

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 35/16

A61K 38/38 C07K 14/765

C07K 1/14



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95109051.8

[45] 授权公告日 2004 年 5 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 1150004C

[22] 申请日 1995.8.9 [21] 申请号 95109051.8

[30] 优先权

[32] 1994. 8. 10 [33] US [31] 288180

[71] 专利权人 美国拜尔公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 R·A·田诺尔德

审查员 周 静

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

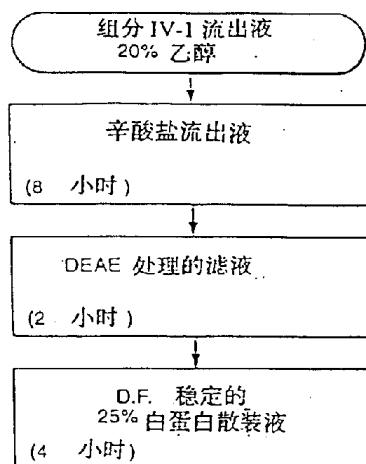
代理人 姜建成

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称 用辛酸钠作分离剂的低温白蛋白分级分离法

[57] 摘要

本发明涉及通过将辛酸钠在较低温度加至 Cohn 组分 II + III 或 IV - 1 流出液中能制备浊度水平不高于 5NTU 的高度稳定的源自血浆的治疗用白蛋白溶液的方法。辛酸钠起分离剂的作用将白蛋白与不想要的蛋白质分开。由于它往往是净化剂分子,白蛋白通过用含辛酸钠的缓冲液透析滤过而选择性地被稳定,因而能确保白蛋白单体含量高且浊度低。选择性稳定作用所需的辛酸钠的量由白蛋白分子上可提供的结合位置的量来定。



ISSN 1008-4274

1. 由血浆蛋白质的混合物分离白蛋白的方法，所述混合物包括白蛋白和非白蛋白蛋白质，所述方法包括以下步骤：

(a) 将辛酸钠作为分离剂加入 pH 为 5.3-5.6 的血浆蛋白质的混合物中，使得白蛋白和非白蛋白蛋白质形成分开的相；和

(b) 将白蛋白相与非白蛋白蛋白质相分开。

2. 按照权利要求 1 的方法，其中，非白蛋白蛋白质选自包含 γ 、 α 和 β 球蛋白和酸性糖蛋白的溶液。

3. 按照权利要求 1 的方法，其中在 25-35°C 的温度下将辛酸钠作为分离剂加至血浆蛋白质的混合物中。

4. 按照权利要求 1 的方法，其中辛酸钠以 0.06M 存在于血浆蛋白质的混合物中。

5. 按照权利要求 1 的方法，其中将辛酸钠和血浆蛋白质的混合物一起培养 6 小时以上。

6. 按照权利要求 5 的方法，其中将辛酸钠在 0.06M 辛酸钠的浓度和 25-35°C 的温度下作为分离剂加入血浆蛋白质的混合物中。

7. 按照权利要求 1 的方法，其中血浆蛋白质的混合物包括 Cohn 组分 II + III 流出液或 Cohn 组分 IV - 1 流出液。

8. 权利要求 6 的方法，其中将辛酸钠在 pH5.4 下作为分离剂加入血浆蛋白质的混合物中。

用辛酸钠作分离剂的低温 白蛋白分级分离法

本发明总的来讲涉及源自血浆的治疗用蛋白质溶液的制备方法，具体来讲，本发明涉及由血清或血浆制备选择性稳定的动物或人血清白蛋白（HSA）、 α -1 蛋白酶抑制剂（ α -1 PI）和抗凝血酶III（ATIII）。

Cohn 分级分离法 最初发表是在 1946 年，在美国仍是加工血浆的一个基本方法，该方法在白蛋白的制备时利用乙醇、一定的温度、pH、蛋白质浓度、离子强度和时间的以使不想要的蛋白质不溶解（Cohn 等人，J. Am. Chem. Soc. 68, 459(1946)）。T. Gerelough 在 Cohn 分级分离过程中连续使用 95% 乙醇大大减少所需的生产用体积，因而降低了相应的生产成本。Gerelough 法在美国也是一个血浆分级分离的认可的的标准方法（美国专利 2710294, 2710293 (1955)）。在欧洲，H. Nitschamann 和 P. Kistler 描述了加工白蛋白的更简单的方法，但所得到的产品不能满足当时美国一些机构施行的规定的指标（Vox Sang., 5, 272 (1960)）。

在美国，自从 Cohn 等人 1946 年发表了 Cohn 分级分离法 以来，血浆的分级分离法 一直采用 Cohn 技术。因此，二十多年来，制造厂商对寻求替代的白蛋白分级分离技术既无兴趣，亦无必要（M. Steinbuch, Vox Sang., 23, 92(1972)）。此外，由于常规的分级分离技术能制得可成功地用巴氏灭菌法（在 60°C 加热 10 小时）使病毒失活的白蛋白，因此白蛋白的制造厂商在寻求替代的和改进的分级分离法 方面无积极性并且非常谨慎。

1972年, M. Steinbuch 开发出除乙醇外能通过沉淀分离血浆蛋白质的几种试剂。Steinbuch 用 Cohn 组分III作原料, 研究了以前用于稳定白蛋白 (M. Steinbuch, Vox Sang. 23: 92-106, 1972, Yu L. Hao, 美国专利 4, 222, 934, 1980) 随后将脂质包膜病毒灭活的辛酸的沉淀能力 (Seng 等人, U.S 4939176, 1990)。结果, 科学家们后来开发出几种用于纯化 IgG、IgA、 α -1 酸性糖蛋白和前白蛋白的技术, 同时发现该沉淀反应高度依赖于温度和 pH。

在制备人免疫球蛋白时, 辛酸通常被认为是在 pH4.8 时对大多数血浆蛋白质有效的沉淀剂, 只要参数例如温度和离子强度是最适宜的 (Steinbuch 等人, Preparative Biochemistry, 3(4), 363-373(1973))。于是 Steinbuch 等人描述了用辛酸从哺乳动物血清中分离 IgG 的方法, 指出大批的无免疫性球蛋白沉淀最好在略带酸性的 pH 但不低于 4.5 的 pH 下获得 (Steinbuch 等人, Arch. Biochem. Biophys., 134, 279-294 (1969))。

Habeeb 等人用辛酸沉淀以获得不含凝聚物、血纤维蛋白溶酶和血纤维蛋白溶酶原、抗补体活性低且储存稳定的源自血浆的 IgG。(Preparative Biochemistry, 14(1), 1-17(1984))。IgA 还能基于 IgA 的溶解性在辛酸存在下和 pH4.8 的条件下由 Cohn 组分III作为常规组分分离的副产物制得 (Pejaudier 等人, Vox Sang. 23, 165-175(1972))。此外, 组分III还能用作制备富 IgM 血浆部分的原料。

辛酸钠也已用于纯化白蛋白。按照这些方法, 辛酸钠被加至生产用血浆中, 并在该工业生产液流暴露于高温时保护白蛋白。温度过高不仅能使生产液流的球蛋白变性, 而且常常产生污染物新抗原 (Schneider 等人, 美国专利 4, 156, 681(1979); Institute Merieux, 美国专利 3992367)。

Cohn 组分III还用辛酸处理以沉淀有助于血浆铜转运的 α 球蛋白—

血浆铜蓝蛋白。用这种技术制备血浆铜蓝蛋白能避免牵涉乙醇或丙酮的变性步骤，但该方法仅已用于马、骡、兔、山羊、绵羊和狒狒的血浆 (M. Steinbuch, Vox Sang., 23, 92-106(1972))。

目前，各种技术和专利文献中包含无数加入辛酸钠作稳定剂的制备白蛋白的方法和涉及辛酸沉淀以由源自血浆的 Cohn 组分 III 获得免疫球蛋白的纯化技术。但是，我们尚未见到在制备白蛋白时用辛酸钠作分离剂 (partitioning agent) 以将白蛋白与不想要的球蛋白和生产废料分开的文献公开。

我们还出乎意料地发现了用辛酸钠将白蛋白与不想要的物质分开而不使用乙醇沉淀剂来制备白蛋白的方法的显著的优点。第一，辛酸钠分离缩短了常规白蛋白制备方法的时间，这减少了产品处理环节，相应地将白蛋白的回收率提高 25% 或 25% 以上，所得到的白蛋白成品基本上不含铝并呈现出不低于 97% 的单体浓度。第二，辛酸钠分离显著减少了完成白蛋白制备所需的时间，因而将生产相关设备成本降低至少 65%。第三，辛酸钠分离提高了由 Cohn 组分 II + III 制备 α -1 PI 和 AT-III 的收率，并且通常比制备血浆产品的常规方法效率高。最后一点，也许是最重要的一点，辛酸钠分离显著减少了乙醇的使用，并且在白蛋白的制备过程中能完全避免使用丙酮，这就大大避免了有毒和对环境有害的溶剂残留物污染我们的环境。下面详细论述我们的发明。

本发明提供用辛酸钠作分离剂制备基本上是不含铝的白蛋白的方法。由本发明方法制得的源自血浆的治疗用溶液包括白蛋白溶液、 α -1 蛋白酶抑制剂和抗凝血酶 III。在本发明方法中，优选地，辛酸钠在约 20-30°C 的温度下被加至含白蛋白的溶液中。所述含白蛋白的溶液的 pH 为约 5.25-5.6。辛酸钠优选以约 0.04M-0.08M 辛酸钠的量被加至含白蛋白的溶液中。优选将辛酸钠处理的溶液培养约 2-8

小时。

在本发明方法的一优选实施方案中，当加入辛酸钠以达到约 0.04M - 0.08M 浓度时，将含白蛋白的溶液的 pH 调至约 5.4 - 5.6、温度升至约 20-30°C 并混合，培养约 2-8 小时。优选地，将含白蛋白的溶液调至约 pH5.4，加热至约 30°C，用约 0.06M 的辛酸钠处理，并培养约 6 小时。

本发明还提供按照本发明的方法制得的白蛋白产品。所述白蛋白产品优选地在药学上可接受的载体中，再优选地其适宜于静脉内用药，再优选地其铝浓度在 0-20ppb 范围内，再优选地其白蛋白含量约为 1-40 重量%，最优选其 pH 为 5.4-5.6。

辛酸钠的使用在 Cohn 组分 II + III 或组分 IV - 1 流出液步骤中插入常规血浆分级分离。按照本发明，将辛酸钠加至包括期望的白蛋白和不期望的非白蛋白蛋白质和污染物的胶体流出液中。

将温度和 pH 升高后，将混合物培养约 6 小时，使得辛酸钠起分离剂的作用而将该胶体溶液分成含白蛋白的上清液和含不想要的非白蛋白蛋白质（例如球蛋白）和生产废料的分散相。然后将辛酸钠处理过的悬浮液离心，并加入 deae sephadex 帮助过滤。接着将悬浮液过滤，超滤至 12% 蛋白质，用 0.02M 辛酸钠透析滤过，收集，并混合用于灭菌过滤。当该灭菌产品通过无菌检验时，将该白蛋白装入最终的容器中。

图 1 是区分本发明和按照 Cohn 分级分离工艺的常规的白蛋白制备方法的流程图。该流程图仅着重指出了为区分本发明的简化的白蛋白制备法和费时的 Cohn 分级分离技术所必需的那些 Cohn 分级分离步骤。用于该在先技术方法的加工时间基于 20 厦普勒斯离心机，大多数其它的时间均基于 1000 升加工用血浆。

术语的定义：

1. 分离剂

本文中所用的分离剂是指这样的物质，即当在制备白蛋白的过程中将其加至血浆蛋白质混合物中时能形成由两个分开的相组成的胶体悬浮液，所述两相为：含白蛋白的上清液；和含附聚的蛋白质颗粒、包括 α 和 β 球蛋白的乳光分散相。

2. 沉淀剂

本文中所用的沉淀剂是指这样的物质、即当在制备白蛋白的过程中将其加至血浆蛋白质混合物中时，若该溶液 pH 在特定范围之内则能可逆性地使溶液物质不溶。

3. 非白蛋白蛋白质

本文中所用的非白蛋白蛋白质是指所有的非白蛋白蛋白质，主要是 α 、 β 和 γ 球蛋白以及酸性糖蛋白。

4. 生产废料

本文中所用的生产废料是指非蛋白质污染物，主要包括多价金属离子例如铝，和生产用溶剂例如乙醇。

5. 含白蛋白的溶液

本文所用的含白蛋白的溶液是指 Cohn 组分 II + III 流出液或 Cohn 组分 IV-1 流出液。

优选的实施方案：

材料：

1. 本发明的原料 Cohn 组分 - IV - 1 流出液按照常规 Cohn 血浆分级分离法制备，并得自由北卡罗来那 Clayton 的 Miles Inc. 分级分离的源血浆。

2. 源血浆由按照 Miles 流动筛选法 (Miles' current screening procedure) 的全筛选血浆 (fully screened plasma) 制得，这是在 Miles 许可下在北卡罗来那 Clayton 的实验室中进行的。

3. 仅评估最后加热的样品以对此方法提供支持。本领域技术人员识别到在巴氏灭菌的最终处理过程中的蛋白质迁移不能预测现今的试验工艺。

4. CBER 和外国政府的规定所需的试验构成最终容器试验标准。

方法:

1. 纯度测定

A. 醋酸纤维素电泳 (CAE) 用于存在除白蛋白以外的蛋白质的情况。

B. 高效液相色谱 (HPLC) 用于测定凝聚物的存在和其它蛋白质的分子量。

C. 白蛋白滤液浊度用 Hach 浊度计以国家浊度单位 (National Turbidity Units) 来测定。

实施例 I

改进的白蛋白制备法以四个标准的 Cohn 分级分离步骤开始。首先, 汇集人血浆, 使其融化并将其离心。收集形成的冷沉淀物并对其进行处理以制备因子 VIII 浓缩液, 同时流出液的温度被降至约 -2°C , 期间加入含 pH4.0 乙酸缓冲剂 (缓冲剂 A) 的 95% 乙醇。

加完乙醇后, 当用盐水或蒸馏水稀释 1:5 时, 所得到的悬浮液 Cohn 组分 I 为约 8% 乙醇 (体积), pH7.3。大部分血浆血纤维蛋白原在 2 个小时反应时间内沉淀。

将组分 I 8% 离心以除去形成的固体。然后通过缓慢加入含缓冲剂 A 的乙醇使流出组分 I 成为组分 II + III 20%, 并将其温度降至约 -5°C 。最终的血浆 pH 为约 6.8。约 2 小时反应时间后, 将组分 II + III 20% 离心, 分离出含 γ 球蛋白部分的粗 II + III 糊状物。以后对该糊状物进行处理以制备 IGIV 的 ISG。

然后将所得到的 Cohn 组分 II + III 流出液用冷乙酸缓冲剂处理,

用蒸馏水 1:10 稀释, 得到 pH 约为 5.2 的悬浮液。将液出物培养约 6 小时反应时间, 包括沉淀和变性。然后收集 α 球蛋白和其它的不溶蛋白质, 并将得到的沉淀用于制备 α -I PI 和 ATIII。

按照常规分级分离法, 组分 IV-1 流出液被进一步加工成 Cohn 组分 IV-4, 主要除去对热不稳定的 α 和 β 球蛋白, 然后进行四次连续的乙醇沉淀, 之后进行丙酮干燥、冷冻干燥、薄膜蒸发或超滤和透析滤过。

按照本发明, 然后将辛酸钠加至 Cohn 组分 IV-1 流出液中, 通过润湿或将白蛋白与这些不想要的蛋白质分开使 α 和 β 球蛋白不溶。辛酸钠还可起抗病毒剂的作用, 此外可机械分离白蛋白。

将约 10g 辛酸钠 / 升加至组分 IV-1 流出液中, 加热至约 25-35°C, 同时使溶液的 pH 升至约 5.4-5.8。反应在不低于 6 小时的时间内完成, 其间, pH 保持在约 5.3-5.6, 但最好是在 5.4。

增加溶液的温度能帮助溶解辛酸钠以完成反应。增大 pH 能提高白蛋白的回收率, 因为低于约 5.4 的 pH 值接近白蛋白的等电点范围, 该范围小于优选的 pH, 结果能导致白蛋白损失。然而, 大于约 5.8 的 pH 水平可增溶溶液解热不稳定的球蛋白, 因而可使它们进入最终产物中。加入辛酸钠后总培养时间为约 6 小时。

然后将辛酸钠处理的溶液冷却至约 18°C 或 18°C 以下以抑制细菌生长, 并离心。此后将约 1g Deae Sephadex 加至该流出液中以帮助过滤。然后使该辛酸盐流出液通过 0.2 微米厚的膜滤器而将其澄清, 制得 deae 滤液 (参见图 1)。然后用碳酸钠将所得滤液的 pH 增至中性 (pH6.8-7.2)。

按照常规方法, 当将酸性滤液的 pH 升至中性时, 溶液的浊度改善。在 pH5.5, 浊度水平通常为 12NTU 或大于 12NTU, 当将 pH 升至 5.5 以上时降至约 8NTU。此现象是由于与污染球蛋白的等电点不一致所

致。

然而按照本发明，Deae 滤液的浊度为约不大于 3NTU，并且，当将 pH 升至 6.8 时，即使在 60℃ 10 小时或超过 10 小时后，浊度水平均无明显改变。

因此，将辛酸钠处理的滤液的 pH 升至中性不影响浊度水平。相反，由辛酸钠处理的 IV-1 流出液得到的滤液，即使在升高的 pH 下仍保持不高于 5NTU 的浊度水平，这是因为在与辛酸钠一起培养后，滤液中基本上不含污染物球蛋白。

然后将 Deae-Sephadex 澄清的滤液用 Rhomicon 型超滤器超滤，并与至少 7 体积的辛酸钠透析滤过缓冲液交换而进行透析滤过，以除去金属污染物、乙醇和盐。该透析滤过缓冲液根据最终容器的白蛋白浓度来制备。例如，若期望的最终白蛋白浓度为 25%，则使用 0.02M 辛酸钠透析滤过缓冲液。若最终的白蛋白浓度为 5%，则需要 0.004M 辛酸钠透析滤过缓冲液。使用 30000 分子量 (MWCO) 的超滤介质能提供极佳的流速。

然后用常规技术对白蛋白进行超滤以达到期望的最终容器白蛋白浓度。该目标浓度必须足以能用透析滤过缓冲液经仪器冲洗下来，从而制得 25%、20%、7% 或 5% 的最终白蛋白浓度。最后，将该浓缩液灭菌过滤，收集供释放试验，并装入最终容器中。

在影响本发明的许多条件中包括温度、pH、辛酸钠浓度和反应时间。以 Cohn 组分流出液 IV-1 进行实验，一次改变一个参数以建立辛酸盐反应的理想温度。试过 20℃ 范围内的温度，发现能制得浑浊的终容器。还人为地定了 6 个小时的反应时间，因为加工大体积的白蛋白需要改变完成反应所需的时间。

本发明依赖于上述试验和热对白蛋白的影响。

实施例 II

试验批量为 100-200 升 Cohn 组分 IV-1 流出液。进行几批试验以获得理想的参数。合格的终试验基于将该白蛋白于 60°C 加热 10 小时后的浊度。

放大由 Cohn 组分 IV-1 制备白蛋白的批量。在该批试验中, 将 1100 升流出液 Cohn 组分 IV-1 用实施例 1 中所述的方法加工成 25% 白蛋白终容器。

结果

这里所述的放大工艺得到下列数据:

蛋白质浓度:	24.03% 蛋白质
CAE:	100% 白蛋白
pH:	6.78
耐热性 (一式两份)	
(50 小时 @ 57)	合格
铝:	7.53ppb
PKA:	1% 参考
柠檬酸盐:	少于 5ppm
浊度:	2.6NTU
钠:	152Meq / L
HPLC:	
单体:	97.58%
二聚体:	2.42%
粘度:	7.98 CPS
密度:	1.0699
热原 (3 只兔)	总共 0.2
辛酸盐:	0.086M 选择性结合

两体积 CWF1 透析滤过会将此浓度降至约 0.07M。

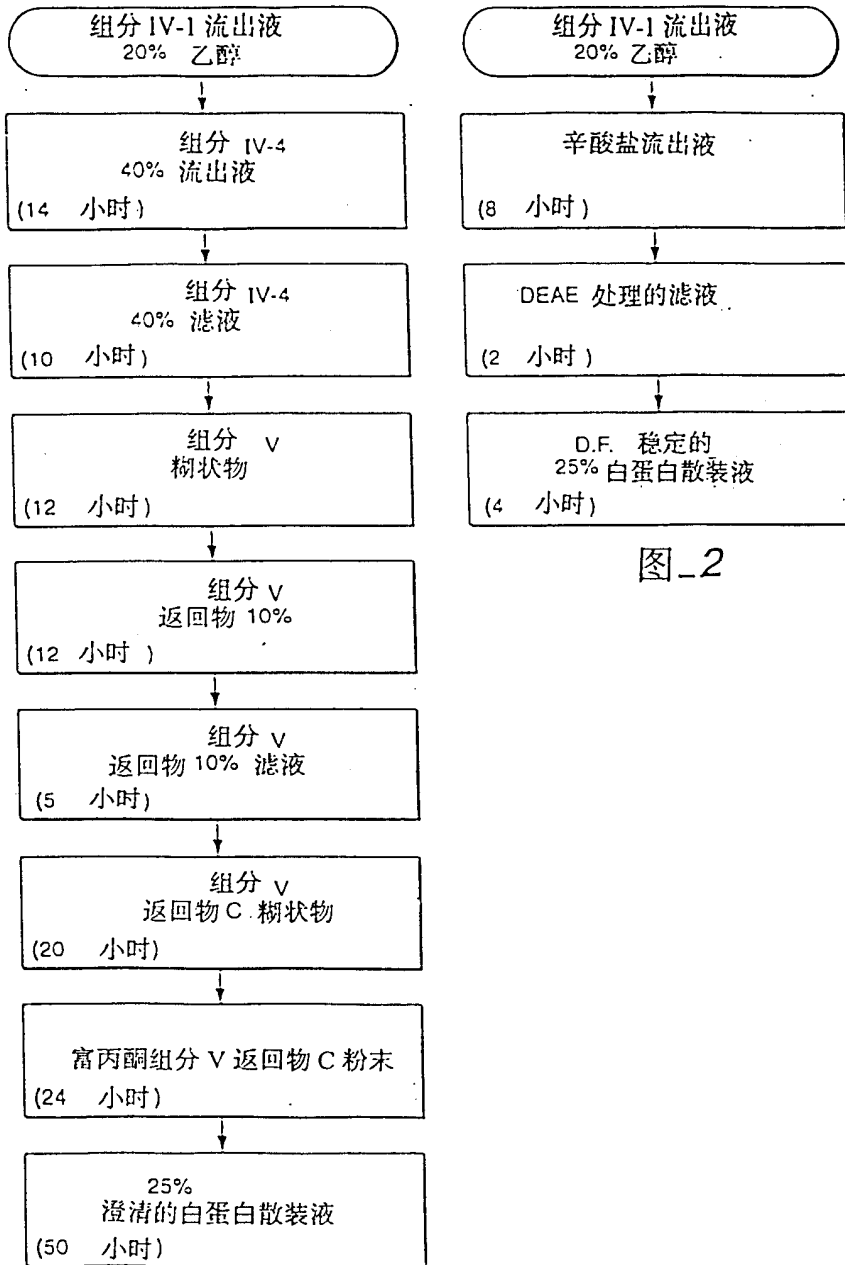
讨论

我们已证实，通过使用辛酸钠将白蛋白与不想要的蛋白质和生产废料分开能较快、更高效地并以较低成本制备广泛用作治疗剂的人血清白蛋白。此外，如本文所述的辛酸钠白蛋白分级分离能避免使用溶剂例如丙酮，因而能避免化学溶剂对环境的污染；降低生产和设备成本；减少白蛋白终容器的生产时间；并增加白蛋白和其它源自血浆的产品例如 α -1 PI 和 AT III 的收率。

此外，我们还发现，白蛋白自然地通过分子吸引选择并结合一定量的留在最终白蛋白溶液中的辛酸钠。加入辛酸钠后，即使在随后的过滤、超滤、透析滤过和于 60°C 巴氏灭菌 10 小时后，白蛋白溶液的浊度水平仍在 5NTU 之下。因此，辛酸钠能在制备过程中增强产品的稳定性，正如加入辛酸钠后浊度水平低所证明的那样；并且能在最后的高热巴氏灭菌过程中保护白蛋白免受热解，这能避免在长期贮存过程中浊度增大。

常规白蛋白制备方法通常使用乙酰基-dl-色氨酸——一种可疑的致癌因子或氯化钠来稳定白蛋白。但是，色氨酸或氯化钠均不能短期和长期增加白蛋白的稳定性。白蛋白不与色氨酸结合，但色氨酸还是能在暴露于高温时保护白蛋白结构的完整性。相反，白蛋白与氯化钠的结合性强，但氯化钠不能在暴露于高温时保护白蛋白。因此，除能将白蛋白与不想要的物质分开外，辛酸钠在制备过程中或之后还具有增进和保持白蛋白的稳定性的双重功能。

根据上述的实施例和讨论，本领域技术人员能对本发明做出潜在的改进和改变。因此，所给出的实施例仅用于举例说明本发明。本发明应仅受所附权利要求限制。



图_2

图_1(在先技术)