 实施例2:通过多柱亲和色谱自血浆捕获免疫球蛋白

[0211] 材料和方法

[0212] 将充足的人血浆(已经使其能够形成约 30l的血浆池,含有8—10g/l的IgG)于37℃水浴中融化并且产物的内部温度不超过25℃,以便于通过第一个多柱色谱提取免疫球蛋白。

[0213] 表8:血浆池中IgG亚类的分布

[0214]

原料	实验编号	总IgGs(%)	IgG1(%)	IgG2(%)	IgG3(%)	IgG4(%)
血浆池1	1647-120	100.0	58.0	33.6	3.3	5.2
血浆池2	1647-121B	100.0	57.4	32.5	3.4	6.7

[0215] 缓冲溶液

[0216] 在亲和色谱方法的各个步骤中使用的缓冲溶液的组成如下面表9所示。

[0217] 表9:用于亲和色谱的缓冲溶液

[0218]

阶段	组成	目标值
平衡和洗涤	10.0mM柠檬酸钠,100mM NaCl	pH=7.4
预洗脱	10mM柠檬酸钠,2.0M NaCl	pH 7.4
洗脱	乙酸	QS pH=3.0
洗脱物调整	1M氢氧化钠	QS pH 4.8

[0219] 色谱凝胶

[0220] 对于亲和色谱,可以使用获自Life Technologies公司的CaptureSelect FcXL亲和凝胶(Ref.19432801L,批次编号200814-03)。使用的亲和配体为获自BAC(BioAffinity Company)公司的配体,其能够特异地结合4种人IgG亚类的CH3域。该配体为14kD重组蛋白。

[0221] 柱

[0222] 对于多柱亲和色谱,采用获自公司Proxycys的4个径向柱(MD 122MK III-凝胶量:每个柱为250ml,总亲和凝胶量为1.0l的凝胶;凝胶高度:12cm;入口直径/出口直径的比例:2/1),与BioSc M实验自动化系统(pilot automated system)(Novasep)结合使用。

[0223] 实验

[0224] 多柱亲和色谱

[0225] 实验在4个柱上进行,通过自动化系统连续控制,血浆负载相当于21g的IgG/1凝胶,接触时间为3-4分钟,未改良的血浆吸附pH为7.1-7.8,采用pH 3.0的乙酸溶液进行洗脱。每次色谱处理后将凝胶再生。

[0226] 该色谱通过于280nm记录OD并且通过计算洗脱物池中的IgG收率(浊度测定法分析)监测。多柱亲和色谱步骤如下面表10所示进行。

[0227] 表10:多柱亲和色谱步骤

[0228]

步骤	溶液	附注
平衡	平衡缓冲液	(7.4 ± 0.2)

[0229]

吸附	血浆以0.2 μm过滤	收集未被吸附的组分
预洗脱	10 mM柠檬酸钠, 2 M NaCl	
洗脱	乙酸pH 3.0	收集直到恢复基线

[0230] 为了限制酸性pH过度时IgGs集聚的风险,采用1M氢氧化钠溶液将获得的亲和柱的

洗脱物调节至pH 4.8。

[0231] 多柱FcXL亲和和色谱洗脱物的透析过滤浓缩

[0232] 将洗脱物在水中渗滤,在截留阈值为30kDa的膜上浓缩,以便于获得约70g/l的浓缩物。

[0233] 结果

[0234] 采用超滤-浓缩的多柱色谱洗脱物进行分析。

[0235] -通过浊度法测定总IgGs和IgG亚类(表11)。

[0236] -通过ELISA(酶联免疫吸附法)测定IgAs、IgMs和IgEs(表12)。

[0237] 表11:洗脱物超滤和浓缩后的IgG亚类分布

[0238]

实验	总IgGs(%)	IgG1(%)	IgG2(%)	IgG3(%)	IgG4(%)
FcXL洗脱物:血浆1	100.0	58.3	32.9	3.0	5.7
FcXL洗脱物:血浆2	100.0	58.5	34.0	2.2	5.3

[0239] 表12:IgG超滤和浓缩后杂质蛋白含量分析

[0240]

实验	IgG(g/l)	IgA(g/l)	IgM(g/l)	IgE(IU/ml)
FcXL洗脱物:血浆1	76.6	1.00	0.75	33.0
FcXL洗脱物:血浆2	66.8	0.80	0.50	12.0

[0241] 应当注意:用于直接自血浆纯化IgGs的条件获得的产物具有非常好的质量。此外,如上面表11所示,观察到所有的IgG亚类的保留,其分布与血浆相似。

[0242] 更有利的是,采用FcXL凝胶的多柱亲和色谱的步骤收率高于90%,也就是说处理每升血浆收集到高于7.5g的IgG。在亲和凝胶的未被吸附组分中没有观察到IgG。此外,在凝胶的未被吸附组分中完整收集到白蛋白和纤维蛋白原。

[0243] 表13:多柱FcXL亲和和色谱收率(将洗脱物调节至pH 4.8)

[0244]

实验	IgG(g/l)	体积(l)	IgG(g)	步骤收率(%) / 每升血浆IgG的g数
血浆1	4.4	60.7	264.0	92.1/7.5
血浆2	3.2	70.4	225.3	97.9/7.9

[0245] 总之,通过多柱色谱直接自血浆纯化IgGs完全可以以工业化规模进行,特别是每天处理体积为数千升的血浆。

[0246] 表14:传统色谱中FcXL亲和凝胶与多柱色谱(相同的色谱缓冲液)的IgG捕获量的对比。

[0247]

色谱类型	容量,每升凝胶IgG的g数
传统	15
多柱	21

[0248] 此类操作即使以工业化规模进行也能够非常高效地捕获血浆中存在的免疫球蛋白。其也可以在单一步骤中获得纯度很高的洗脱物,该洗脱物保留了治疗性免疫球蛋白所期望的质量。特别的是,观察到血浆的四种IgG亚类的保留以及IgAs、IgMs和IgEs的良好清

除。然后为了消除残留的痕量IgA、IgM和IgE,可以采用TMAE类型的离子交换色谱(Merck)。

[0249] 实施例3:通过多柱离子交换色谱、疏水作用色谱或化学配体结合(多模式)色谱捕获白蛋白

[0250] 材料和方法

[0251] 使用不含IgG的血浆,该血浆在根据实施例2的纯化IgGs的方法结束时收集,白蛋白与使用的亲和凝胶完全不结合。

[0252] 血浆成分的特征为:

[0253] 人白蛋白16.15g/l,pH=6.5,电导率12mS/cm,在0.01M柠檬酸盐缓冲液中。

[0254] 该色谱方法的各个步骤中使用的缓冲溶液的组成如下面表15所示。

[0255] 表15:混合模式多柱色谱的缓冲溶液

[0256]

阶段	缓冲液/产物
预平衡	0.1M柠檬酸盐,0.1M NaCl,调节至pH=6.5
平衡	0.01M柠檬酸盐,0.1M NaCl,调节至pH=6.5
洗脱	0.01M柠檬酸盐和0.1M NaCl,pH=3.9

[0257] 混合模式色谱凝胶

[0258] 对于白蛋白色谱,采用HEA Hypercel类型的耐盐性混合模式凝胶。

[0259] 柱

[0260] 采用5个串联的径向柱,每个10ml,与BioSc Lab自动化系统(Novasep)结合使用。进行6个循环,每个164分钟,即约17小时的连续操作。

[0261] 在该实施例中应用的多柱色谱条件使其能够几乎完全确认白蛋白的捕获,非常少的白蛋白保留在未吸附的组分中。下表总结了收集到的每个组分的收率以及纯化的目标组分的最低纯度。

[0262] 表16:白蛋白收率以及通过SDS-PAGE电泳法的纯度估值

[0263]

未吸附组分收率	洗脱物收率	再生收率	洗脱物纯度
3.4%	87.7%	8.9%	80%

[0264] 与传统实验比较,在多柱色谱实验期间观察到至少70%的容量的增加,其中当柱出口流出量达到10%时停止上样。表17总结了2个条件下计算的增长。

[0265] 表17:传统色谱与多柱色谱(相同的色谱缓冲液)的HEA凝胶捕获量的对比。

[0266]

色谱类型	容量,每升凝胶白蛋白的g数
传统	30
多柱	52

[0267] 表17的结果显示,只有约3.4%的白蛋白没有被吸附。观察到电泳纯度约为80%。

[0268] 于pH=3.9洗脱后,获得88%的收率。该实验显示,至少96%的血浆白蛋白被HEA-HyperCel载体上的多柱色谱模式的色谱捕获,至少88%的该白蛋白在洗脱时被收集,其相当于捕获/洗脱平衡为至少80%。该凝胶上的多柱色谱能够将传统色谱的凝胶容量自30g/l改变至52g/l,即每批需要的总凝胶量减少70%。

[0269] 因为人血浆由约40g/l的白蛋白组成,至少33g/l可以根据该实施例纯化。

[0270] 实施例4:通过多柱亲和色谱捕获纤维蛋白原

[0271] 材料和方法

[0272] 血浆组分

[0273] 采用根据实施例3白蛋白纯化(通过2个多柱色谱进行处理14小时)的方法结束时收集的不含IgG和白蛋白的血浆,将其冷冻并于-80℃储存,然后在采用色谱捕获纤维蛋白原的当天融化。

[0274] 血浆组分的特性:抗原纤维蛋白原为0.32g/l。

[0275] 缓冲溶液

[0276] 色谱方法的各个步骤中使用的缓冲溶液的组成如下面表18所示。

[0277] 表18:亲和色谱的缓冲溶液

[0278]

阶段	组成	目标值
柱平衡并回复至基线	10 mM 柠檬酸三钠, 100 mM 氯化钠	pH 调节至 7.4
预洗脱	2.0 M 氯化钠	pH 调节至 7.0
洗脱	20 mM 氨基丁三醇(Tris HCl), 1.5 M 氯化镁, 20% v/v 丙二醇, 200 mM 精氨酸	pH 调节至 7.0

[0279] 亲和色谱凝胶

[0280] 对于该色谱,采用CaptureSelect纤维蛋白原亲和凝胶(Life Technologies ref.191291050,批号171013-01),其纤维蛋白原捕获特性如下面表19所示。

[0281] 表19:CaptureSelect纤维蛋白原凝胶的量

[0282]

纤维蛋白原负载	10g/l凝胶
---------	---------

[0283] 柱

[0284] 采用5ml轴向柱(reference Tricorn 5/100(GE Healthcare),柱体积:1.6ml;柱高度:8cm)。

[0285] 亲和纯化

[0286] 将融化的不含免疫球蛋白和不含白蛋白的血浆不加改变地注入平衡的纤维蛋白原CaptureSelect亲和柱上。应用的负载为约10g/l。洗脱物的纤维蛋白原含量通过ELISA方法测定。

[0287] 结果

[0288] 在该方法结束时,纤维蛋白原收率为70%。获得的产物的抗原纤维蛋白原浓度为1.3mg/ml。

[0289] 该实验明确证实,通过连续仅采用色谱步骤(除了病毒灭活和过滤步骤)可以捕获三种丰富的血浆蛋白。

[0290] 在该实施例中,相继轮流进行两个连续多柱色谱和传统色谱,依次重复处理未吸

附的组分。超过10个小时的该色谱顺序(图2)对于被捕获的分子的质量没有影响,更特别是对最后被纯化的分子的质量没有影响,在此情况下其为纤维蛋白原。后者在整个纯化方法期间可以非常显著地保持其完整性,如各种连续色谱捕获的免疫球蛋白的非还原条件下的SDS-PAGE以及Coomassie蓝染色所示,随后捕获白蛋白,最后捕获纤维蛋白原(图3)。

[0291] 在该图3中,开始时的血浆以及随后的洗脱物和未保留组分显示就捕获分子而言血浆的连续损耗以及含有捕获分子的洗脱物的富集。

[0292] Well 1相当于分子量标记,well 2相当于未纯化的正常血浆。

[0293] Wells 3和4相当于实施例2中获得的组分。

[0294] Wells 5和6相当于实施例3中获得的组分。

[0295] Wells 7和8相当于实施例4中获得的组分。

[0296] 分子量为340kDa的纤维蛋白原在多柱免疫球蛋白捕获色谱的未保留组分以及多柱白蛋白捕获色谱的未保留组分中显著地保留了其分子完整性。在纤维蛋白原捕获亲和色谱的未保留组分中观察到没有纤维蛋白原的存在,所述纤维蛋白原被完全捕获,发现在该色谱的洗脱物中非常显著的完整结构。

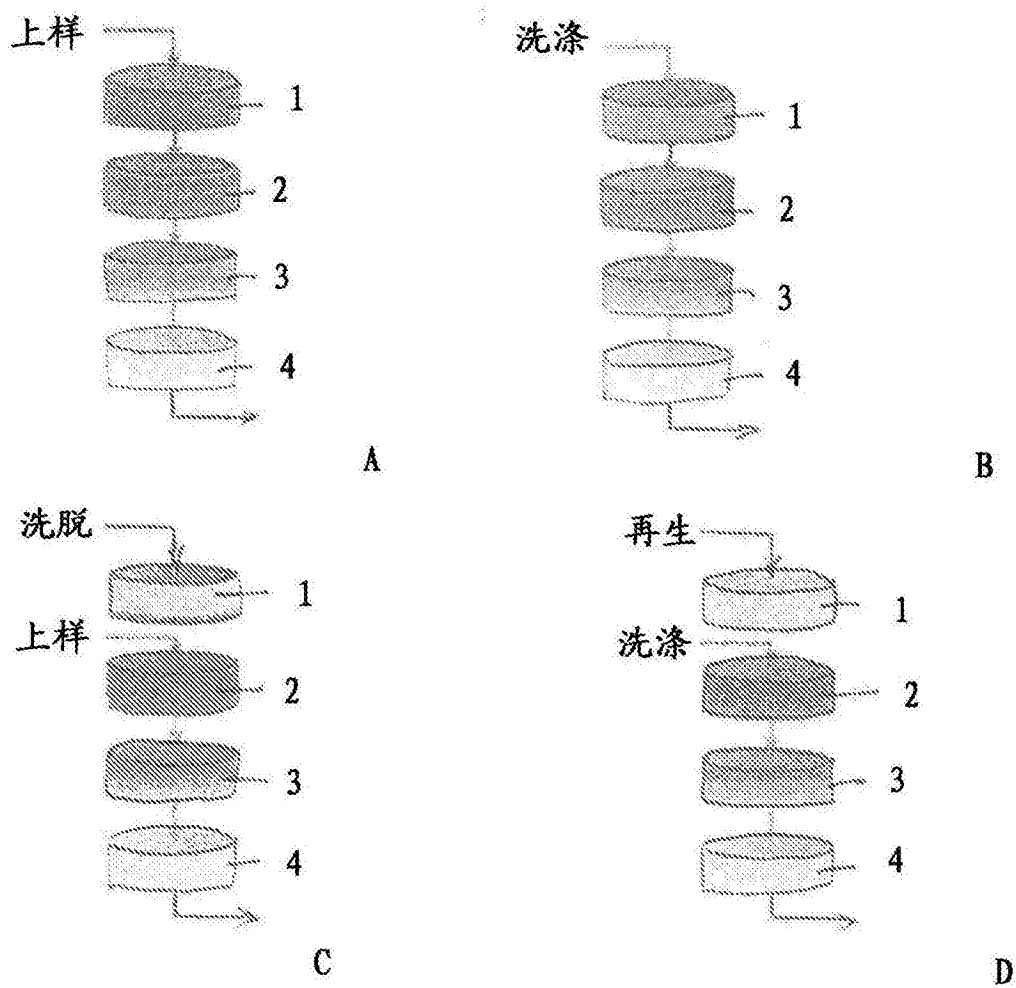


图1

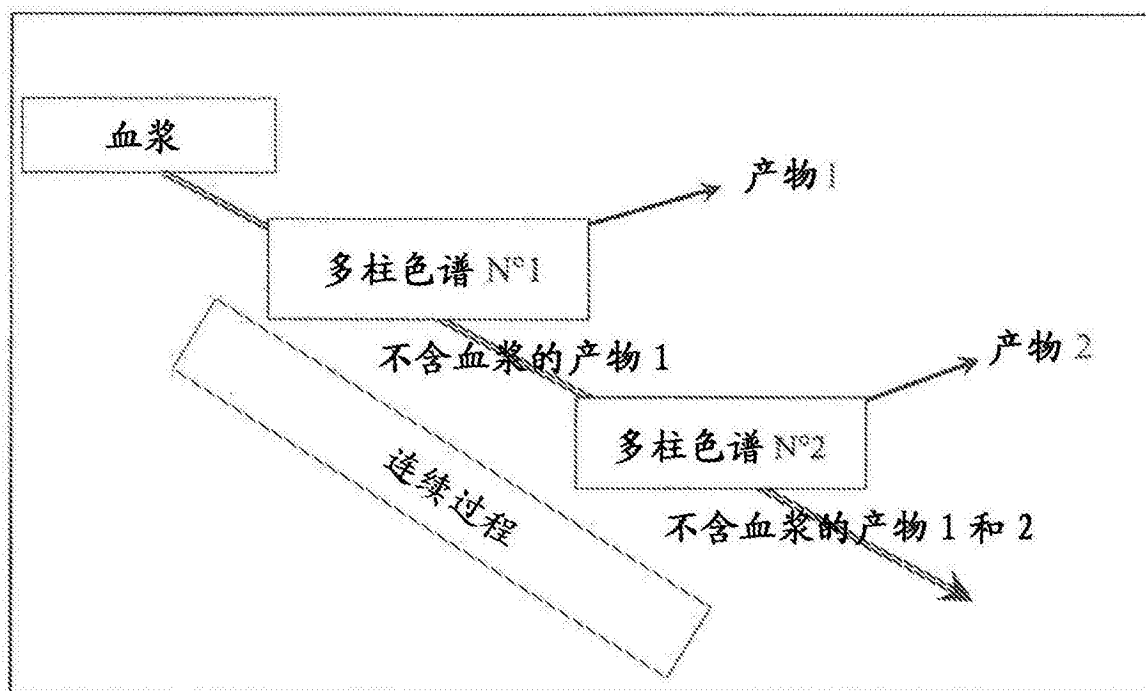


图2

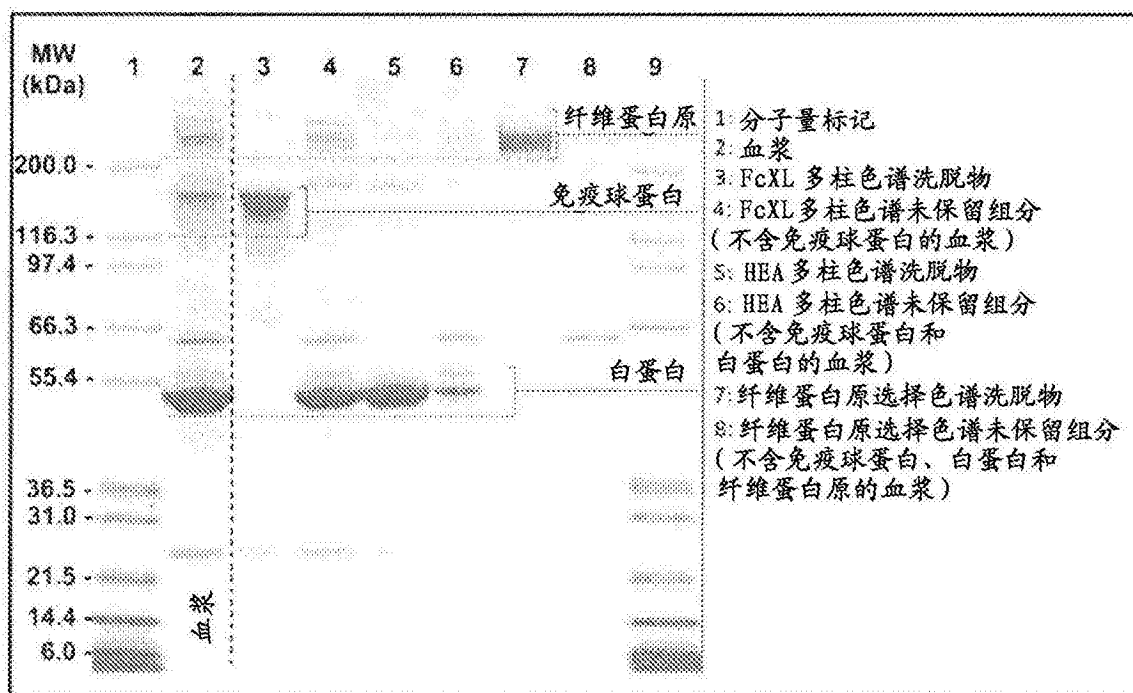


图3