



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105188737 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201480015923. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 02. 03

A61K 38/38(2006. 01)

(30) 优先权数据

C07D 241/52(2006. 01)

61/759, 922 2013. 02. 01 US

C07K 14/76(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/014478 2014. 02. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/121210 EN 2014. 08. 07

(71) 申请人 安皮奥制药股份有限公司

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 D. 巴 - 奥

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 刘国军

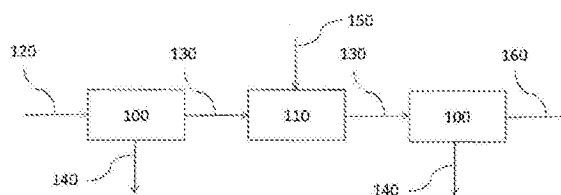
权利要求书3页 说明书20页 附图7页

(54) 发明名称

生产二酮基哌嗪和含有二酮基哌嗪的组合物的方法

(57) 摘要

本申请公开了制备在蛋白质和肽的药物组合物中增加量的二酮基哌嗪 (DKP) (如 DA-DKP) 的方法。本公开还提供了制备 DKP 的方法, 包括 (1) 将白蛋白与酶 (例如二肽基肽酶 IV (DPP-IV)) 接触, 所述酶将一对 N 端氨基酸从该白蛋白上裂解, 和 (2) 在有效导致 DKP 形成的条件下将该白蛋白加热。此外, 还公开对含 DKP- 和含白蛋白的流的处理, 以生产治疗用途的改进的、高价值的 DKP 组合物和纯化的白蛋白组合物。除了包含低白蛋白含量的第一治疗 DKP 组合物外, 还生产了以高白蛋白浓度为特征的第二有用治疗组合物。



1. 处理包含白蛋白和天冬氨酸-丙氨酸二酮基哌嗪 (DA-DKP) 的进样流以生产组合物的方法,该方法包括:

加工该进样流以生产第一白蛋白缺乏流和第一白蛋白富集流,其中所述第一白蛋白缺乏流包含存在于该进样流中的第一部分 DA-DKP,且所述第一白蛋白富集流包含存在于该进样流中的第二部分的 DA-DKP;

使该第一白蛋白富集流反应以生产 DA-DKP,从而使反应流包含白蛋白和 DA-DKP;和

加工该反应流以生产第二白蛋白缺乏流和第二白蛋白富集流,其中所述第二白蛋白缺乏流包含存在于该反应流中的一部分 DA-DKP,且第二白蛋白富集流包含存在于该反应流中的第二部分的 DA-DKP。

2. 根据权利要求 1 的方法,其中第一和第二白蛋白缺乏流中的至少一个具有治疗价值。

3. 根据权利要求 1 的方法,其中第一和第二白蛋白富集流中的至少一个具有治疗价值。

4. 根据权利要求 1 的方法,其中加工进样流和反应流中的至少一个包括以下中的至少一种:过滤、色谱法、沉降、萃取及其组合。

5. 根据权利要求 4 的方法,其中加工进样流和反应流中的至少一个包括过滤,其中所述过滤包括切向流过滤。

6. 根据权利要求 4 的方法,其中加工进样流和反应流中的至少一个包括色谱法,其中所述色谱法包括以下中的至少一种:尺寸排阻色谱法、亲和色谱法、阴离子交换色谱法和离子交换色谱法。

7. 根据权利要求 1 的方法,其中反应包括以下中的至少一种:热处理、化学反应、酶反应及它们的组合。

8. 根据权利要求 7 的方法,其中反应包括将第一白蛋白富集流加热至范围在约 40°C 至约 80°C 的平均整体温度。

9. 根据权利要求 7 的方法,其中反应包括将第一白蛋白富集流与以下至少一种进行的酶反应:二肽酶、激肽释放酶、组织蛋白酶、羧肽酶及其组合。

10. 根据权利要求 7 的方法,其中反应包括将第一白蛋白富集流至少与二肽基肽酶 IV 的酶反应。

11. 根据权利要求 7 的方法,其中反应包括将第一白蛋白富集流至少与内源性二肽基肽酶 IV 的酶反应。

12. 根据权利要求 1 的方法,其中反应包括在二肽基肽酶 IV 的存在下,将所述第一白蛋白富集流加热至范围在约 40°C 至约 80°C 的平均整体温度。

13. 根据权利要求 12 的方法,其中所述二肽基肽酶 IV 是内源性二肽基肽酶 IV。

14. 根据权利要求 1 的方法,其中所述进样流包含至少一种其他成分,所述其他成分选自:乙酰色氨酸钠、N-乙酰基色氨酸、辛酸钠、辛酸及其组合。

15. 根据权利要求 1 的方法,其中所述 DA-DKP 选自可溶的 DA-DKP、DA-DKP 盐及其组合。

16. 根据权利要求 1 的方法,其中所述第一白蛋白富集流包含进样流中至少约 90 重量%的白蛋白。

17. 根据权利要求 1 的方法,其中所述第二白蛋白富集流包含反应流中至少约 90 重

量%的白蛋白。

18. 根据权利要求 1 的方法,其中存在于第一白蛋白缺乏流中的第一部分的 DA-DKP 占存在于进样流中的 DA-DKP 的至少约 80 重量%。

19. 根据权利要求 1 的方法,其中存在于第二白蛋白缺乏流中的第一部分的 DA-DKP 包含存在于该反应流中的至少约 90 重量%的 DA-DKP。

20. 根据权利要求 1 的方法,其中所述第一白蛋白缺乏流包含浓度至少约 50 μM 的 DA-DKP。

21. 根据权利要求 1 的方法,其中所述第二白蛋白缺乏流包含浓度至少约 50 μM 的 DA-DKP。

22. 根据权利要求 1 的方法,还包括分析步骤,其中所述分析步骤包括:

分析所述第二白蛋白富集流得到至少一个度量;和

将该至少一个度量与至少一个参考值相比较,其中当所述至少一个度量小于该参考值时,重复该反应和加工步骤直至随后的白蛋白富集流的所述至少一个度量大于或等于所述至少一个参考值。

23. 根据权利要求 22 的方法,其中所述分析步骤包括选自高压液相色谱法和质谱法的方法。

24. 根据权利要求 22 的方法,其中所述至少一个度量是在加工步骤中生产的 DA-DKP 的质量,且所述参考值是进样流中每单位质量的白蛋白可生产 DA-DKP 的理论最大质量的一部分。

25. 根据权利要求 1 的方法,还包括调节进样流的 pH。

26. 根据权利要求 1 的方法,还包括调节反应流的 pH。

27. 根据权利要求 1 的方法,还包括稀释该进样流。

28. 根据权利要求 1 的方法,还包括稀释该反应流。

29. 根据权利要求 1 的方法,还包括稀释该进样流、反应流或这两者,其中稀释是用选自以下中至少一种稀释剂:盐水、乳酸盐林格氏溶液、林格氏乙酸盐溶液、羟乙基淀粉溶液和右旋糖溶液。

30. 组合物,其包含浓度大于约 100 μM 的 DA-DKP。

31. 根据权利要求 30 的组合物,其中白蛋白的浓度小于 1 重量%。

32. 根据权利要求 30 的组合物,其中 DA-DKP 的浓度大于约 150 μM 。

33. 根据权利要求 30 的组合物,其中 DA-DKP 的浓度大于约 200 μM 。

34. 根据权利要求 30 的组合物,其中所述组合物由人血清白蛋白组合物制备。

35. 根据权利要求 34 的组合物,其中所述人血清白蛋白组合物是市售的人血清白蛋白组合物。

36. 根据权利要求 34 的组合物,其中所述制备包括白蛋白的酶转化以生产 DA-DKP。

37. 根据权利要求 36 的组合物,其中所述制备还包括从该组合物中分离白蛋白。

38. 根据权利要求 30 的组合物,还包含至少一种其他成分,其选自:盐水、乳酸盐林格氏溶液、林格氏乙酸盐溶液、羟乙基淀粉溶液、右旋糖溶液及其组合。

39. 根据权利要求 30 的组合物,还包含至少一种其他成分,其选自:乙酰色氨酸钠、N-乙酰基色氨酸、辛酸钠、辛酸及其组合。

40. 制备含 DA-DKP 的组合物的方法,其包括:
在过滤血浆之前,进行:
- a) 将未过滤的血浆与酶接触,该酶将 N 末端二肽从血浆中的蛋白质上裂解,和
 - b) 将该血浆在有效导致 DA-DKP 或其生理学上可接受的盐形成的条件下加热。
41. 根据权利要求 40 的方法,其中所述蛋白质是白蛋白。
42. 根据权利要求 40 的方法,其中该加热步骤在约 40℃至约 80℃的温度进行。
43. 根据权利要求 40 的方法,其中所述酶包括二肽基肽酶 IV。
44. 根据权利要求 43 的方法,其中所述二肽基肽酶 IV 内源于该血浆。
45. 根据权利要求 40 的方法,还包括调节该血浆的 pH。
46. 根据权利要求 40 的方法,其中所述血浆还包含至少一种其他成分,其选自:乙酰色氨酸钠、N-乙酰基色氨酸、辛酸钠、辛酸及其组合。
47. 根据权利要求 40 的方法,其中该产品具有治疗价值。
48. 制备含 DA-DKP 的组合物的方法,其包括:
- a) 将含白蛋白的溶液与酶接触,该酶将一对 N 端氨基酸从该白蛋白上裂解,和
 - b) 将含白蛋白的溶液在有效导致 DA-DKP 或其生理学上可接受的盐形成的条件下加热。
49. 根据权利要求 48 的方法,其中该加热步骤在约 40℃至约 80℃的温度进行。
50. 根据权利要求 48 的方法,其中所述酶包括二肽基肽酶 IV。
51. 根据权利要求 50 的方法,其中所述二肽基肽酶 IV 内源于含白蛋白的溶液。
52. 根据权利要求 48 的方法,还包括调节含白蛋白的溶液的 pH。
53. 根据权利要求 48 的方法,其中所述含白蛋白的溶液还包含至少一种其他成分,其选自:乙酰色氨酸钠、N-乙酰基色氨酸、辛酸钠、辛酸及其组合。
54. 根据权利要求 48 的方法,其中产品具有治疗价值。

生产二酮基哌嗪和含有二酮基哌嗪的组合物的方法

[0001] 本申请请求保护于 2013 年 2 月 1 日提交的美国临时申请号 61/759,922 的优先权权益,将其全部内容引入本文作为参考。

技术领域

[0002] 本文提供了生产二酮基哌嗪,例如天冬氨酸-丙氨酸二酮基哌嗪(DA-DKP)的方法,包括采用肽酶(例如二肽基肽酶 IV(DPP-IV))的方法。还提供了用于制备蛋白质和肽的药物组合物的方法,其提高了二酮基哌嗪在该组合物中的含量。此外,提供了用于处理含二酮基哌嗪和白蛋白的物流的方法,以生产治疗用途的二酮基哌嗪组合物和纯化的白蛋白组合物。除了包含低白蛋白含量的第一治疗性的二酮基哌嗪组合物,还可生产以高白蛋白浓度为特征的第二治疗性组合物。

背景技术

[0003] 白蛋白是可溶的、单体的、球状蛋白(分子量约 66kDa)且其是在哺乳动物血浆中发现的最丰富的蛋白质,其以 0.03-0.05 克/毫升的正常浓度范围存在。白蛋白在心血管系统中起着多种重要的作用,包括维持血液渗透压。高浓度的白蛋白通过从周围组织的细胞内间隙转移液体至血管内系统,导致血浆容积膨胀。此外,白蛋白作为递送类固醇激素、血晶素和脂肪酸的转运蛋白发挥作用。白蛋白还有助于维持血液 pH 并参与凝血途径。

[0004] 由于这些基本功能,血流中正常白蛋白浓度对维持体内稳态至关重要。血液白蛋白浓度的降低或增高均可造成严重的健康问题。血液中低白蛋白浓度,低白蛋白血症,可由以下疾病所导致,例如肝功能不全和肾功能异常,以及创伤、重度烧伤和败血病。已证明从白蛋白治疗中获益的其他病症包括,但不限于,营养不良,饥饿,肾病综合征,胰腺炎和腹膜炎。出于该原因,含有巴氏灭菌的白蛋白的溶液通常在手术室和紧急医疗处理情况下作为复苏液施用。

[0005] 用于危重疾病中的市售人血清白蛋白(HSA)溶液有时是在特定情况下,例如烧伤、急性肺损伤(ALI)和休克用于恢复血容量。对于这些病人而言,HSA 给药是有争议的,最新证据表明,与更便宜的替代品,例如盐水相比,死亡率充其量是没有减少而已。此外,市售 HSA 溶液的异质性已经被证明并包括 HSA 分子的氧化和截断。在市售 HSA 溶液的加工和储存过程中,该蛋白质截断发生在该蛋白质的 N 端并导致 HSA 的前两个氨基酸,Asp-Ala 的裂解。由于 HSA 的 N 端特有的性质,这个二肽还被转化成环状二肽,称其为天冬氨酸-丙氨酸二酮基哌嗪(DA-DKP),也称为 3-甲基-2,5-二酮基哌嗪-6-乙酸。已发现,DA-DKP 大量存在于市售的 HSA 溶液中,且 DA-DKP 本身对体外的活化 PBMC 和 T 淋巴细胞具有免疫抑制作用。

[0006] 由 HSA 形成 DA-DKP 的机理目前尚不清楚,但是 N 端的自发降解和/或涉及肽酶的酶促反应在理论上可能起着作用。二肽基肽酶 IV(DPP-IV),也称为腺苷脱氨酶络合蛋白质 2 或 CD26(分化簇 26),是一种肽酶,其优选地从蛋白质的 N 端裂解 Xaa-Pro 和 Xaa-Ala 二肽。据报道,DPP-IV 在免疫和内皮细胞的细胞表面以及在可溶形式的血清中具有活性。

DPP-IV 的主要功能被认为是修饰生物活性肽、细胞因子和其他细胞表面蛋白质,用于调节免疫反应和细胞分化。此外,已经阐明了一个新的机理,其涉及 DPP-IV 介导的细胞外基质 (ECM) 的降解,从而导致内皮细胞侵入到成胶基质中。

[0007] DKP 已经显示出具有其自身独特的治疗用途,包括有治疗人自身免疫疾病的潜力。例如,DA-DKP 已经显示出对活化的外周血单核细胞和 T 淋巴细胞具有显著的免疫抑制作用。关于 HSA、DA-DKP 以及与其有关的治疗性治疗的其他公开可见于美国专利号 6,555,543 ;美国专利号 7,732,403 和美国专利申请号 US 2013-0090292A1,其全部内容引入本文作为参考。

[0008] 因此,考虑到 DKP 用于治疗人自身免疫和其他病症中的潜在治疗用途以及白蛋白在治疗低白蛋白血症、血容量不足和各种其他病症中的重要性,因此需要高品质的治疗性 DKP 组合物和高品质的白蛋白复苏液。本公开内容涉及以有效、高产率的操作生产这两种治疗组合物的方法。

发明内容

[0009] 市售的人血清白蛋白 (HSA) 的施用有可能被指定的用于患者,例如多重创伤患者。由于其异质性,其他组分 (例如蛋白酶) 可促成市售 HSA 的治疗效果。一种这样的蛋白酶 (二肽基肽酶 IV (DPP-IV)) 可从白蛋白的 N 端释放已知的免疫调节分子,天冬氨酸 - 丙氨酸二酮基哌嗪 (DA-DKP)。例如,通过科恩分级分离法制备的市售 HSA 溶液显示出具有 DPP-IV 活性。

[0010] 本公开的一个方面是生产 DKP,例如 DA-DKP。在一个实施方案中,DA-DKP 在 DPP-IV 的存在下由白蛋白生产。在一个实施方案中,所述 DPP-IV 是内源性的,例如在人血浆或 HSA 中。在一个实施方案中,血浆或 HSA 被加热。尽管不希望受到理论的束缚,但认为所述加热可通过提高该溶液的温度使更接近 DPP-IV 活性的最佳温度和 / 或通过热降解来提高 DPP-IV 的浓度。

[0011] 本公开的另一方面是处理包含白蛋白和 DKP (例如 DA-DKP) 的进样流以生产组合物的方法,该方法包括加工该进样流以生产第一白蛋白缺乏流和第一白蛋白富集流,其中所述第一白蛋白缺乏流包含存在于进样流中的 DKP 的第一部分,而第一白蛋白富集流包含存在于进样流中的 DKP 的第二部分。将第一白蛋白富集流反应以生产额外的 DKP,从而导致包含白蛋白和 DKP 的反应流。将该反应流处理以生产第二白蛋白缺乏流和第二白蛋白富集流,其中所述第二白蛋白缺乏流包含存在于该反应流中的 DKP 的一部分,而该第二白蛋白富集流包含存在于该反应流中的 DKP 的第二部分。

[0012] 在本公开的一些实施方案中,所生产的白蛋白富集流可具有治疗价值,包括但不限于,在治疗低白蛋白血症和血容量不足中的作用。在本公开的一些实施方案中,所生产的缺乏白蛋白、含 DKP 的物流可具有治疗价值,包括但不限于,在治疗炎症病症中的作用。

[0013] 本公开的另一方面,如上所述,是处理包含白蛋白和 DKP 的进样流以生产治疗性组合物的方法,还包括分析步骤,其中该分析步骤包括分析白蛋白富集流以得到至少一个度量,将所述至少一个度量与至少一个参考值相比较,其中当所述至少一个度量大于或小于该参考值时,重复该反应和加工步骤直至随后的白蛋白富集流的所述至少一个度量不大于或大于所述至少一个参考值。例如,该度量可以是该物流中白蛋白的量或 DA-DKP 的量。

[0014] 本公开的另一方面是包含 DKP 的组合物,其含有比市售的人血清白蛋白 (“HSA”) 制剂中白蛋白的浓度要小的白蛋白,所述市售制剂中白蛋白的浓度为在 5 重量%白蛋白溶液中每升 HSA 约 50 克白蛋白 (g/L) 或在 25 重量%白蛋白溶液中约 250g/L。在本公开的一些实施方案中,白蛋白在含 DKP 的组合物中的浓度可小于约 250g/L、小于约 200g/L、小于约 100g/L、小于约 50g/L、小于约 40g/L、小于约 30g/L、小于约 20g/L、小于约 10g/L、小于约 5g/L、小于约 4g/L、小于约 3g/L、小于约 2g/L、小于约 1g/L、小于约 0.9g/L、小于约 0.8g/L、小于约 0.7g/L、小于约 0.6g/L、小于约 0.5g/L、小于约 0.4g/L、小于约 0.3g/L、小于约 0.2g/L、小于约 0.1g/L、小于约 0.09g/L、小于约 0.08g/L、小于约 0.07g/L、小于约 0.06g/L、小于约 0.05g/L、小于约 0.04g/L、小于约 0.03g/L、小于约 0.02g/L、小于约 0.01g/L、小于约 0.009g/L、小于约 0.008g/L、小于约 0.007g/L、小于约 0.006g/L 或小于约 0.005g/L。在本公开的另一实施方案中,白蛋白在含 DKP 组合物中的浓度可为约 0g/L,或不能检测量。

[0015] 在本公开的一些实施方案中,包含 DKP 的组合物可具有治疗价值,包括但不限于,在治疗炎症病症中的作用。

[0016] 此外,本公开提供了合成 DKP 的方法。在一个实施方案中,所述方法包括在有效导致 DKP 形成的条件下,加热哺乳动物血浆。在一个实施方案中,该方法包括将血浆与酶接触,所述酶在有效生产 DKP 的条件下裂解蛋白质或肽的两个 N 端氨基酸。在一个实施方案中,该方法包括将血浆与 DPP-IV 接触,所述 DPP-IV 在有效生产 DA-DKP 的条件下裂解蛋白质或肽的两个 N 端氨基酸。

[0017] 本公开还提供制备蛋白质或肽的改进的药物组合物的方法。该方法包括处理血浆以增加 DKP (例如 DA-DKP) 在蛋白质或肽的药物组合物中的含量。

[0018] 本公开还提供了改进的蛋白质或肽的药物组合物。该改进是,所述组合物包含增加量的 DKP。

[0019] 上述内容是简要的概述以提供对本文所公开的方面、实施方案和结构的初步理解。这个概述既不是本文的方面、实施方案和结构的广泛概述也不是详尽的概述。其既不旨在确定关键或重要原理,也不是描述该方面、实施方案或结构的范围,而是以简化形式呈现所选概念,用以引入下文更加详尽的描述。可以理解,其他方面、实施方案和结构可能参与,单独或组合,一或多个上述或下文详述的特征。

附图说明

[0020] 附图被并入并形成说明书的一部分用以说明以下实例,即所述方面、实施方案或结构如果制成并使用且不应被理解为限制该方面、实施方案或结构仅为所说明和描述的实施例。其他特征和优势将通过下面更详尽的各个方面、实施方案或结构的说明变得显而易见。

[0021] 图 1 表明在 5%市售 HSA 溶液中的 DPP-IV 活性。DPP-IV 活性 (N = 3) 表示为:在 37°C 培养 24 小时的过程中,所产生的对硝基苯胺 (pNA, μ M) 的总量。使用 DPP-IV 抑制剂 (抑二肽素 A, diprotin A) 导致完全抑制 DPP-IV 的活性 (数据未显示)。

[0022] 图 2 表明温度对在 5%市售 HSA 的溶液 (CSL Behring) 中的 DPP-IV 活性的影响。DPP-IV 活性 (N = 3) 表示为:在 37°C (实心柱) 和 60°C (垂直线) 培养 2 小时的过程中,所产生的对硝基苯胺 (pNA, μ M) 的总量。

[0023] 图 3 表明在通过不同制备方法生产的 HSA 溶液中的 DPP-IV 活性。DPP-IV 活性 (N = 3) 表示为 : 在 37℃ 培养 24 小时的过程中, 所产生的对硝基苯胺 (pNA, μ M) 的总量。DPP-IV 活性是在使用科恩分级分离法制成的市售 HSA 溶液中 (实心棒, cHSA) 以及在水稻中制成的重组 HSA 溶液中 (垂直线, rHSA) 测定的。

[0024] 图 4 表明在以 60℃ 加热的 5% 市售 HSA 中制成的 DA-DKP。DA-DKP 的生产 (N = 3) 是在以 60℃ 加热的 5% 市售 HSA 中的不同时间点进行测定的, 其存在 (▲) 或不存在 (■) DPP-IV 抑制剂。分离 5% 市售 HSA 溶液的低分子量部分 (<5kDa) 并用 LCMS 分析 DA-DKP 含量。星号 (*) 代表相比于净 (neat) 5% HSA 的统计学显著性 ($p < 0.05$)。

[0025] 图 5 表明本公开的一个实施方案, 包括两个加工步骤和一个反应步骤, 其产生两个单独的含 DKP 的产物流和一个含白蛋白的产物流。

[0026] 图 6 表明本公开的一个实施方案, 类似于图 5, 包含含白蛋白的再循环流。

[0027] 图 7 表明本公开的实施方案, 类似于图 5, 包含在第二加工步骤过程中协助 DKP 回收的稀释流。

[0028] 参考数码

[0029]	#	- 组分
[0030]	100	- 加工步骤
[0031]	110	- 反应步骤
[0032]	120	- 进样流
[0033]	130	- 白蛋白富集流
[0034]	140	- 白蛋白缺乏流
[0035]	150	- 酶或催化剂
[0036]	160	- 最终白蛋白富集产物流
[0037]	170	- 白蛋白富集再循环流
[0038]	180	- 稀释流

[0039] 实施方案描述

[0040] 以下详细说明是通过举例而非限定来介绍本发明的。该描述将清楚地使本领域技术人员能够实施并使用本发明。

[0041] 对于说明书中的“一个实施方案”、“实施方案”“示例实施方案”等, 指的是, 所述实施方案可包括特定的特征、结构或特性, 但每个实施方案不一定包括该特定的特征、结构或特性。此外, 该短语不一定指的是同一实施方案。此外, 当特定的特征、结构或特性结合实施方案进行描述时, 应认为, 无论是否进行了明确阐述, 将该特征、结构或特性与其他实施方案组合是在本领域技术人员的知识范围内的。

[0042] 如本文所用, “至少一个”、“一个或多个”和“和 / 或”是开放式表述, 其在操作时既可以是结合的也可以是分开的。例如, 以下各表述“A、B 和 C 中至少一个”、“A、B 或 C 中至少一个”、“A、B 和 C 中的一个或多个”、“A、B 或 C 中的一个或多个”和“A、B 和 / 或 C”是指单独的 A、单独的 B、单独的 C、A 和 B 一起、A 和 C 一起、B 和 C 一起, 或 A、B 和 C 一起。

[0043] 人血清白蛋白 (HSA) 是最丰富的循环蛋白质, 其具有与配体结合和转运性质、抗氧化功能和酶活性。因为 HSA 在调控危重疾病中的血容量和渗透压中非常重要, 因此在制药工业上大量的生产它。市售 HSA 的优选的制造技术是基于 Cohn 及其同事的方法, 其使用

低温乙醇分级分离法来分离 HSA。市售的 HSA 制剂通常含有 0.08mmol/g HSA 浓度的稳定剂 N-乙酰基-色氨酸 (NAT) 和辛酸钠。市售 HSA 溶液的贮存期限通常为 3 年。最有可能是由于活性氧的产生,观察到了在溶液性质上的一些与长时间有关的变化,例如颜色变化、蛋白质的氧化、蛋白水解、聚集和沉降。因此,所述稳定剂 NAT 随时间被氧化,导致产生两种主要的降解物,其没有已知的毒性数据。

[0044] 由于所述科恩分级分离法的操作并非特异性地针对 HSA,因此一些蛋白质和肽与 HSA 共纯化,并因此存在于该市售溶液中。此外,由于 HSA 具有结合多个配体的独特能力,因此,其他具有已知生物活性的肽和蛋白质已使用蛋白质组技术在市售 HSA 溶液中得以鉴定。这些共纯化或结合的蛋白质包括蛋白酶(激肽释放酶、组织蛋白酶、羧肽酶和二肽酶)、蛋白酶抑制剂(激肽原)、细胞表面粘附蛋白(选择蛋白、钙粘素和 ICAM)和参与免疫的蛋白质(免疫球蛋白链和补体系统的组分)。最近,在还原条件下的 HSA 分子的独特固有的蛋白水解活性已被记录。因此,由于其异质性,施用 HSA 可能会给危重病患引入潜在的无法保证的副作用。

[0045] 除了蛋白质,市售的 HSA 溶液含有衍生自 HSA 的前两个 N 端氨基酸的小的免疫抑制分子,天冬氨酸-丙氨酸二酮基哌嗪或 DA-DKP。DA-DKP 被认为是通过提高 Rap1 活性并降低与 T 细胞受体信号转导途径有关的致活因子来调节 T 细胞细胞因子的产生。DA-DKP 在市售 HSA 溶液中形成的机理目前尚不清楚,但是一种理论认为,由于该 N 端的独特的化学性质,HSA 的 N 端自发降解以及随后的 DA-DKP。

[0046] 本公开是基于蛋白酶(尤其是二肽基肽酶 IV (DPP-IV))在市售 HSA 溶液中的存在。如下面实施例中所证明的,使用已知的生色测定,将 DPP-IV 活性在三种市售 HSA 溶液中进行测试。并且,将这个活性用已知的 DPP-IV 抑制剂(抑二肽素抑二肽素 A)进行废除。因此,除了存在于 DPP-IV 蛋白质中,DPP-IV 活性还存在于市售的 HSA 溶液中。该活性并不存在于重组 HSA 中,意味着,所观测到的 DPP-IV 活性是科恩分级分离法操作的结果。

[0047] 在市售 HSA 的制备过程中,将该产物通过在 60°C 加热巴氏消毒 10-11 小时。据报道,在血清中最佳 DPP-IV 活性是在 50 和 60°C 之间的,在 65°C 重组体和胚胎 DPP-IV 的活性逐渐降低。DPP-IV 的这一特有性质使其成为在市售 HSA 溶液中生产 DA-DKP 的候选。此外,低分子量成分(除了结合至 HSA)最有可能在巴氏消毒步骤之前被除去。因此,在市售 HSA 溶液中测定的大多数 DA-DKP 是从先前的巴氏消毒步骤重新生产的。在所研究的市售 HSA 溶液中,显著的 DPP-IV 活性是在 60°C 测定的。但是,总体活性仅为在 37°C 培养中存在的活性的 70-80%。

[0048] 在 60°C,市售 HSA 中生产的 DA-DKP 是使用检测 DA-DKP 的 LCMS 方法进行检测的。在市售 HSA 的净溶液中,在 60°C 持续 24 小时后,产生大量的 DA-DKP。当将 DPP-IV 抑制剂抑二肽素 A 加至所述市售 HSA 溶液中,在 24 小时的时间段内,在 60°C 所生产的 DA-DKP 的量降低约 3 倍。因此,这一发现表明,DPP-IV 部分地导致在市售 HSA 溶液中 DA-DKP 的形成。在 60°C,抑二肽素 A 并没有完全阻止 DA-DKP 的形成。抑二肽素 A 作为共价结合至 DPP-IV 活性位点内侧的 Ser630 的四面体中间体被捕获。抑二肽素 A (Ile-Pro-Ile) 是 DPP-IV 的底物,其具有低催化效率,从而导致明显的竞争抑制。有可能抑二肽素 A 在 60°C 培养 24 小时后被水解至足够程度,从而使得其他 DPP-IV 底物进入该活性位点,例如 HSA 的 N 末端。与 DA-DKP 的酶形成结合,有可能是通过 HSA 的 N 末端的自发降解形成 DA-DKP。

[0049] DPP-IV 的已知底物包括多种趋化因子、细胞因子、神经肽、循环激素和生物活性肽。主要研究的 DPP-IV 底物之一是类高血糖素肽 1 (GLP-1)，其调节循环血浆葡萄糖水平并因此在 II 型糖尿病的病因学中至关重要。以前已知的 DPP-IV 底物是多肽，且本发明人首次将 HSA 的 N 末端描述为底物。由于 HSA 天然构型的位阻，HSA 的 N 末端根本不可能进入到 DPP-IV 的活性位点。但是，需要使大部分的 HSA 的 N 末端进入到该 DPP-IV 的活性位点，以形成 DA-DKP。

[0050] 虽然不希望受到任何理论的束缚，仍存在至少两种方式使得 HSA 的 N 末端可出现在 DPP-IV 的活性位点。第一，在贮存过程中，HSA 在市售溶液中的氧化可导致 HSA 的裂解，从而导致 N 末端肽的产生，所述 N 末端肽是 DPP-IV 活性位点更好的底物。氧化还原活性金属（例如铁和铜）被发现在市售 HSA 溶液中大量存在。事实上，所述 HSA 的 N 末端结合铜，其可能导致原位产生活性氧 (ROS)，从而可导致 HSA 的 N 末端肽的裂解。第二，HSA 的缓慢变性可导致 N 末端的展开，使其成为更易通过的 DPP-IV 底物。这一点可得到以下事实的部分支持：在 60℃，HSA 处于可逆的展开形式，其可能暴露于 N 末端。在 HSA 溶液的延长贮存过程中，这个可逆的展开形式可能变得更加普遍，从而导致产生更多的 DA-DKP。

[0051] 所施用的 HSA 的免疫抑制能力是有据可查的。在大鼠的失血性休克模型中，HSA 以剂量依赖性的方式降低肺的渗透性和嗜中性粒细胞的隔离。在类似的大鼠休克模型中，所施用的 HSA 显著下调整联蛋白和 ICAM-1 的表达（参与免疫细胞到内皮的粘附的因子）。HSA 还抑制了响应于 TNF α 或补体暴露的嗜中性粒细胞的呼吸爆发，从而导致选择性和可逆地抑制嗜中性粒细胞的扩散。最终发现，HSA 是失血性休克模型中所用的复苏液中促炎作用最低的因子。依据本发明人之前的免疫学研究，DA-DKP 似乎是 HSA 的免疫抑制能力的部分原因。

[0052] 市售 HSA 溶液的异质性可对危重病患产生许多有益或有害的影响，这取决于所述患者的免疫状态。最近在市售 HSA 溶液中确定的一些化合物参与免疫调节和功能。此外，所述稳定剂 NAT 是一个众所周知的神经激肽-1 受体拮抗剂，其为免疫和炎性反应以及血管通透性的重要调控剂。本公开涉及以微摩尔浓度存在于市售 HSA 溶液中的抗炎因子 DA-DKP 的形成机理。市售 HSA 溶液含有显著水平的 DPP-IV 活性，其被抑二肽素 A（已知的 DPP-IV 抑制剂）所抑制。此外，由于所述分离其他血浆成分（例如 DPP-IV）的 Cohn 制造操作，DPP-IV 活性是市售 HSA 溶液特有的。最终，观察到在加热的市售 HSA 溶液中重新形成的 DA-DKP，并在抑二肽素 A 的存在下伴随相应的形成抑制。因此，在市售 HSA 溶液中，所述肽酶 DPP-IV 表现为参与 DA-DKP（已知的抗炎化合物）的形成。

[0053] 本公开的另一方面涉及处理包含白蛋白和 DKP（例如 DA-DKP）的进样流以生产组合物的方法，该方法包括加工该进样流以生产第一白蛋白缺乏流和第一白蛋白富集流，其中所述第一白蛋白缺乏流包含存在于该进样流中的第一部分 DKP，且所述第一白蛋白富集流包含存在于该进样流中的第二部分 DKP。将所述第一白蛋白富集流反应以产生额外的 DKP，从而形成包含白蛋白和 DKP 的反应流。将该反应流加工，从而生成第二白蛋白缺乏流和第二白蛋白富集流，其中所述第二白蛋白缺乏流包含存在于该反应流中的一部分 DKP，且所述第二白蛋白富集流包含存在于该反应流中的第二部分 DKP。

[0054] 在本公开的一些实施方案中，所生成的白蛋白富集流可能在治疗一些病症中具有治疗价值，包括但不限于，在治疗低白蛋白血症和血容量不足中的疗效，所述病症通常用市

售 HSA 制剂进行治疗。在本公开的一些实施方案中,所生成的缺乏白蛋白、含 DKP 的流可具有治疗价值,包括但不限于,在治疗炎症病症中的疗效。

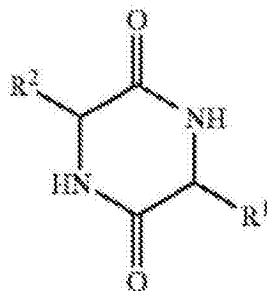
[0055] 在本公开的一些实施方案中,将至少两个含 DKP 的白蛋白缺乏流合并成单个流。

[0056] 本文中所提及的进样流是指含有白蛋白和 DKP 的任意水溶液。因此,术语“白蛋白”包括市售可得的白蛋白制剂,例如通过 Cohn 方法、其变型、色谱法和用于生产人或动物用治疗蛋白的任何其他合适的方法所生产的白蛋白溶液。术语“白蛋白”还指来自任意物种的白蛋白,包括但不限于,人和牛的白蛋白。“白蛋白”还包括通过合成方法生产的白蛋白蛋白质,例如通过重组技术和 / 或细胞表达系统,其使用细菌或哺乳动物表达宿主。

[0057] 在本公开的一些实施方案中,白蛋白在含白蛋白和含 DKP 的进样流中的浓度可在约 1 重量%至约 35 重量%的范围。在一些其他实施方案中,白蛋白在该进样流中的浓度在约 2 重量%至约 30 重量%的范围。还在另一实施方案中,白蛋白在该进样流中的浓度为约 4 重量%至约 26 重量%的范围。在具体实施方案中,白蛋白的浓度可为约 5 重量%或约 25 重量%。

[0058] 本文提及的“二酮基哌嗪”或 DKP 是指具有下式的任意化合物:

[0059]



[0060] 其中 R^1 和 R^2 可以是相同或不同的,且各自为氨基酸的侧链,其中所述氨基酸为甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、 α -氨基异丁酸、2,4-二氨基丁酸、2,3-二氨基丁酸、亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、丝氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、羟赖氨酸、组氨酸、精氨酸、高精氨酸、瓜氨酸、苯丙氨酸、对氨基苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、甲状腺氨酸、半胱氨酸、高半胱氨酸、甲硫氨酸、青霉胺或鸟氨酸;但是,条件是,当 R^1 是天冬酰胺或谷氨酰胺的侧链时,那么 R^2 不能是赖氨酸或鸟氨酸的侧链,且当 R^1 是赖氨酸或鸟氨酸的侧链时,那么 R^2 不能是天冬酰胺或谷氨酰胺的侧链。

[0061] 在本公开的一些实施方案中,所述 DKP (例如,存在于进样流、含白蛋白的流、含 DKP 的流、白蛋白富集流、白蛋白缺乏流及其组合中的至少一个)可包括以下至少一种:天冬氨酸-丙氨酸二酮基哌嗪 (DA-DKP)、甲硫氨酸-精氨酸二酮基哌嗪 (MR-DKP)、谷氨酸-丙氨酸二酮基哌嗪 (EA-DKP)、酪氨酸-谷氨酸二酮基哌嗪 (YE-DKP)、甘氨酸-亮氨酸二酮基哌嗪 (GL-DKP)、脯氨酸-苯丙氨酸二酮基哌嗪 (PF-DKP)、丙氨酸-脯氨酸二酮基哌嗪 (AP-DKP) 及其组合。在本公开的一些实施方案中,所述 DKP (例如,存在于进样流、含白蛋白的流、含 DKP 的流、白蛋白富集流、白蛋白缺乏流及其组合中的至少一个)可包括 DA-DKP,也称其为 3-甲基-2,5-二酮基哌嗪-6-乙酸,即,其中 R^1 是 $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ 和 R^2 是 $-\text{CH}_3$ 。

[0062] 在本公开的一些实施方案中,所述进样流可包含浓度在约 $0\ \mu\text{M}$ DKP 至约 $200\ \mu\text{M}$ DKP 范围内的 DKP。还在本公开的另一实施方案中,所述进样流可包含浓度在约 $50\ \mu\text{M}$ DKP 至约 $100\ \mu\text{M}$ DKP 范围内的 DKP。在本公开的一些实施方案中,所述 DKP 为至少 50% 的

DA-DKP、至少 60% 的 DA-DKP、至少 70% 的 DA-DKP、至少 80% 的 DA-DKP、至少 90% 的 DA-DKP、至少 95% 的 DA-DKP、至少 98% 的 DA-DKP、至少 99% 的 DA-DKP、至少 99.9% 的 DA-DKP 或 100% 的 DA-DKP。

[0063] 在本公开的一些实施方案中,进样流和反应流中至少一个的加工可包括蛋白质分离技术,其将进入流中的蛋白质(例如白蛋白)分成蛋白质富集流。该技术可包括过滤、色谱法、沉降、萃取及其组合中的至少一种。在本公开的一些实施方案中,进样流和反应流中至少一个的加工可包括过滤。还在另一实施方案中,进样流和反应流中至少一个的加工可包括切向过滤。

[0064] 本文中提及的过滤是指机械和/或物理操作,其通过使用跨过滤介质的压力差,将含白蛋白的进样流中的一部分与剩余部分分离。本文所用术语“机械过滤”是指,但不限于,尺寸排阻过滤。本文所用术语“物理过滤”是指,但不限于,分子间的相互作用,例如电荷吸引力和排斥力、氢键和偶极相互作用。过滤介质可包括,但不限于,滤纸、玻璃纤维、烧结玻璃、烧结金属、单片陶瓷(monolithic ceramic)、高分子膜以及带或不带助滤器(例如,但不限于,硅藻土)的任一这些过滤介质。过滤介质可以是亲水的和/或疏水的。

[0065] 在本公开的一些实施方案中,过滤可包括切向流过滤。本文所用术语“切向流”是指含白蛋白的进样流相对于该过滤介质的流向。这个流向可以是切向的(通常也称为“横向流”),或者是“法向流”(normal flow),或二者的组合。切向流是指含白蛋白的进样流,其特征在于该流的大多数均流经该过滤介质表面,而法向流是指以下述内容为特征的流:该流大多数均以相对于该过滤介质表面 90° 角的方向流经该过滤介质。

[0066] 在本公开的一些实施方案中,任一过滤类型的压力差,或引起流过其他加工单元操作(例如,色谱法)的压力差可通过以下实现:使用泵对进样流和反应流中的至少一个进行加压、或将过滤介质的下流侧呈真空、或向该过滤介质和进样流和反应流中至少一个施加离心力,或通过任何其他合适方式或其组合。本文所用的“下流侧”是指过滤介质包含含 DKP 流或滤液的那侧(也称为“白蛋白缺乏”和“含 DKP 侧”),相比于“上流侧”或含白蛋白流,其是指过滤介质包含渗余物的那侧(也称为“白蛋白富集”和“含白蛋白侧”)。本文所用“真空”是指绝对压力小于 14.7 磅/平方英寸绝对压强(psia)。

[0067] 在本公开的一些实施方案中,加工可包括色谱法。本文提及的“色谱法”是指机械和/或物理操作,其使用跨固定相的压力差将进样流和反应流中的至少一个的一种级分与剩余级分分离。本文所用术语“机械色谱法”是指,但不限于,尺寸排阻色谱。本文所用术语“物理色谱法”是指,但不限于,亲和色谱、离子交换色谱、快速蛋白液相色谱和免疫亲和色谱。

[0068] 色谱步骤中的固定相,可包括,但不限于,树脂(即,聚苯乙烯、聚苯乙烯二乙烯基苯和聚丙烯酰胺)、离子交换树脂(即,磺化、季铵、羧化和二乙基铵官能团)、交联琼脂糖、交联葡聚糖、磷酸纤维素、多孔玻璃和二氧化硅、氧化铝和氧化锆基质。此外,可将所述固定相固定在固体载体颗粒上,或圆筒的内壁上,其可通过物理吸附、化学结合和或涂布后的原位聚合。固定了的固定相可涂布颗粒和圆筒的外表面,和/或填充在固体颗粒内的任何可用的孔。该键合的固定相可选自,但不限于,结合多聚体的、接枝多聚体的、封端固定相、结合烷基的、结合苯基的、结合氰基的、结合二醇的和结合氨基的固定相,这些都是色谱领域一般技术人员已知的术语。此外,所述固定相可用生物特异性配体官能团化,所述生物特异

性配体包括,但不限于,抗体、蛋白质受体、类固醇激素、维生素和酶抑制剂。

[0069] 在本公开的一些实施方案中,可将固定相容纳并固定在色谱柱上。可将进样流和反应流中至少一个放入色谱柱的入口,随后白蛋白富集和白蛋白缺乏流从该柱的出口流出,其中白蛋白富集和白蛋白缺乏流的分离可通过不同的洗脱时间来实现。用于递送进样流穿过该色谱柱的压力差可通过使用至少一个泵将进样流和反应流中的至少一个进行加压从而得以实现。

[0070] 在本公开的一些实施方案中,加工可包括尺寸排阻方法,其中进样流或反应流或这二者被分成白蛋白富集渗余物流和含有 DKP 的白蛋白缺乏滤液流。在本公开的一些实施方案中,所述渗余物保留大于约 80 重量%、大于约 85 重量%、大于约 90 重量%、大于约 95 重量%或大于约 99 重量%的存在于含白蛋白和含 DKP 的进样流中的蛋白质,包括分子量大于约 10kDa、20kDa、30kDa、40kDa、50kDa、60kDa、70kDa、80kDa、90kDa 或 100kDa 的蛋白质。

[0071] 在本公开的一些实施方案中,DKP 反应可包括热处理、化学处理、酶处理及其组合中的至少一个。

[0072] 在本公开的一些实施方案中,含白蛋白的流的反应可包括热处理、巴氏消毒、酶反应、化学反应及其组合中的至少一个。在本公开的一些实施方案中,含白蛋白的流的反应可包括将含白蛋白的流加热至约 40℃至约 80℃范围的平均整体温度。在本公开的一些实施方案中,含白蛋白的流的反应可包括将含白蛋白的流加热至约 50℃至约 70℃范围的平均整体温度。在本公开的一些实施方案中,含白蛋白的流的反应可包括将该含白蛋白的流加热至约 55℃至约 65℃范围的平均整体温度。在本公开的一些实施方案中,含白蛋白的流的反应可包括将该含白蛋白的流加热至约 57.5℃至约 62.5℃范围的平均整体温度。在本公开的一些实施方案中,含白蛋白的流的反应可包括将该含白蛋白的流加热至约 60℃的平均整体温度。

[0073] 在本公开的一些实施方案中,含白蛋白的流的反应可包括该含白蛋白的流与二肽酶、激肽释放酶、组织蛋白酶、羧肽酶及其组合中的至少一种的酶反应。在本公开一些其他实施方案中,含白蛋白的流的反应可包括该流与至少二肽基肽酶 IV 的酶反应。

[0074] 在本公开的一些实施方案中,所述二肽酶、激肽释放酶、组织蛋白酶、羧肽酶及其组合中的至少一种可存在于进样流中,所述进样流是从市售的白蛋白供应商或非市售的白蛋白供应商处得到的。例如,含白蛋白的原料可含有酶促活性二肽酶,其能够在随后的反应步骤中或经过一段时间(例如,在环境条件下储存)产生额外的 DKP。在本公开的一些实施方案中,进样流可包含二肽酶,其中在使用显色底物(在实施例描述为 Gly-Pro-pNA)进行的试验中所测定的二肽酶活性的范围为大于 0 μ M pNA 至约 200 μ M pNA。在本公开的其他一些实施方案中,进样流可包含二肽酶,其中所述二肽酶活性的范围为约 40 μ M pNA 至约 140 μ M pNA。

[0075] 在本公开的一些其他实施方案中,可将二肽酶、激肽释放酶、组织蛋白酶、羧肽酶及其组合中的至少一种加至进样流、第一白蛋白富集流、第二白蛋白富集流、任意随后的白蛋白富集流及其组合中的至少一个中。在本公开的一些实施方案中,可将二肽酶加至进样流、第一白蛋白富集流、第二白蛋白富集流、任意随后的白蛋白富集流及其组合中的至少一个中。在本公开的其他实施方案中,可将二肽酶加至进样流、第一白蛋白富集流、第二白蛋白富集流、任意随后的白蛋白富集流及其组合中的至少一个中,其中所述肽酶活性可升至

约 0 μM pNA 至约 200 μM pNA。在其他实施方案中,所述肽酶活性可升至约 40 μM pNA 至约 150 μM pNA。

[0076] 在本公开的一些其他实施方案中,白蛋白富集流的反应可包括存在于白蛋白富集流中的白蛋白与至少一种氧化还原活性金属(例如铁和铜)的催化反应。其他可能的金属催化剂包括,但不限于,锂、钾、钙、钠、镁、铝、锌、镍、铅、锰、锡、银、铂、金及其组合。在本公开的一些实施方案中,白蛋白富集流的反应可包含至少一种氧化还原活性金属,其以均相催化剂、非均相催化剂或者两者的形式存在。在本公开的一些其他实施方案中,白蛋白富集流的反应可包括将该流穿过含有固体催化剂的填充床反应器,所述固体催化剂含有至少一种氧化还原活性金属,该金属附于底物上。在本公开的一些其他实施方案中,白蛋白富集流的反应可包括白蛋白在浆料反应器中的反应,其中将该氧化还原活性金属混悬于液体混合物中和/或使用混合装置将其混合。

[0077] 在本公开的一些实施方案中,用于白蛋白富集流的反应的反应器可包括批次反应器、连续反应器及其组合。在一些其他实施方案中,反应器可包括搅拌釜反应器、连续搅拌釜反应器、填充床反应器、活塞流反应器及其组合。

[0078] 在本公开的一些实施方案中,白蛋白富集流的反应可包括将白蛋白富集流加热,使得整体温度高于环境温度。仅作为示例,在一些实施方案中,白蛋白富集流的反应可包括将该流加热至一定温度,该温度小于使白蛋白和 DKP 变性的温度且大于约 20 $^{\circ}\text{C}$ 、大于约 30 $^{\circ}\text{C}$ 、大于约 40 $^{\circ}\text{C}$ 、大于约 50 $^{\circ}\text{C}$ 、大于约 60 $^{\circ}\text{C}$ 、大于约 70 $^{\circ}\text{C}$ 或大于约 80 $^{\circ}\text{C}$ 。在本公开的一些其他实施方案中,白蛋白富集流的反应可包括加热白蛋白富集流以及至少使白蛋白富集流发生酶反应和/或化学反应。

[0079] 在本公开的一些实施方案中,除了白蛋白和 DKP,进样流可包含许多其他组分。该组分可以是天然存在的物质,其衍生自产生白蛋白溶液的血液中,或者它们是经合成制得的白蛋白的合成方法产生的物质,或者它们可以是经天然产物的纯化所引入或生产的物质,例如,但不限于,使用 Cohn 方法及其变型纯化血浆。引入到含白蛋白的进样流的物质可包括有意加入到该含白蛋白进样流的添加剂,其可在合成性白蛋白的合成前或合成后,或天然存在的白蛋白的纯化前或纯化后加入。该添加剂包括,但不限于钠、钾、N-乙酰基色氨酸、辛酸钠和/或辛酸。在纯化天然白蛋白产物过程中产生的物质包括,但不限于,氨基酸、DKP 和任何其他通过天然存在的血浆白蛋白热降解、物理降解、酶降解或化学降解而得到的化合物或物质。

[0080] 在本公开的一些实施方案中,所述第一白蛋白富集流可包含至少约 10 重量%、至少约 20 重量%、至少约 30 重量%、至少约 40 重量%、至少约 50 重量%、至少约 60 重量%、至少约 70 重量%、至少约 80 重量%、至少约 90 重量%、至少约 99 重量%、至少约 99.1 重量%、至少约 99.2 重量%、至少约 99.3 重量%、至少约 99.4 重量%、至少约 99.5 重量%、至少约 99.6 重量%、至少约 99.7 重量%、至少约 99.8 重量%、至少约 99.9 重量%、至少约 99.91 重量%、至少约 99.92 重量%、至少约 99.93 重量%、至少约 99.94 重量%、至少约 99.95 重量%、至少约 99.96 重量%、至少约 99.97 重量%、至少约 99.98 重量%、至少约 99.99 重量%进样流中的白蛋白。

[0081] 通过举例的方式,对于以下这种情况,其中加工含白蛋白的进样流会导致含白蛋白的流包含该进样流中至少约 90 重量%的白蛋白,如果该含白蛋白的进样流以 0.03 克白

蛋白 / 毫升的白蛋白浓度包含 100 毫升含白蛋白的进料, 那么由加工步骤 (即, 过滤、色谱法等) 形成的产物流包含至少 2.7 克的白蛋白。同样以举例的方式, 如果含白蛋白的进样流以 0.5 克白蛋白 / 毫升的白蛋白浓度包含 100 毫升含白蛋白的进料, 那么所得的含白蛋白的流包含至少 45 克的白蛋白。本领域技术人员显而易见的是, 将上述示例性的体积和 / 或百分比按比例增加或降低, 将导致存在于白蛋白富集和白蛋白缺乏流中的白蛋白量的相应变化, 正如使用简单的数学所计算的。

[0082] 在本公开的一些实施方案中, 第二白蛋白富集流可包含至少约 10 重量%、至少约 20 重量%、至少约 30 重量%、至少约 40 重量%、至少约 50 重量%、至少约 60 重量%、至少约 70 重量%、至少约 80 重量%、至少约 90 重量%、至少约 99 重量%、至少约 99.1 重量%、至少约 99.2 重量%、至少约 99.3 重量%、至少约 99.4 重量%、至少约 99.5 重量%、至少约 99.6 重量%、至少约 99.7 重量%、至少约 99.8 重量%、至少约 99.9 重量%、至少约 99.91 重量%、至少约 99.92 重量%、至少约 99.93 重量%、至少约 99.94 重量%、至少约 99.95 重量%、至少约 99.96 重量%、至少约 99.97 重量%、至少约 99.98 重量%、至少约 99.99 重量% 反应流中的白蛋白。

[0083] 在本公开的一些实施方案中, 通过除前两步加工步骤之外的加工步骤制成的随后的白蛋白富集流可包含至少约 10 重量%、至少约 20 重量%、至少约 30 重量%、至少约 40 重量%、至少约 50 重量%、至少约 60 重量%、至少约 70 重量%、至少约 80 重量%、至少约 90 重量%、至少约 99 重量%、至少约 99.1 重量%、至少约 99.2 重量%、至少约 99.3 重量%、至少约 99.4 重量%、至少约 99.5 重量%、至少约 99.6 重量%、至少约 99.7 重量%、至少约 99.8 重量%、至少约 99.9 重量%、至少约 99.91 重量%、至少约 99.92 重量%、至少约 99.93 重量%、至少约 99.94 重量%、至少约 99.95 重量%、至少约 99.96 重量%、至少约 99.97 重量%、至少约 99.98 重量%、至少约 99.99 重量% 的存在于白蛋白富集流 (其在除前两步加工步骤之外的加工步骤进样) 中的白蛋白。

[0084] 在本公开的一些实施方案中, 存在于第一白蛋白缺乏流中的第一部分的 DKP 可包含至少约 5 重量%、至少约 10 重量%、至少约 20 重量%、至少约 30 重量%、至少约 40 重量%、至少约 50 重量%、至少约 60 重量%、至少约 70 重量%、至少约 80 重量%、至少约 90 重量% 或至少约 99 重量% 的存在于该进样流中的 DKP。

[0085] 在本公开的一些实施方案中, 存在于第二白蛋白缺乏流中的第一部分的 DKP 可包含至少约 5 重量%、至少约 10 重量%、至少约 20 重量%、至少约 30 重量%、至少约 40 重量%、至少约 50 重量%、至少约 60 重量%、至少约 70 重量%、至少约 80 重量%、至少约 90 重量% 或至少约 99 重量% 存在于该反应流中的 DKP。

[0086] 在本公开的一些实施方案中, 由于除前两步加工步骤之外的加工步骤而存在于随后的白蛋白缺乏流中的随后部分的 DKP, 可包含至少约 5 重量%、至少约 10 重量%、至少约 20 重量%、至少约 30 重量%、至少约 40 重量%、至少约 50 重量%、至少约 60 重量%、至少约 70 重量%、至少约 80 重量%、至少约 90 重量% 或至少约 99 重量% 的存在于该白蛋白富集流 (其在除前两步加工步骤之外的加工步骤进样) 中的 DKP。

[0087] 在本公开的一些实施方案中, 所述第一白蛋白缺乏流可包含至少约 10 μ M、至少约 20 μ M、至少约 30 μ M、至少约 40 μ M、至少约 50 μ M、至少约 60 μ M、至少约 70 μ M、至少约 80 μ M、至少约 90 μ M、至少约 100 μ M、至少约 110 μ M、至少约 120 μ M、至少约 130 μ M、至少约

140 μM 、至少约 150 μM 、至少约 160 μM 、至少约 170 μM 、至少约 180 μM 、至少约 190 μM 、至少约 200 μM 、至少约 250 μM 、至少约 300 μM 、至少约 350 μM 、至少约 400 μM 、至少约 450 μM 或至少约 500 μM 浓度的 DKP。在其他实施方案中,所述第二白蛋白缺乏流可包含至少约 10 μM 、至少约 20 μM 、至少约 30 μM 、至少约 40 μM 、至少约 50 μM 、至少约 60 μM 、至少约 70 μM 、至少约 80 μM 、至少约 90 μM 、至少约 100 μM 、至少约 110 μM 、至少约 120 μM 、至少约 130 μM 、至少约 140 μM 、至少约 150 μM 、至少约 160 μM 、至少约 170 μM 、至少约 180 μM 、至少约 190 μM 、至少约 200 μM 、至少约 250 μM 、至少约 300 μM 、至少约 350 μM 、至少约 400 μM 、至少约 450 μM 或至少约 500 μM 浓度的 DKP。

[0088] 如上所述,本公开的其他方面是处理包含白蛋白和 DKP 的进样流以生产治疗组合物的方法,其还包括分析步骤,其中所述分析步骤包括分析白蛋白富集流以得到至少一个度量,将所述至少一个度量与至少一个参考值相比较,其中当所述至少一个度量大于或小于该参考值,那么重复该反应和加工步骤至少随后的白蛋白富集流的所述至少一个度量不大于或大于至少一个参考值。

[0089] 在本公开的一些实施方案中,该分析步骤可包括高压液相色谱法和质谱法或用于测量感兴趣度量的任何其他合适的分析方法。在本公开的一些实施方案中,所述至少一个度量为至少一个加工步骤之后所剩的全长白蛋白的质量,而该参考值是可被加工用于生产 DA-DKP 的白蛋白的理论最大质量的分数的。在其他实施方案中,所述至少一个度量为至少一个加工步骤之后制成的 DKP 的质量,而该参考值是由进样流中的白蛋白制成的 DKP 的理论最大质量的分数的。

[0090] 在本公开的一些实施方案中,处理包含白蛋白和 DKP 的进样流以生产治疗组合物的方法可进一步包括调节白蛋白富集流的 pH。在本公开的一些实施方案中,可将进样流进行 pH 调节。在一些其他的实施方案中,可在反应步骤前和 / 或在反应步骤过程中对白蛋白富集流进行 pH 调节。在一些其他的实施方案中,可在加工步骤前和 / 或在加工步骤过程中对白蛋白富集流进行 pH 调节。可调节白蛋白富集流的 pH 以提高酶促反应、催化反应、热降解及其组合中的至少一个。在本公开的一些实施方案中,调节白蛋白富集流的 pH 可包括将该 pH 调节至约 1.5 至约 10.0 的范围。在本公开的一些其他实施方案中,对白蛋白富集流的 pH 的调节可包括调节该 pH 至约 4.0- 约 8.0 的范围。在本公开的其他实施方案中,将白蛋白富集流的 pH 调节至约生理 pH, 即, 调节至约 pH 7.3-7.4。

[0091] 在本公开的一些实施方案中,处理包含白蛋白和 DKP 的进样流以生产治疗组合物的方法还可包括稀释白蛋白富集流。在本公开的一些其他实施方案中,可将进样流和反应流中的至少一个进行稀释。在本公开的一些其他实施方案中,使用选自以下的稀释剂可完成稀释: 盐水、乳酸盐林格氏溶液、林格氏乙酸盐溶液、羟乙基淀粉溶液和右旋糖溶液。

[0092] 稀释步骤可提供用于添加额外的成分至白蛋白缺乏流和 / 或白蛋白富集流的方法,所述额外的成分具有各种额外的治疗价值。例如,乳酸盐林格氏溶液可作为稀释剂添加至白蛋白缺乏流(富含 DKP),用于帮助控制缺乏免疫力的患者中的代谢性酸中毒。可选择用作稀释剂的其他溶液,单独使用或作为混合物使用,以满足具体患者或人群的特定治疗需求,并将其加至白蛋白富集流和白蛋白缺乏流中的一个或这两者中。

[0093] 此外,稀释步骤可提供稀释剂,该稀释剂提供排代容积(displacement volume)使得存在于起始白蛋白进样材料中的 DKP 的回收百分比更高。在本公开的一些实施方案中,

所述加工步骤可包括尺寸排阻分离,其中存在于进样流中的白蛋白基本上全部保留在渗余物中。相反地,在这些实施方案中,存在于该进样流中的白蛋白基本上都没有随着滤液一起穿过该尺寸排阻分离单元。在这种情况下,所述白蛋白可被看作是浆液中的颗粒,而所剩余的含 DKP 的水相被看作是将该白蛋白颗粒悬浮在该浆液中的液体。因此,该滤液与该渗余物中所保留的一样,基本上是相同的含 DKP 水相。此外,在这种情况下,单级甚至多级尺寸排阻单元操作均不能完全将全部的含 DKP 的水相从该白蛋白中除去。如果没有一些辅助,那么该白蛋白富集流将保留一些含 DKP 的水相。稀释剂通过尺寸排阻单元操作并进入到该渗余物或白蛋白缺乏流中,从而可提供液体体积,其可从该白蛋白中冲洗和取代一部分的含 DKP 的水相。

[0094] 本公开的另一方面是包含 DKP 的组合物,其含有小于 10 重量%的白蛋白。在本公开的一些实施方案中,白蛋白在含 DKP 的组合物中的浓度可为小于约 1 重量%或小于约 0.1 重量%。在本公开的其他实施方案中,白蛋白在含 DKP 的组合物中的浓度可为约 0 重量%或不能检测的限度。

[0095] 在本公开的一些实施方案中,包含 DKP 的组合物可提供治疗益处,例如,但不限于,在治疗炎症病症中的作用。

[0096] 在本公开的一些实施方案中,所述 DKP 可包括以下的至少一种:天冬氨酸-丙氨酸 DKP、甲硫氨酸-精氨酸 DKP、谷氨酸-丙氨酸 DKP、酪氨酸-谷氨酸 DKP、甘氨酸-亮氨酸 DKP、脯氨酸-苯丙氨酸 DKP、丙氨酸-脯氨酸 DKP 及其组合。在其他实施方案中,所述 DKP 可以约 25 μ M DKP 至约 200 μ M DKP 的浓度范围存在。

[0097] 在本公开的一些实施方案中,所述包含 DKP 的组合物还可包含以下至少一种:盐水、乳酸盐林格氏溶液、林格氏乙酸盐溶液、羟乙基淀粉溶液、右旋糖溶液及其组合。在本公开的一些实施方案中,所述包含 DKP 的组合物还可包含选自以下的至少一种额外组分:乙酰色氨酸钠、N-乙酰基色氨酸、辛酸及其盐(例如辛酸钠),及其组合。该额外的组分可以市售 HSA 中常见的量存在。例如,该组分可以约 0.1mM 至约 30mM 的量或以下范围的量存在,该范围具有的范围下端选自:约 0.1mM、约 0.2mM、约 0.3mM、约 0.4mM、约 0.5mM、约 0.6mM、约 0.7mM、约 0.8mM、约 0.9mM、约 1mM、约 2mM、约 3mM、约 4mM、约 5mM、约 6mM、约 7mM、约 8mM、约 9mM、约 10mM、约 11mM、约 12mM、约 13mM、约 14mM、约 15mM 或约 20mM。该范围可具有的范围上端选自:约 1mM、约 2mM、约 3mM、约 4mM、约 5mM、约 6mM、约 7mM、约 8mM、约 9mM、约 10mM、约 11mM、约 12mM、约 13mM、约 14mM、约 15mM、约 16mM、约 17mM、约 18mM、约 19mM、约 20mM、约 21mM、约 22mM、约 23mM、约 24mM、约 25mM、约 26mM、约 27mM、约 28mM、约 29mM、约 30mM、约 31mM、约 32mM、约 33mM、约 34mM 或约 35mM。

[0098] 本公开的方法有利地提供了增加量的 DKP,其相比于之前已知的合成 DKP 的方法而言更加有效。特别地,本公开方法的这些实施方案是从哺乳动物血浆合成 DKP。该血浆可来自哺乳动物,例如兔、山羊、狗、猫、马或人。该动物优选是人,且该血浆优选是人血浆。

[0099] 血浆含有用于合成 DKP 的成分,包括白蛋白、免疫球蛋白和促红细胞生成素,以及其他的蛋白质和肽。本公开的方法包括由血浆合成 DKP,其中,相比于生产 DKP 的现有技术的方法,本公开的方法可有利地增加所合成的 DKP 的量。

[0100] HSA 是存在于血浆中的主要蛋白质组分,其由包含 585 个氨基酸残基的单链多肽组成并具有约等于 66,000 道尔顿的分子量(参见 Minghetti, P. P. 等人 (1986), Molecular

structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within 11-22 of chromosome 4. J. Biol. Chem. 261, 第 6747-6757 页)。HSA 通常是通过以下制备的：对人血浆进行科恩分级分离、低温乙醇分级分离或类似的方法，以生产含 HSA 的级分（HSA 在级分 V 中被分馏），然后通过使用各种纯化技术将该级分纯化。然后使用盐析方法、超滤方法、等电沉淀方法、电泳法、离子交换色谱技术、凝胶过滤色谱技术和 / 或亲和色谱技术中的一种或多种将该 HSA 纯化。

[0101] 当将血浆加工以生产 HSA 或其他蛋白质和 / 或肽的溶液时，该加工降低白蛋白、免疫球蛋白和促红细胞生成素，以及其他蛋白质和肽的量，这些可用于形成 DKP。换句话说，血浆相比于 HSA 或其他纯化的肽或蛋白质溶液具有更大量的白蛋白、免疫球蛋白和促红细胞生成素，以及其他的蛋白质和肽。因此，本文描述的所公开一些方法使用血浆来生产 DKP。

[0102] 因此，用于本公开的 DKP 可通过加热血浆来制备。“血浆”可以指的是未加工血浆或在中性 pH 的磷酸盐缓冲液中的血浆溶液。优选地，所述血浆溶液是浓溶液（例如约 100-500mM），从而实现 N 端和 / 或 C 端氨基酸的质子化。所述血浆可在 60℃ 加热至少约 2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、13 小时、14 小时、15 小时、16 小时、17 小时、18 小时、19 小时、20 小时、21 小时、22 小时、23 小时、24 小时、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天，从而导致所述 DKP 的形成。优选地，应避免蛋白质的变性。这可通过使用更短的时间和 / 或加入各约 0.02M 的辛酸或 N-乙酰基色氨酸来实现。

[0103] 用于本公开的 DKP 还可通过以下制备：将血浆与酶接触，所述酶能将两个 N 端氨基酸从血浆中的蛋白质或肽上裂解（例如，二肽基肽酶，且尤其是 DPP-IV），或者酶可将两个 C 端氨基酸从该蛋白质或肽上裂解（例如，羧肽酶）。该反应应在足以加速该反应但不会使蛋白质变性的温度下，在 pH 6-8 下进行，优选是在缓冲液中，例如磷酸盐缓冲液。

[0104] 在一个实施方案中，所需的 DKP 是 DA-DKP，该酶为 DPP-IV，温度是约 40℃ 至约 80℃，且优选地是约 60℃，该反应时间从约 5 小时至约 6 天。在一个实施方案中，所述 DPP-IV 是内源性且已在该血浆中的 DPP-IV、在加工过程中被加入血浆中的 DPP-IV 或其组合。该加工温度可为至少约 40、约 41、约 42、约 43、约 44、约 45、约 46、约 47、约 48、约 49、约 50、约 51、约 52、约 53、约 54、约 55、约 56、约 57、约 58、约 59、约 60、约 61、约 62、约 63、约 64、约 65、约 66、约 67、约 68、约 69、约 70、约 71、约 72、约 73、约 74、约 75、约 76、约 77、约 78、约 79 和约 80℃。该反应时间可为至少约 5、约 6、约 7、约 8、约 9、约 10、约 11、约 12、约 13、约 14、约 15、约 16、约 17、约 18、约 19、约 20、约 21、约 22、约 23 或更多小时、约 1、约 1.1、约 1.2、约 1.3、约 1.4、约 1.5、约 1.6、约 1.7、约 1.8 约 1.9、约 2、约 2.1、约 2.2、约 2.3、约 2.4、约 2.5、约 2.6、约 2.7、约 2.8、约 2.9、约 3、约 3.1、约 3.2、约 3.3、约 3.4、约 3.5、约 3.6、约 3.7、约 3.8、约 3.9、约 4、约 4.1、约 4.2、约 4.3、约 4.4、约 4.5、约 4.6、约 4.7、约 4.8、约 4.9、约 5、约 6、约 7、约 8、约 9 或约 10 天。

[0105] 通过本公开的方法制成的 DKP 可通过熟知的方法，例如尺寸排阻色谱法（例如，Centricon 过滤）、亲和色谱（例如，使用一系列小珠，其附着着靶向所需 DKP 的抗体或靶向截短蛋白或肽的一种或多种抗体）、阴离子交换法或阳离子交换法，从含有它们的溶液中纯化，包括从含有白蛋白、免疫球蛋白和促红细胞生成素的市售可得的药物组合物中纯化。可使用纯化的 DKP 并将其并入到上述药物组合物中。

[0106] 所述 DKP 包括所有可能的立体异构体,其可通过改变单个手性中心、轴或表面的构型获得。换句话说,所述 DKP 包括所有可能的非对映异构体,以及所有的旋光异构体(对映体)。

[0107] 本公开 DKP 的生理学上可接受的盐还可用于实施本公开。生理学上可接受的盐包括常规的无毒的盐,例如衍生自无机酸(例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸等)、有机酸(例如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、谷氨酸、天冬氨酸、苯甲酸、水杨酸、草酸、抗坏血酸等)或碱(例如药学上可接受的金属阳离子或衍生自 N, N- 二苄乙烯二胺、D- 葡萄糖胺或乙二胺的有机阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐)的盐。该盐是用常规方式制备的,例如,用酸中和化合物的游离碱形式。

[0108] 如上所述,本公开的 DKP 或其生理学上可接受的盐,可用于治疗 T 细胞介导的疾病或用于抑制 T 细胞的活化。为了做到这点,将 DKP 或其生理学上可接受的盐给药至需要该治疗的动物。优选地,该动物是哺乳动物,例如兔、山羊、狗、猫、马或人。本公开化合物的有效剂型、给药方式和剂量可根据经验确定,并且能够在本领域技术范围内做出此类决定。本领域技术人员应理解,该剂量将根据所采用的具体化合物、所治疗的疾病或病症、该疾病或病症的严重性、给药途径、化合物的排泄速率、治疗的持续时间、向该动物所给药的任何其他药物的确定、该动物的年龄、尺寸和物种以及在医学和兽医学领域已知的类似因素而改变。通常,本公开化合物的合适的每日剂量将是化合物有效地产生治疗效果所用的最低剂量。但是,该每日剂量将通过主治医师或兽医在合理的医学判断范围内进行确定。如果需要,该有效日剂量可按如下给药:在一天内,以合适的时间间隔分别给药 2、3、4、5、6 或更多的分剂量。应持续给药该化合物直至达到可接受的响应。

[0109] 可以任意合适的给药途径将本公开化合物(即,DKP 及其生理学上可接受的盐)给药至动物患者用于治疗,所述给药途径包括口服、经鼻、直肠、阴道、胃肠外(例如,静脉内、脊柱内、腹膜内、皮下或肌内)、脑池内、经皮、颅内、脑内和局部(包括颊和舌下)给药。优选的给药途径是口服和静脉内。

[0110] 尽管可以单独给药本公开的化合物,但优选将所述化合物作为药物制剂(组合物)给药。本公开的药物组合物包含作为活性成分的本公开化合物,其与一种或多种药学上可接受的载体和,任选地,与一种或多种其他化合物、药物或其他材料混合。各个载体必须是“可接受的”,意味着其与该制剂的其他成分相容且对该动物无害。药学上可接受的载体是本领域熟知的。无论所选择的给药途径如何,都应通过本领域技术人员已知的常规方法将本公开的化合物配制于药学上可接受的剂型中。参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences.

[0111] 通过参考以下实施例,将更容易理解上面概括性描述的本发明,所包括的实施例仅为了说明本发明实施方案的一些方面。所述实施例不旨在限制本发明,本领域技术人员将通过上述教导和以下实施例中理解到,其他技术和方法可满足本权利要求,并且可在不脱离请求保护的发明范围的情况下采用。

[0112] 实施例 1

[0113] 蛋白质组分析是在市售 HSA 溶液中进行的,用以了解治疗效果、不良反应和在使用 HSA 溶液的治疗中所涉及的机理。在这一研究中,对不同于 HSA 的 141 个蛋白质所对应的共计 1219 个肽进行鉴定。更重要的是,确定肽酶 DPP-IV 在该市售 HSA 溶液中。因此,由

于其裂解丙氨酸残基之后的肽的能力,因此认为 DPP-IV 可能参与市售 HSA 溶液中 DA-DKP 的形成。为了验证这一假设,使用显色底物和已知的 DPP-IV 抑制剂来测试市售可得的 HSA 溶液的 DPP-IV 活性。DPP-IV 活性的存在还在重组 HSA 来源中进行测试,所述重组 HSA 来源不是经由科恩分级分离法生产的。最终,评估了温度对市售 HSA 溶液中 DPP-IV 活性以及 DA-DKP 的生产的影响。

[0114] 材料和方法

[0115] 材料。在整个研究中使用了三种市售可得的 250mL 5% HSA(w/v) 产品 (CSL Behring LLC, Kankakee, IL, USA ;Grifols Biologicals Inc., Los Angeles, CA, USA ; Octapharma USA Inc., Hoboken, NJ, USA)。所述 N 端 HSA 肽 (DAHK) 是由 Diosynth Inc. (荷兰) 制造。重组 HSA(ecoHSA™) 获自 Genlantis Inc. (San Diego, CA, USA) 并在亚洲水稻 (Asian Rice) (稻 (*Oryza sativa*)) 的种子中生产。合成的 DA-DKP 是由 Syngene International Ltd. (印度) 生产的。所有其他的试剂 (包括 DPP-IV 底物和抑制剂) 均获自 Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, MO, USA)。

[0116] DPP-IV 测试。DPP-IV 活性是使用显色底物, Gly-Pro-pNA 进行测定的,其描述于 E. Nemoto, S. Sugawara, H. Takada, 等人, Increase of CD26/dipeptidyl peptidase IV expression on human gingival fibroblasts upon stimulation with cytokines and bacterial components. Infect Immun 67(1999)6225-33。所有反应在 DPP-IV 测试缓冲液 (pH 7.6) 中进行,所述测试缓冲液由 0.1M HEPES、0.12M NaCl、5mM KCl、8mM 葡萄糖和 10mg/ml 牛血清白蛋白 (BSA) 组成。将 5% 市售 HSA、重组 HSA 或缓冲液空白对照 (0.9% NaCl) 与 1mM Gly-Pro-pNA (DPP-IV 底物) 的测试缓冲液合并或仅与测试缓冲液 (-CON) 合并。在 37°C 或 60°C 培养 2-24 小时。对于 DPP-IV 抑制研究,在加入 DPP-IV 底物前,将 1mM 抑二肽素 A 的测试缓冲液与 HSA 溶液在 37°C 预培养 15 分钟。所有的培养在 405nm 处读取 (SpectraMax M2 分光光度计, Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, USA)。在 405nm 处的各读数通过以下进行校正:针对所测的各 HSA 溶液,将含 DPP-IV 底物的培养的 A405 从对应的 -CON 培养的 A405 中减去。

[0117] <5kDa HSA 级分的分离。对于 DA-DKP 形成的分析,将等分试样加至微型离心过滤器 (microcentrifugal filter) (Vivaspin 2, MWC0 5,000, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany)。将过滤器在室温以 3,500rpm 离心 30 分钟。收集该 <5kDa 的级分并将其转移至用于 LCMS 分析的独立的存储管中。

[0118] LCMS 测试。向各 <5kDa 的级分和 DA-DKP 合成标准品 (20-2000ng/mL) 中掺入 0.01mM L-色氨酸-d5 (吡啶-d5), 其用作内标物。将 50 μ L 注入强阴离子交换柱 (Spherisorb, S5SAX 250mm x 4.0mm, Waters, Milford, MA, USA), 该柱连接至配有质谱仪 (LCT-TOF, Micromass, UK) 的高效液相色谱 (HPLC, Waters 2795 Separations Module, Milford, MA, USA)。由 dH₂O (溶剂 A)、甲醇 (溶剂 B) 和 200mM 甲酸铵 (pH 5.4, 溶剂 C) 组成的三重移动相使用以下梯度 (表 1), 以 0.5mL/min 的流速使用。

[0119]

时 间 (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	25	40	35
10	10	40	50
15	10	40	50
15.01	25	40	35
20	25	40	35

[0120] 表 1. 在分离 >5kDa HSA 溶液中的 DA-DKP 所用的 HPLC 梯度。

[0121] 将该 HPLC 的输出液分成 1:20 (v/v) 并注入使用负电喷雾离子化 (-ESI) 的质谱仪中,其扫描范围是 80-1000m/z,锥孔电压是 30eV、离子源温度 100℃,且气体温度 300℃。DA-DKP 是通过检测 $[M] = 185$ 测定的, $[M] = 185$ 对应的是 DA-DKP 减去一个单个质子 (-H⁺)。DA-DKP 的直链, Asp-Ala,还可使用这个方法通过检测 $[M] = 203$ 进行分析。

[0122] 统计方法。以 μM 为单位,所生成的 pNA 的量是基于在 HEPES 缓冲液中的 pNA 摩尔消光系数计算的 (参见 R. Lottenberg, C. M. Jackson, Solution composition dependent variation in extinction coefficients for p-nitroaniline. Biochim Biophys Acta 742(1983)558-64)。统计分析是使用程序包 Excel (Microsoft) 和 Matlab R13 (MathWorks) 进行的。使用双尾学生 T 检验对各组进行比较,显著性水平在 $p < 0.05$ 。所有数据均以平均值 $\pm$ SD 进行报道。

[0123] 结果

[0124] 二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 的活性是在人血清白蛋白 (HSA) 的市售制剂中进行评估的。所选择的活性测试在文献中是有据可查的并涉及已知的 DPP-IV 底物即 Gly-Pro-pNA 的裂解。所得色原体 (pNA) 的释放在 405nm 处进行分光光度计测量。选择三种市售可得的 5% HSA 溶液,无特定的制造商偏好。唯一的要求就是,该溶液未过期且由不同的制造商使用科恩分级分离法生产。对于该酶测试的培养温度,选择 37℃ 和 60℃,因为前者代表生理条件,而后者代表市售 HSA 溶液的巴氏消毒温度。

[0125] DPP-IV 在 37℃ 的活性在所有这三种 5% 市售 HSA 溶液中进行测定。所有这三种市售 HSA 溶液含有显著的 DPP-IV 活性,其中 CSL Behring HSA 的活性稍低于 Octapharma 和 Grifols HSA 的活性 (图 1)。DPP-IV 活性的量与该 HSA 来源的有效期无关。在已知的 DPP-IV 抑制剂 (抑二肽素 A) 的存在下,DPP-IV 被完全抑制。这导致在整个培养过程中,相比于 -CON (数据未显示),没有额外的色原体产生。在一种市售 HSA 溶液中 (CSL Behring),测试了在 60℃ 的 DPP-IV 活性。DPP-IV 活性以显著水平呈现 (图 2)。但是,60℃ 的 DPP-IV 活性是 37℃ 的原始 DPP-IV 活性的约 70-80%。在这两个温度下,随着 HSA 溶液浓度的增加,观察到 DPP-IV 活性的剂量响应。

[0126] 为了比较在使用非科恩分级分离法分离出的 HSA 中 DPP-IV 活性,对水稻中生产的重组 HSA (rHSA) 进行分析。一种通过科恩分级分离法生产的市售 HSA 溶液 (cHSA) 也包括在该 DPP-IV 活性测试中。对于这两种 HSA 类型,浓度范围从净溶液 (5% w/v) 至稀溶液 (1% 和 2.5%)。在全部这三种浓度下,DPP-IV 活性在 cHSA 溶液中的量显著高于在 rHSA 溶液中的量 (图 3)。此外,DPP-IV 活性在 rHSA 溶液中与在仅含测试缓冲液的培养中没有统计学上显著差异。因此,在 rHSA 溶液中未呈现出显著的 DPP-IV 活性。

[0127] 所述 DKP (DA-DKP) 的形成是在 60℃ 加热的市售 HSA 溶液中测定的,该溶液中存在

或不存在已知的 DPP-IV 抑制剂（抑二肽素 A）。将含有 DA-DKP 的 HSA 的低分子量级分使用 5kDa MWC0 旋转柱进行分离。通过使用负电喷雾离子化（-ESI）的 LCMS 测定 <5kDa 级分的 DA-DKP 含量。在第一个 24 小时过程中，在不含抑制剂的培养中的 DA-DKP 含量比基线 DA-DKP 水平升高 30%（图 4）。在 DPP-IV 抑制剂的存在下，在 60℃，经 24 小时，DA-DKP 产生仅升高 10%。

[0128] 可指定在患者（例如多重创伤患者）中给药市售人血清白蛋白（HSA）。由于其异质性，其他成分，例如蛋白酶，可有助于市售 HSA 的疗效。一种这样的蛋白酶，二肽基肽酶 IV（DPP-IV），可从白蛋白的 N 末端释放已知的免疫调节分子，天冬氨酸-丙氨酸二酮基哌嗪（DA-DKP）。用具体的 DPP-IV 底物和抑制剂测试例如通过科恩分级分离法制备的市售 HSA 溶液的 DPP-IV 活性。DPP-IV 活性在 37℃ 和 60℃ 进行测试，因为市售 HSA 溶液在 60℃ 巴氏消毒 10-11 小时。市售 HSA 溶液中的 DPP-IV 活性与其他白蛋白来源（例如重组白蛋白）中的 DPP-IV 活性相比较。显著水平的 DPP-IV 活性存在于市售 HSA 溶液中。该活性使用特定的 DPP-IV 抑制剂进行消除，意味着 DPP-IV 活性存在于市售 HSA 中。在 60℃ 也呈现出该活性，其为在 37℃ 培养所保持的活性的 70-80%。在该重组来源中未呈现 DPP-IV 活性，意味着 DPP-IV 活性仅存在于使用科恩分级分离法生产的白蛋白溶液。最终，当将 HSA 溶液在 60℃ 加热时，观察到 DA-DKP 形成增加。该形成在 DPP-IV 抑制剂的存在下显著降低。HSA 中的 DPP-IV 活性可在危重患者中导致许多副产物的形成，包括 DA-DKP。

[0129] 实施例 2

[0130] 首先参考图 5，本公开的一个实施方案如方框图所示，处理包含白蛋白和任选的 DKP 的进样流 120 以生产治疗组合物的方法。该进样流 120 可包含，例如，盐水溶液，其含有经 Cohn 方法生产的约 25 重量%人血清白蛋白并在无白蛋白的情况下含有天冬氨酸-丙氨酸二酮基哌嗪（DA-DKP），其浓度范围约 50 μ M DA-DKP 至约 100 μ M DA-DKP。所述进样流还可包含各种浓度的乙酰色氨酸钠、N-乙酰基色氨酸和辛酸钠。将所述进样流进样至第一加工步骤 100，包括例如，切向流过滤，其提供尺寸排阻分离，其中分子量小于约 66 至约 69kDa 的任意分子穿过该过滤器进入第一白蛋白缺乏流 140（滤液）。在这个实施例中，所述第一白蛋白缺乏流基本上不包含白蛋白；约 0 重量%的白蛋白。换句话说，在该进样流 120 中的约 100%的白蛋白保留在第一白蛋白富集流 130 中。所述第一白蛋白缺乏流 140 包含盐水溶液，其在无白蛋白的情况下所具有的 DA-DKP 浓度范围为约 50 μ M DA-DKP 至约 100 μ M DA-DKP。所述渗余物将分子量大于约 66- 约 69kDa 的任何分子以及未被压入切向流过滤器的任何含 DKP 的盐水溶液保留在第一白蛋白富集流 130 中。

[0131] 在这个实施例中，DA-DKP 的理论最大量存在于该进样流 120 中，其既可以作为白蛋白 N 末端和 / 或 C 末端或连续末端的热降解、化学降解和 / 或酶降解产物存在的游离分子，也可以作为未反应的白蛋白。

[0132] 参考图 5，然后将所述第一白蛋白富集流 130 进样至反应步骤 110。该反应步骤可包括温度和 pH 控制反应器，例如搅拌釜反应器或类似于发酵容器的容器。在该实施例中，酶 150 存在于、产生于和 / 或计量至加热反应器中，该加热反应器维持在约 50℃ 且通过加入稀硫酸维持 pH 约 5.0（未示出）。在这个特定的实施例中，所加入的酶 150 包括二肽基肽酶 IV。将足量的二肽基肽酶 IV（DPP-IV）加至该反应步骤 110 中以提供约 40 μ M pNA 至约 150 μ M pNA 的肽酶活性。在这一实施例中的反应步骤 110 是批次反应器，其中所述反应

物、白蛋白和 DPP-IV 以设定点温度和 pH 维持在该反应器中约 1 小时至约 24 小时。随后将所得反应流即第二白蛋白富集流 130 在第二加工步骤 100 中进行加工。

[0133] 在这个具体实施例中,该反应步骤通过酶降解白蛋白的 N 末端和 / 或 C 末端、或连续末端从而产生显著量的额外的 DA-DKP。这可导致在无白蛋白的情况下 DA-DKP 在第二白蛋白富集流 130 中的浓度升高。因此,尽管该进样流 120 的 DA-DKP 在无白蛋白的情况下可具有约 50 μM DKP 至约 100 μM DA-DKP 的浓度范围,则该第二白蛋白富集流 130 的 DA-DKP 浓度范围在无白蛋白的情况下可为约 100 μM DKP 至约 150 μM DA-DKP。

[0134] 将第二白蛋白富集流 130 进样至第二加工步骤 100 中。在这个实施例中,所述第二加工步骤 100 是第二个独立单元操作。因此,它可以是第二个切向流过滤单元或一些完全不同的技术;例如,色谱柱。或者,所述第二加工步骤可使用与在第一加工步骤中所用的相同的设备完成,例如,以分批或半分批方式运行。在这个实施例中,该第二加工步骤 100 是第二个专用的切向流过滤单元,其以实施例 2 中所述的第一单元相同的原理进行操作。

[0135] 在上述实施例 2 中,所述第二白蛋白富集流 130 比进样流 120 含有更高浓度的 DA-DKP。但是,由于在第一加工步骤 100 中将无白蛋白盐水溶液除去,因此不存在该盐水溶液。因此,在该实施例 2 中,在 DA-DKP 理论产量上增加的增益本身就更大。

[0136] 过滤第二白蛋白富集流 130 形成最终白蛋白富集产物流 160、第一治疗组合物和第二白蛋白缺乏(在这种情况下无白蛋白)流 140,该第二白蛋白缺乏流 140 在无白蛋白的情况下包含盐水溶液,伴有约 100 μM DKP 至约 150 μM DA-DKP 的 DA-DKP 浓度范围。含 DA-DKP 的第一和第二白蛋白缺乏流可与一个流组合形成第二治疗组合物。例如,所述白蛋白富集产物流 160 可用于治疗病症,例如,但不限于,营养不良、饥饿导致的疾病(starvation)、肾病综合征、胰腺炎和腹膜炎。该组合的含 DA-DKP 的无白蛋白流还可用于治疗人自身免疫疾病。

[0137] 尽管图 5 显示了仅有一个反应步骤 110 和仅有两个加工步骤 100,但是这并不旨在将本公开的范围限制为一个反应步骤和两个加工步骤。其他的反应和加工步骤也可提高 DA-DKP 的产率。例如,在三个反应步骤 110 和四个加工步骤 100 之后可实现累计产率。本领域技术人员将理解,加工和反应步骤的数量,以及它们相对于彼此的排布(例如,串联、并排、有循环回路、无循环回路等)将取决于综合经济分析,该分析在每个位点以及每个应用都有所不同。

[0138] 实施例 3

[0139] 现参考图 6,实施例 2 的变化以方框图的形式来描述处理包含白蛋白和任选地 DKP 的进样流 120 以生产治疗组合物的方法,所述治疗组合物还包含白蛋白富集的再循环流 170。

[0140] 这个实施例还包括两个加工步骤 100 和一个反应步骤 110。在这个实施例中,假定一种情况,其中在这些步骤之后的 DKP 产率不能接受的低;例如,小于 50%。那么,将从第二加工步骤 100 流出的白蛋白富集流 130 分流成白蛋白富集的再循环流 170,将其循环回去,使得在将其输送入第一加工步骤 100 之前与进样流 120 组合,从而使第二次穿过该系统的白蛋白的产率上升至 50% 以上。

[0141] 在这个实施例中,认为该过程是以连续模式运行的。因此,最终白蛋白富集产物流 160 连续地从该过程离开,而新鲜原料 120 被连续地输送入该过程中。内部循环回路 170 可

显著大于进样流 120 和流 160,而这些流的实际量和比例取决于在该加工步骤 100 中每通过一次所得到的产率。

[0142] 实施例 4

[0143] 现参考图 7,另一个实施方案描述的是处理包含白蛋白和任选地 DKP 的进样流 120 以生产治疗组合物的方法,其中修改实施例 2 使包括进料至第二加工步骤 100 的稀释流 180。

[0144] 本实施例认为需要一种替代液 (displacement fluid),其在加工步骤过程中替代白蛋白中的含 DKP 水相。在这个实施例中,乳酸盐林格氏溶液被用作稀释流 180 以替代更多的存在于经切向流过滤单元的水相中的 DKP。

[0145] 在本文中示例性公开的发明可在缺乏任意元素下被适当地实施,其在本文中并未具体公开。然而,本领域技术人员显而易见的是,对该方法的许多改变、变更、修改、其他用途以及应用是可能的,并且不脱离本发明精神和范围的这些改变、变更、修改、其他用途以及应用被认为也涵盖在本发明中,其仅通过所附权利要求进行限定。

[0146] 本发明的上述讨论是以说明和描述的目的进行呈现。上述内容并不旨在限定本发明为本文公开的一种或多种形式。在例如上述发明详述中,将本发明的各个特征组合在一起形成一个或多个实施方案,用以简化本公开的内容。可将本发明实施方案的特征组合成为除上述讨论之外的替代实施方案。不应将本公开的这种方法解释成反映了以下这种目的:请求保护的发明需要的特征比各权利要求中明确陈述的要多。相反,正如所附权利要求所反映的,发明方面在于小于单个上述公开的实施方案的全部特征。因此,所附权利要求由此被并入发明详述中,而各权利要求以其自身作为本发明单独的优选实施方案。

[0147] 此外,尽管本发明说明书已包括了一或多个实施方案以及一些变更和修改的描述,但在理解了本公开之后,其它的变更、组合和修改也在本发明的范围内,例如,可能在本领域技术和知识范围内的那些。目的是为了获得权利,其包括在允许范围内的替代实施方案,包括请求保护的那些的替代、可互换和 / 或等同的结构、功能、范围或步骤,无论该替代、可互换和 / 或等同的结构、功能、范围或步骤在本文中是否公开,且并不打算公开地贡献任何专利性主题。

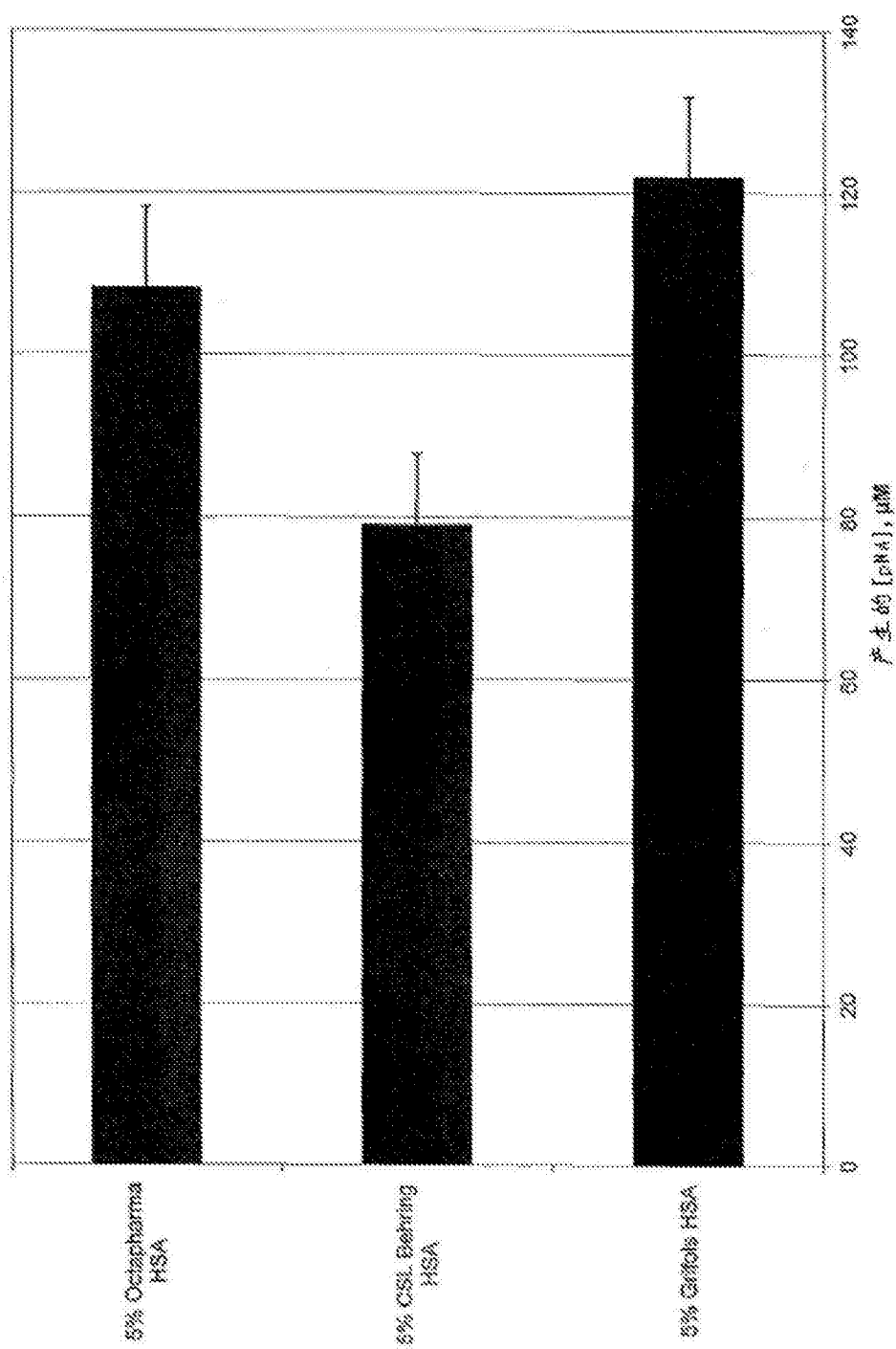


图 1

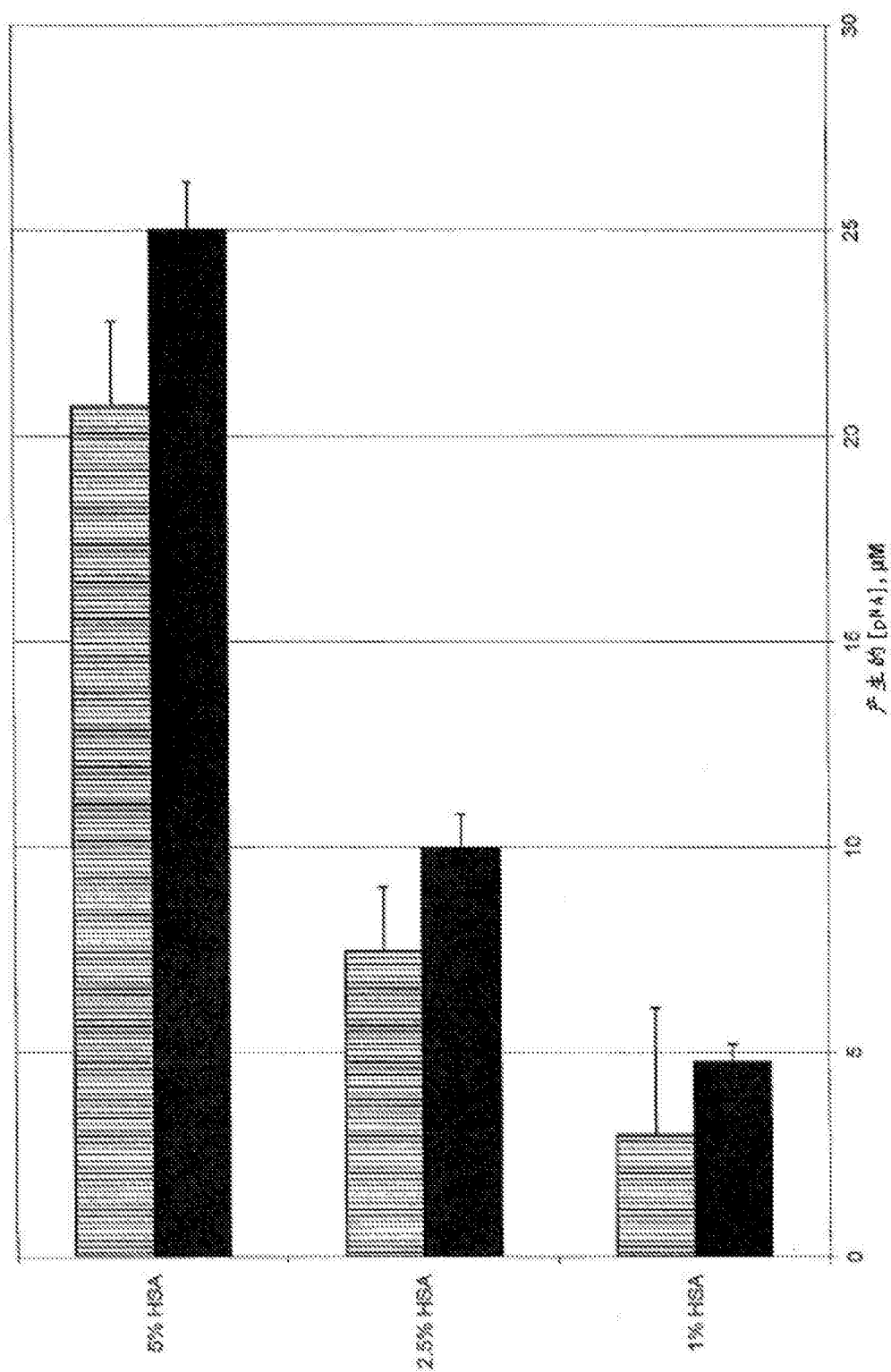


图 2

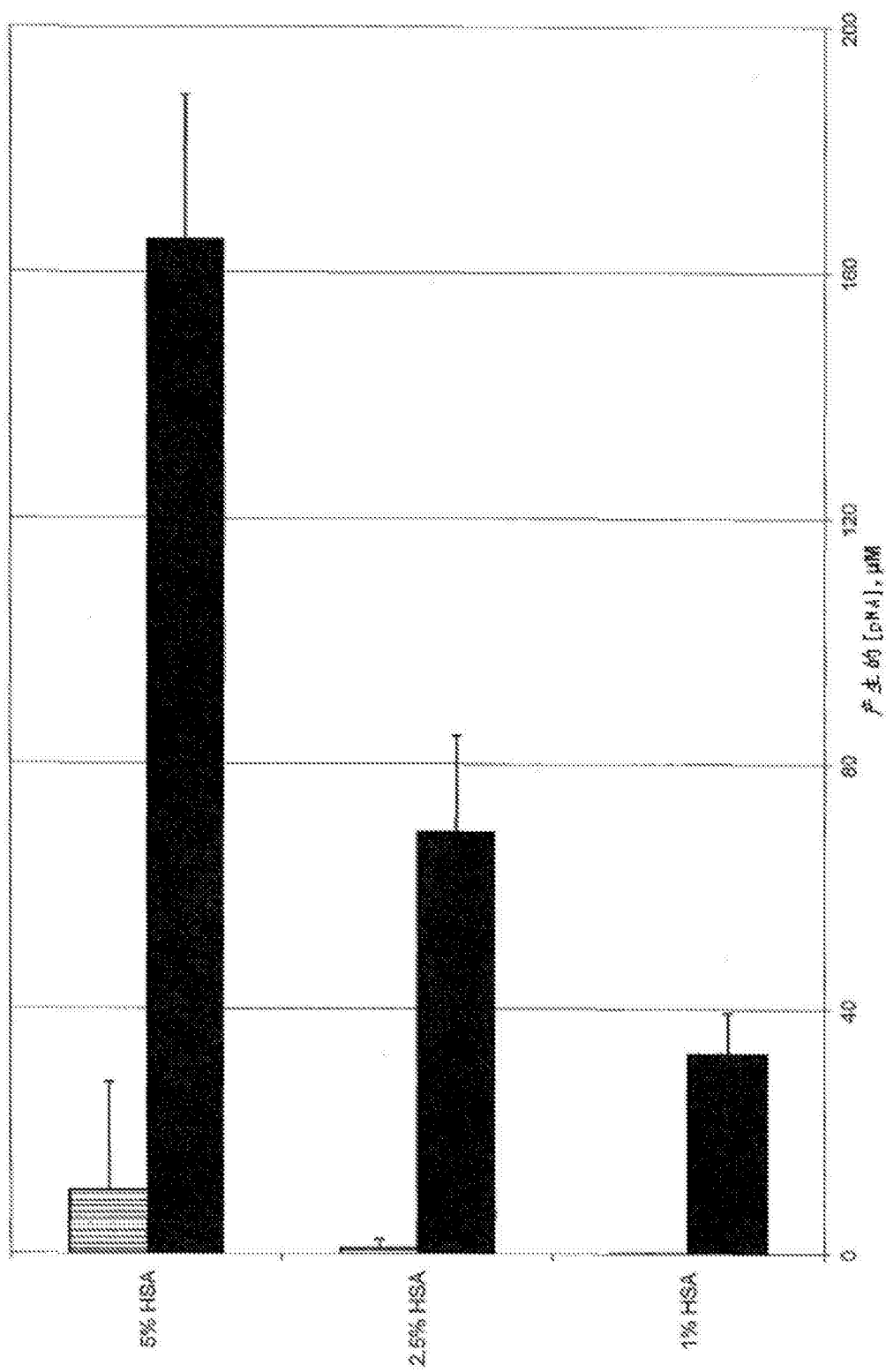


图 3

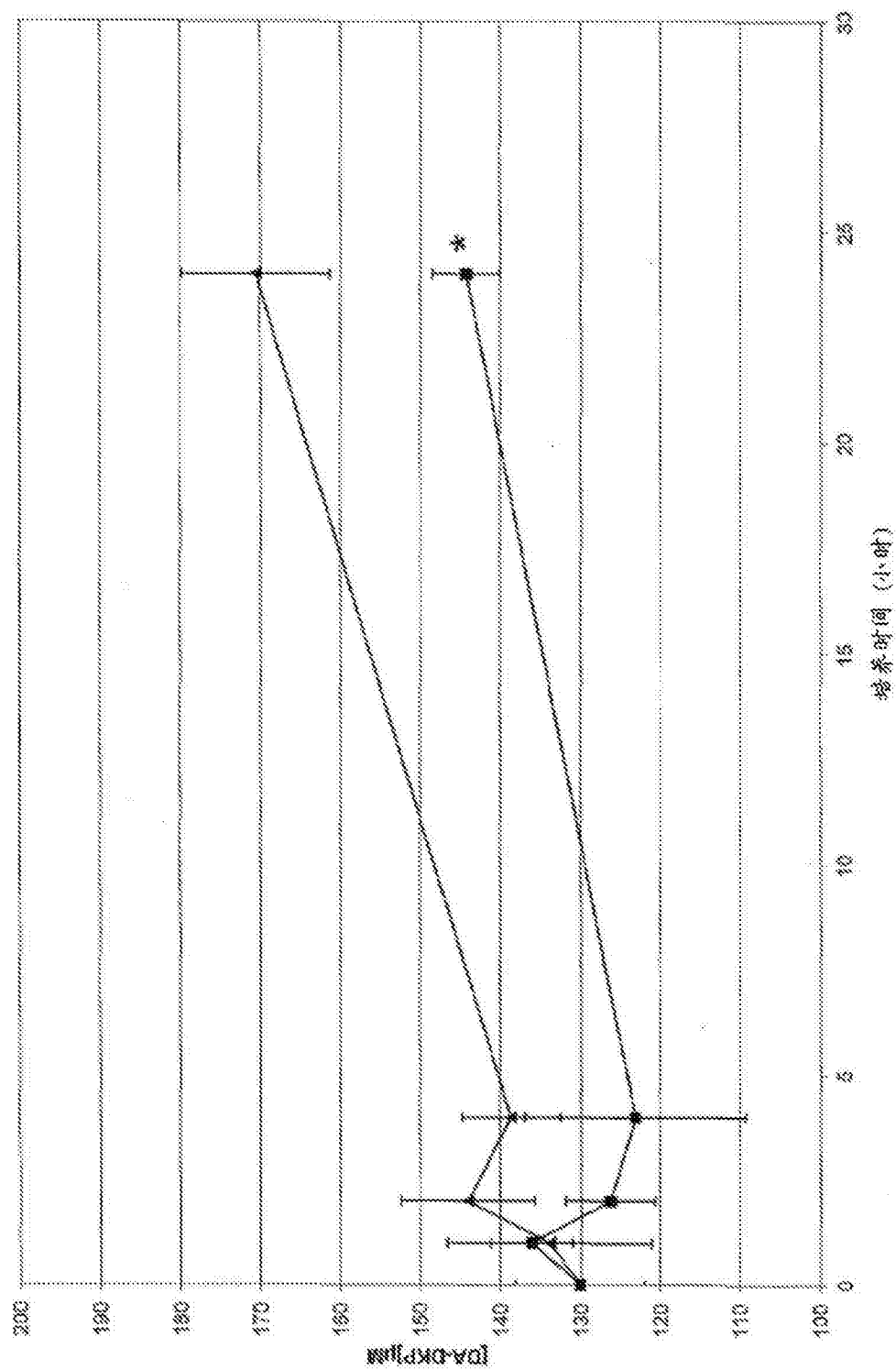


图 4

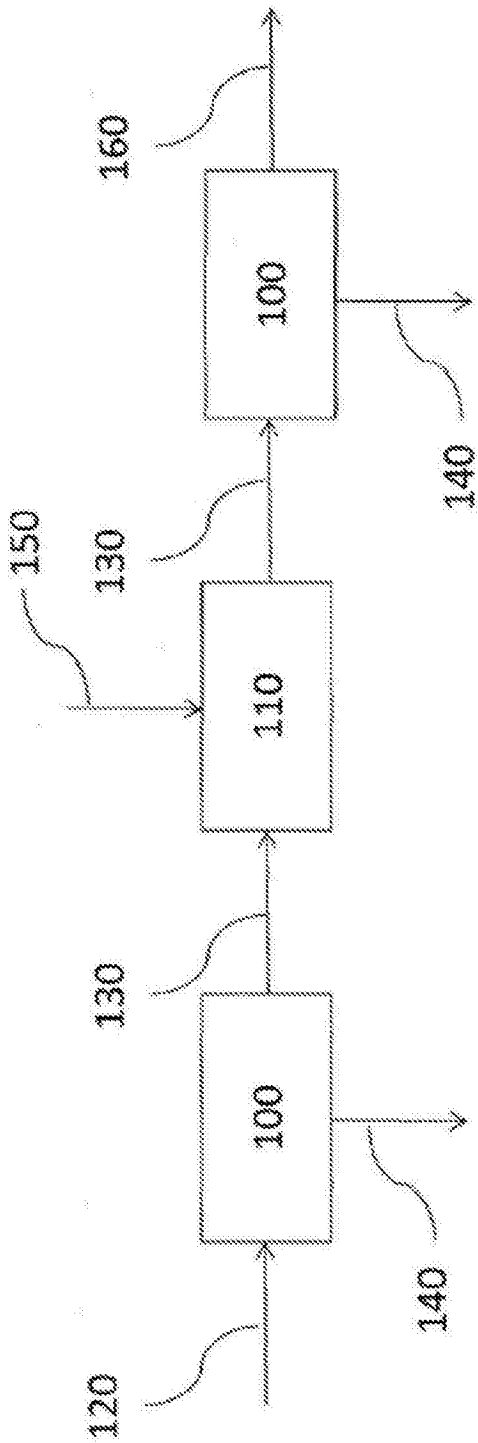


图 5

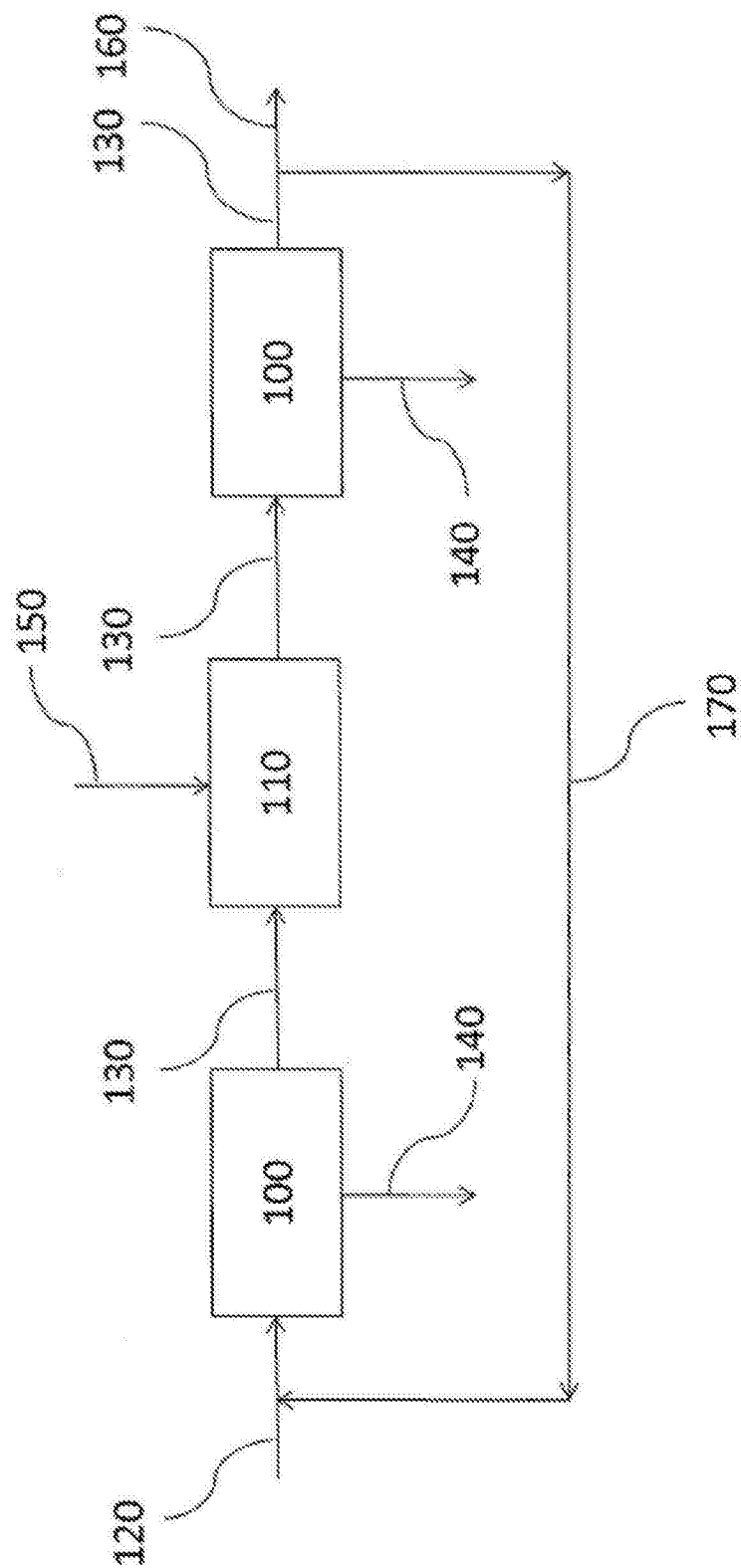


图 6

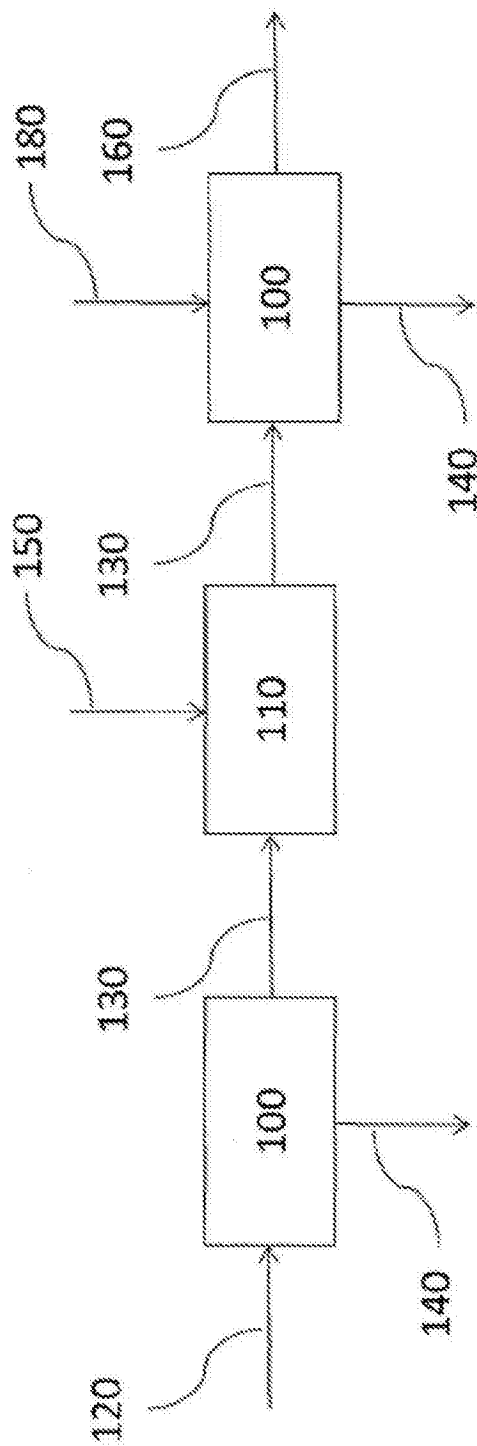


图 7