

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610100617.6

C07K 1/14 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 14/76 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 12 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 100443499C

[22] 申请日 1996.2.29

[21] 申请号 200610100617.6

分案原申请号 03127743.8

[30] 优先权

[32] 1995.5.25 [33] US [31] 378,859

[73] 专利权人 达尔塔生物技术有限公司

地址 英国诺丁汉郡

[72] 发明人 安德鲁·R·古迪 达雷尔·斯利普

亨德里克·范厄克

斯蒂芬·贝雷曾科

约翰·R·伍德罗

理查德·A·约翰逊

帕特里夏·C·伍德

斯蒂芬·J·伯顿 艾伦·V·夸克

[56] 参考文献

WO9209303A 1992.6.11

CN1087914A 1994.6.15

审查员 王亦然

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 封新琴 巫肖南

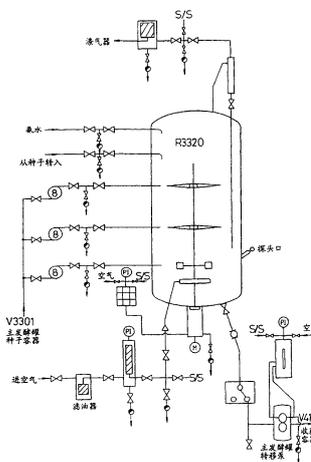
权利要求书 1 页 说明书 45 页 附图 7 页

[54] 发明名称

高纯度白蛋白生产方法

[57] 摘要

提供一种制备含极低水平或基本去除色素金属离子, 人源蛋白, 宿主蛋白, 白蛋白片断, 白蛋白多聚体或聚合体和病毒, 而且基本无糖基化, 较高级别的巯基并带有一完整的羧基末端的白蛋白的技术。该技术包括将白蛋白(优选地是转化酵母表达和分泌的)通过阳型阳离子交换层析然后再通过阳型阴离子交换层析。也可能采用其它的步骤, 如超滤, 凝胶渗透层析, 结合白蛋白的亲层析(如使用蓝染料)和结合杂质的亲和层析(如使用一种氨基苯基硼酸树脂)。还公开了采用一种与白蛋白有亲和力的化合物, 从一种与白蛋白有非特异亲和力的物质上洗脱白蛋白, 如同用相反的离子去除铵离子的方法。



1. 一种纯化白蛋白溶液的方法，包括将该溶液与一种相反离子溶液接触以从白蛋白中将铵离子置换出并能从溶液中去除的步骤。

2. 一种根据权利要求1所述的方法，其将相反离子溶液加入到白蛋白溶液并通过透析去除铵离子。

3. 一种根据权利要求1所述的方法，其中相反离子溶液通过半透膜从白蛋白溶液中分离，并通过透滤去除铵离子。

4. 一种根据权利要求1所述的方法，其中铵离子通过凝胶渗透层析从溶液中去除。

5. 一种根据权利要求1至4中任一条所述的方法，其中的相反离子溶液是含有钠离子的溶液。

6. 一种纯化白蛋白溶液的方法，该方法包含在一种含有铵离子的缓冲液中将该溶液与层析材料接触，通过根据权利要求1与5中任一项所述的方法随后去除铵离子以获得纯化的白蛋白产品。

7. 一种纯化白蛋白溶液的方法，该方法包含在一种含有铵离子的缓冲液中将该溶液与层析材料接触，然后使经过所述接触后的溶液进行一个或多个进一步的纯化或制剂步骤，继而通过权利要求1与5中任一项所述的方法去除铵离子以获得纯化的白蛋白产品。

8. 一种根据权利要求6或7所述的方法，其中层析材料包含固相化的硼酸根离子。

高纯度白蛋白生产方法

本申请是申请号为 03127743.8, 申请日为 1996 年 2 月 29 日, 发明名称为“高纯度白蛋白生产方法”的专利申请的分案申请。

技术领域

本发明涉及纯化从血清中提取的人血清白蛋白(HSA)或用编码人血清白蛋白氨基酸序列的核苷酸编码序列转化一种微生物生产的重组人白蛋白(rHA)。在此说明书中, 术语“白蛋白”通常指人血清白蛋白和/或重组人白蛋白。

背景技术

白蛋白用于治疗有严重烧伤, 休克或失血的病人。也用作补充培养高等真核细胞的培养基和作为治疗用蛋白配方中的赋形剂。目前, 从人血液中提取的白蛋白可以满足对这种产品的需求。提取和分离技术的实例包括那些公开于如下专利中: JP 03/258 728 关于一种阳离子交换剂的使用; EP 428 758 关于阴离子交换紧接着阳离子交换的应用; 和 EP 452 753 关于加热、加盐和渗滤的使用。

微生物中重组人白蛋白的生产已在 EP 330 451 和 EP 361 991 中公开。重组人白蛋白的纯化技术已公开在: WO 92/04367, 源于基质的染料去除, EP 464 590, 源于酵母的着色剂的去除; 和 EP 319067 碱沉淀及随后的将重组人白蛋白应用于对白蛋白有特异亲和力的亲脂相。

发明内容

本发明提供高度纯化的白蛋白。

本发明一方面提供了一种纯化白蛋白的技术, 该技术包括将相对不纯的白蛋白溶液加入白蛋白可非特异结合的层析材料以便白蛋白与该材料结合, 和用含可与白蛋白特异结合的化合物的溶液从该材料上洗脱结合的白蛋白的步骤。优选地, 层析材料是一种阳离子交换剂, 如 SP-琼脂糖 FF, SP-多孔微球硅胶等, 列于实施例 2 之中。与白蛋白有特异亲和力的化合物可以是辛酸盐(如辛酸钠), 其它长链(C₆至 C₂₂)脂肪酸, 水杨酸盐, 辛酰

丁二酸盐，N-乙酰色氨酸或两种或多种这类化合物的混合物。

本发明的第二方面提供一种纯化白蛋白的方法，该方法包括的步骤有将白蛋白溶液进行阳离子交换层析。其中白蛋白与阳离子交换物质结合，然后进行阴离子交换层析，其中白蛋白与阴离子交换物质结合。

从阳离子交换物质洗脱的白蛋白可在进行所说阴离子交换层析之前用亲和层析、超滤和凝胶渗透中的一种或多种方法处理。因此，在一优选的实施方案中，该方法包括的步骤有：

(a)在白蛋白能与一种阳离子交换基质结合的条件下，将白蛋白溶液通过该基质；

(b)从所说的基质上洗脱出包含白蛋白的阳离子交换洗脱液；

(c)将所说的洗脱液通过一种包含一种白蛋白结合化合物的亲和基质；

(d)从所说的基质上洗脱出一种含有白蛋白的亲和基质的洗脱液；

(e)在超滤之后，任选地将洗脱液通过一种凝胶渗透基质以获得一种富含白蛋白的组分；

(f)在白蛋白能与一种阴离子交换基质结合的条件下，将所说的富含白蛋白的组分通过该基质；并

(g)从所说的阴离子交换基质中洗脱出一种纯化的含白蛋白的产品。

另一种选择是，从阳离子交换物质中洗脱的白蛋白可直接通过所说阳离子交换物质而不需加入任何处理(不包括稀释)。因此，第二种优选的提供纯化白蛋白的方法的实施方案包括的步骤有：

(a)在白蛋白能与一种阳离子交换基质结合的条件下，将白蛋白溶液通过该基质；

(b)从该基质中洗脱出一种含有白蛋白的阳离子交换洗脱液；

(c)在白蛋白能与一种阴离子交换基质结合的条件下，将阳离子交换洗脱液通过该基质；

(d)从该阴离子交换基质中洗脱出一种含白蛋白阴离子交换洗脱液；

(e)将阴离子交换洗脱液通过一种包含一种白蛋白结合化合物的亲和基质；

(f)从该亲和基质中洗脱出一种含白蛋白的亲和基质洗脱液；

(g)将该亲和基质洗脱液通过一种凝胶渗透基质以获得富含白蛋白的组分。

优选地, 在进行阳离子交换的步骤之前, 通过加入辛酸盐和/或其它白蛋白稳定剂(如乙酰色氨酸钠)至其达终浓度约为 1 - 10mM, 并调节 pH 至约 4.0 - 5.0 而调节该白蛋白溶液。

在将阳离子交换步骤中的白蛋白进行洗脱之前, 如用一种高盐溶液(如在 pH4.0, 用 10 - 100mM, 优选地为 20 - 40mM, 例如 27mM 乙酸钠作为缓冲的 0.5 - 2.0M 氯化钠)洗脱则更为有益。

优选地, 在阳离子交换洗脱液直接过阴离子交换剂的方法中, 在阳离子交换一步中的白蛋白的洗脱采用一种含有与白蛋白有特殊亲和力的化合物的缓冲液, 尤其是该化合物是一种酸或其盐, 例如辛酸盐或任何其它长链(C₆ - C₂₂)脂肪酸, 水杨酸盐, 辛酰丁二酸盐或 N - 乙酰色氨酸。

一种含高浓度(如至少 50mM, 50 - 200mM 较好, 例如 80 - 150mM)硼酸盐, 例如四硼酸钠或四硼酸钾的缓冲液适于从阴离子交换剂中洗脱白蛋白。

按本发明纯化的白蛋白经过或不经介入的工艺步骤后, 用含有可选择性结合糖缀合物和多糖的固化的化合物, 如氨基苯硼酸(PBA)的树脂进行层析。

在本发明中涉及亲和层析的任何步骤中, 亲和层析优选地采用一种包含有固化染料, 诸如 Cibacron 蓝型染料的树脂, 固化于树脂上优选地通过诸如 1,4 - 二氨基丁烷基的间隔基团或另一个 C₁₋₈ 的且优选地为 C₁₋₆, 如 C₁₋₅, 最优选地是 C₄ 长度, 优选地 α - ω - 二氨基取代基团的间隔基团。令人惊奇的是, 我们发现这种染料事实上对能够由分泌 HA 的微生物的培养生产的 45KD 的白蛋白片段比对全长的白蛋白分子具有更高的亲和力。这种 45KD 片段通常由 1 - 403 至 1 - 409 区组成, 并在 Sleep 等(1990)生物技术 (Bio/Technology)8, 42 - 46 及 WO 95/23857 中公开。

应用本发明的方法制备的纯的白蛋白溶液可根据其预定的用途进一步加工。例如, 其可通过超滤膜超滤获得白蛋白浓度至少达每升 80 克白蛋白的超滤保留液, 超滤保留液用至少相当其 5 倍体积的水透滤。在某些层析步骤中, 有铵离子是有利的, 如在涉及固化的氨基苯硼酸盐的步骤。令人吃惊的是, 我们发现这些铵离子与白蛋白结合得相当紧密。优选地, 从白蛋白中去除这些铵离子, 我们已发现这可使用相反离子来实现。在本领域的现有方法中没有出现需要将白蛋白加入相反离子, 因为其没有涉及铵离

子而且没有理由假设铵离子结合于白蛋白。

因而，本发明的下一个方面提供一种纯化白蛋白溶液的方法，其包括将该溶液加入一种相反离子溶液以使铵离子从白蛋白中被取代并从溶液中去除。

相反离子(优选地为一种金属离子如钠离子)加入到白蛋白溶液中，铵离子通过透析去除，或者通过半透膜将白蛋白与相反离子溶液隔开的透滤去除，或通过凝胶渗透层析去除。透滤通常用至少 5 倍保留物体积的 50mM 的氯化钠是合适的。

所得到的白蛋白含极低水平的，或基本去除了着色剂、乳酸、柠檬酸、金属、人源蛋白如免疫球蛋白，前激肽释放酶激活因子，转铁蛋白， α_1 -酸性糖蛋白，血红蛋白和凝血因子，真核细胞蛋白，白蛋白片段，白蛋白聚合体或多聚体，内毒素，胆红素，血红素，酵母蛋白和病毒。“基本去除”意味着低于可检测水平。术语“着色剂”用于此处代表任何使白蛋白着色的化合物。例如色素是一种源自有机体，特别是用于制备重组白蛋白的酵母的着色剂，而染料是出现在用于白蛋白纯化的层析步骤的着色剂。以本发明的方法纯化的白蛋白制剂中以蛋白重量计，至少有 99%，优选为至少 99.9% 是白蛋白。这样高纯度的白蛋白不太可能会引起有害副作用。

用本发明的方法生产的白蛋白至少 99.5% 是单体，优选地是通过还原性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定的实际 100% 的单体，并具有如下的一个或多个特征。以一克白蛋白计，其铝离子含量低于 150ng，优选为低于 100ng；铁离子含量低于 3,000ng，优选为低于 1,000ng；铜离子水平低于 10,000ng，优选为低于 5,000ng；镁离子水平低于 3,000ng，优选为低于 1,500ng；锌离子水平低于 5,000ng，优选为低于 3,000ng；锰离子水平低于 50ng；以摩尔己己糖/摩尔蛋白计，糖化水平低于 0.6，优选地低于 0.15(更优选地低于 0.05)；按下列实施例 9 的方法测定，低分子量杂质的水平低于 20V.sec，优选地低于 10V.sec；毛细管区带电泳图中单一峰，完整的，即均一的羧基末端和氨基末端；至少 0.8mol SH/mol 蛋白中不含硫醇；不超过 0.3mol/mol C_{10} 至 C_{20} 脂肪酸和实质上的无 C_{18} 或 C_{20} 脂肪酸。

最初的原料可能是含有白蛋白的发酵培养基，或者不纯的白蛋白溶液可能是用过去 50 年中发展起来的过多的提取和纯化技术从血清中获得的溶

液, 这些技术如 Stoltz 等(199)国际制药技术(Pharmaceut. Tech. Int.)1991 年 6 月, 60 - 65 以及 More 和 Harvey (199)在“血液分离和血浆分级分离”Ed. Harris, Wiley - Liss 出版 261 - 306.中所公开的。

尤其是当白蛋白是由缺乏蛋白酶的酵母或其它微生物生产所得的重组人白蛋白, 其纯化方法通常不包括作为纯化工艺一部分的加热处理步骤(与 EP 428 758 和 EP 658 569 对比)。类似的, 如果白蛋白是从微生物(而不是人)制备, 它通常不需要最后的巴斯德灭菌步骤(通常为 60°C, 一小时)。

最终的产物需配制以增加其稳定性。优选地, 本发明的高纯白蛋白产品至少包含 100g, 更优选地为 1kg 或 10kg, 其可用大量小药瓶分装。

尽管本发明的方法可用于从许多来源, 如血清中获得的不纯白蛋白溶液中获取更纯的白蛋白, 但它特别可应用于纯化重组人白蛋白(rHA)。按本发明制备白蛋白可以是任何哺乳类白蛋白, 如大鼠、牛或绵羊的白蛋白, 但优选地是人白蛋白。编码白蛋白的 DNA 可在适当的宿主中表达生产白蛋白。因此, DNA 可按已知的技术用于构建一表达载体, 然后用基转化适当的宿主细胞以表达和生产白蛋白。这些技术包括在 EP - A - 73 646, EP - A - 88 632, EP - A - 201 239 和 EP - A - 387 - 319 中公开的技术。

已知有许多表达系统, 包括细菌(如大肠杆菌和枯草杆菌), 酵母(如啤酒糖酵母, 巴斯德毕赤氏酵母, 和乳克鲁维氏酵母), 丝状真菌(如曲霉), 植物细胞, 动物细胞和昆虫细胞。优选的微生物是啤酒糖酵母。

可考虑用于本发明操作的酵母的典型的属是: 毕赤氏酵母属(汉逊氏酵母属), 糖酵母属, 克鲁维氏酵母属, 假丝酵母属, 球拟酵母属, 有孢圆酵母属, 裂殖糖酵母属, 固囊酵母属, Pachysolen, 德巴利氏酵母属, 梅奇酵母属, 红冬孢属, Leucosporidium, Botryosaccharomyces, 锁掷酵母属, 拟内孢霉属和类似的属。优选的属是选自毕赤氏酵母属(汉逊氏酵母属), 糖酵母属, 克鲁维氏酵母属, Yarrowia 和汉逊氏酵母属。糖酵母属种的例子是啤酒糖酵母、意大利糖酵母和鲁氏糖酵母。克鲁维氏酵母属种的例子是脆壁克鲁维氏酵母和乳克鲁维氏酵母。毕赤氏酵母属(汉逊氏酵母属)的例子是 P.angusta(原多形汉逊氏酵母), P.anomala, 巴斯德毕赤氏酵母和 P.capsulata. Y.lipolytica 是一个合适的 yarrowia 种的例子。

使用一种有一种或多种蛋白酶缺陷的酵母菌株是有益的。这类菌株包括熟知的 pep4 - 3 突变株和含有 PRA 1 和/或 PRB 1 基因突变的菌株, 这些

菌株在 Woolford 等(1993)生物化学杂志(J.Biol. Chem.)268, 8990 - 8998, Cabazon 等(1984)美国国家科学院院报(P.N.A.S.)81, 6594 - 6598, EP - A - 327 797 和 Jones 等(1982)遗传(Genetics)102, 665 - 677.中公开。另一种方法是, 发酵培养基中的蛋白酶可通过加热使之失活。在整个操作过程中蛋白酶的存在会降低白蛋白的产量。

酵母的 Yap3p 蛋白酶和/或 hsp 150 热休克蛋白的水平最好很低(或为零), 例如由破坏各个基因导致的结果, 这可在我们公开的专利 WO 95/23857 和 WO 95/33833 中分别获知。Yap3p 能引起下述 45KD 白蛋白片段的形成, hsp 150 在某些分离步骤中与白蛋白一起被纯化。

酵母可用基于啤酒糖酵母的 2 μ m 质粒构建的表达质粒转化。转化酵母时, 质粒包含细菌的复制子和所选的序列, 该序列在转化后可能通过根据 EP 286 424 所述的内部重组而被切除。质粒也可包含一表达盒, 包括: 一个公开在 EP 431 880 中的酵母启动子(如啤酒糖酵母 PRB1 启动子); 一段编码分泌前导区的序列, 如在 WO 90/01063 中公开的一段包括绝大部分天然人血清白蛋白分泌前导区, 加上一小部分啤酒糖酵母 α -交配因子分泌前导区的顺序; 人血清白蛋白编码顺序, 可通过已知的分离和人类基因相对应的 cDNA 的方法获得, 这在例如 EP 73 646 和 EP286 424 中公开; 一段转录中止子, 如 EP 60057 中公开的来源于糖酵母 ADH 1 的终止子。

尽管上述质粒中的不同成分对增加产量的收获有不同的作用, 但并不认为它们的选择直接与获得的白蛋白产物的纯度相关。

本发明涉及一种纯化白蛋白的方法, 该方法包括施加相对不纯的白蛋白溶液到该白蛋白无特异亲和力的, 因而能结合的层析材料, 以及采用一种对白蛋白有特异亲和力的化合物的溶液从该层析材料洗脱结合的白蛋白的步骤。

上述的方法, 其中的层析材料是一种阳离子交换树脂。

上述的方法, 其中的化合物是一种如辛酸盐的脂肪酸盐。

本发明还涉及一种纯化白蛋白的方法, 该方法包含将白蛋白溶液用白蛋白可以结合的一种阳离子交换材料进行阳离子交换层析, 然后白蛋白可以结合的一种阴离子交换材料进行阴离子交换层析的步骤。

上述的方法, 其中从阳离子交换材料洗脱的白蛋白在进行所说的阴离子交换层析之前依次用亲和层析、超滤和凝胶渗透中的一种或几种方法处

理。

上述的方法，其中从阳离子交换材料洗脱的白蛋白适用于所说的阴离子交换材料不需任何除稀释外的中间步骤处理。

本发明还涉及一种纯化白蛋白的方法，包括的步骤：

(a)在白蛋白将与阳离子交换材料结合的条件下，将白蛋白通过阳离子交换基质。

(b)从所说的基质中洗脱含白蛋白的阳离子交换洗脱液。

(c)将所说的洗脱液通过包含有白蛋白结合化合物的亲和基质。

(d)从所说的基质中洗脱含白蛋白的亲和基质洗脱液。

(e)将所说的洗脱液通过一种凝胶渗透基质以获得富集白蛋白的组分，这一步也可任意地在起滤之后进行。

(f)将所说的白蛋白富集的组分在白蛋白将结合阴离子交换基质的条件下通过该基质；并

(g)从所说的阴离子交换基质中洗脱纯化的含白蛋白的产品。

本发明还涉及一种纯化白蛋白的方法，包含的步骤：

(a)在白蛋白将结合阳离子交换基质的条件下，将白蛋白溶液通过该基质；

(b)从该基质洗脱包含白蛋白的阳离子交换洗脱液；

(c)在白蛋白将与阴离子交换基质结合的条件下，将阳离子交换洗脱液通过该基质；

(d)从阴离子交换基质中洗脱含有白蛋白的阴离子交换洗脱液；

(e)将阴离子交换洗脱液通过一种包含一种白蛋白结合化合物的亲和基质；

(f)从该亲和基质中洗脱含白蛋白的亲和基质洗脱液；

(g)将亲和基质洗脱液通过凝胶渗透基质以得到一种富含白蛋白的组分。

上述的方法，其中在阳离子交换步骤白蛋白的洗脱使用一种含有对白蛋白有特异亲和力的化合物的缓冲液。

上述的方法，其中的化合物是一种辛酸盐。

上述的方法，其中在阳离子交换步骤中白蛋白在洗脱之前用高盐溶液洗涤。

前面任一所述的方法，其中白蛋白是用一种含 50 - 200mM 硼酸盐的缓冲液从阴离子交换剂中洗脱。

前面任一所述的方法，其中经或不经中间处理步骤获得的白蛋白在含有一种将选择性结合糖缀合物和多糖的固相化的化合物的树脂上进行层析。

上述的方法，其中的化合物是氨基苯基硼酸(PBA)。

任一前述的针对特异亲和层析的方法，其中亲和层析使用一种包含固相化的、白蛋白特异的染料的树脂。

上述的方法，其中的染料是一种 Cibacron 蓝型染料。

上述的方法，其中的染料是通过一间隔基团固相化在树脂上。

本发明还涉及一种根据任一前述方法的方法，其中在阳离子交换步骤之前，白蛋白溶液通过加入辛酸盐至终浓度为约 1 至 10mM 并调节 pH 至约 4.0 - 5.0 而调整。

前述任一方法，其中得到的最终的含白蛋白的溶液再通过超滤膜超滤以得到白蛋白浓度至少约每升 80 克白蛋白的超滤保留液并用至少相当于该保留液 5 倍体积的水透滤该超滤保留液。

任一前述方法，其中最初的白蛋白溶液是通过在发酵培养基中培养用编码白蛋白核苷酸顺序转化的酵母得到的酵母培养基，而其中的酵母表达并分泌白蛋白。

上述的方法，其中所说发酵培养基是不含金属螯合剂。

上述的方法，其中在培养基施用于阳离子交换材料之前，酵母从发酵培养基中分离。

本发明还涉及一种纯化白蛋白的方法，该方法包括将相对不纯的白蛋白接触含有硼酸或其盐的层析材料和从白蛋白溶液中分离该材料以获得纯化的白蛋白的步骤。

上述的方法，其中的白蛋白溶液含有糖缀合物和/或多糖。

上述的方法，其中糖缀合物和/或多糖包括酵母糖蛋白。

上述方法，其中的硼酸是氨基苯基硼酸或其盐。

上述的方法，其中的氨基苯基硼酸固相化在一种琼脂糖凝胶上。

上述的方法，其中的白蛋白溶液用乙酸根离子、氯离子、辛酸根离子和铵离子中的一种或多种缓冲。

上述的方法，其中的溶液含 10 - 100mM 乙酸根离子，10 - 100mM 铵离子，20 - 200mM 氯离子和 1 - 20mM 辛酸根离子并且 pH 值 9.0 - 9.5。

前述任一方法，其中纯化的白蛋白进一步纯化和/或制剂成可用于人静脉给药。

本发明还涉及一种纯化含有由特定分泌白蛋白的微生物产生的约 45KD 的白蛋白片段(1 - 403 至 1 - 409)的白蛋白溶液的方法，该方法包含将白蛋白溶液与对白蛋白有特异亲和性的固相化染料接触，并在洗脱白蛋白时将 45KD 的片段留在染料上的步骤。

上述的方法，其中的染料是固相化的、白蛋白特异的染料。

上述的方法，其中的染料是一种 Cibacron 蓝型染料。

上述的方法，其中的染料是通过一间隔基团固相化在树脂上。

上述的方法，其中的间隔基团是 α, ω -二氨基-(C₁₋₆-直链烷基)基团。

附图说明

现在将通过实施例并参照附图说明本发明优选的方面，附图说明为：

图 1 图示用于生产重组人白蛋白的发酵罐。

图 2 是 C18 PTH 反向 HPLC 柱(Applied Biosystem Inc)的紫外扫描图，显示本发明提供的白蛋白中低分子量杂质的水平低。

图 3 与图 2 类似，但显示的是现有技术提供的白蛋白中的低分子量杂质。

图 4 是一气相色谱图显示市场上提供的白蛋白中的脂肪酸含量。

其中各峰表示：

1. 辛酸(C8:0); 2. 癸酸(C10:0);
3. 十二酸(C12:0); 4. 十四酸(C14:0);
5. 十六酸(C16:0); 6. 顺-9-十六酸(C16:0);
7. HEPTADECANOIC ACID INTERNAL STD; 8. 十八酸(C18:0);
9. 顺-9-十八酸(C18:1); 10. 顺-9.12-十八酸(C18:2);
11. 顺-9.12.15-十八酸(C18:3); 12. 顺-5.8.11.14-二十酸(C20:0)。

图 5 与图 4 一样但显示的是本发明提供的白蛋白；

图 6a 和图 6b 分别显示本发明提供的白蛋白和现有技术提供的白蛋白的电子流质谱图。

具体实施方式

实施例 1: 不纯白蛋白溶液的制备

构建生产白蛋白的微生物的克隆策略公开在 EP 431 880 中。质粒 pAYE 316 用 Hinnen 等(1978)美国科学院院刊(P.N.A.S.)75, 1929 中描述的方法导入一啤酒糖酵母菌株(MATa, Leu2, pep43, [cir^o])。转化体用缺乏亮氨酸的基本培养基(酵母氮基质, Difco)筛选。当转化体在含有 10ml 复合物(YEP, 1% (w/v) 酵母浸膏, 2% (w/v) 细菌蛋白胨和 2% (w/v) 蔗糖)或特定的液体培养基(0.15% (w/v) 不含氨基酸和硫酸铵的酵母氮基质, 0.5% (w/v) 硫酸铵, 0.1M 柠檬酸/十二水磷酸氢二钠 pH6.5, 5.2% (w/v) 蔗糖)的烧瓶中, 在 200rpm, 30°C 下生长 72 小时, 在无细胞的培养上清液中可用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和/或用火箭凝胶免疫电泳检测到重组人白蛋白。

在特定液体培养基(缓冲的基本培养基(BMM)盐培养基: 酵母氮基质[不含氨基酸和硫酸铵 Difco], 1.7g/L; 一水柠檬酸 6.09g/L; 无水磷酸氢二钠, 20.16g/L, pH6.5±0.2, 蔗糖加于 20g/L 中培养的原种主细胞用于制备生产适宜于用冷冻分装的含 20% (w/v) 海藻糖的培养物制备烧瓶振荡培养物的酵母工艺的流通原种(制造商使用的细胞库)。

发酵

这一部分涉及从原种培养到最母的发酵以生产重组人白蛋白, 是人重组白蛋白发酵过程总的定义, 其不局限于特殊设备或尺寸的具体的细节。

震荡烧瓶培养: 酵母[cir^opAYE 316]以生理上适宜于种子管的接种的无菌培养方式生长。当种子管的时间选择重复时, 确定生长期(基本碳水化合物过量)和接种物生物量(12±2mg/L, 每 10 升培养基需接种物 100ml)是必要的。一菌种管的菌种接种至含 100ml BMM + 2% (w/v) 蔗糖的振荡烧瓶中并在 30°C 下用轨道振荡器(每分钟 200rpm 转率)孵育直至得到 0.6 - 1.2g/L(通过在 600nm 处的光密度值估计)的细胞干重。这一培养物再接种至种子发酵管至 12±2mg/L 水平。

种子发酵: 主产物发酵罐的接种物是通过生产产物的有机体, 优选地是啤酒糖酵母[cir^opAYE 316], 在种子发酵罐(在本实施例, 为 20L 工作体积)生长至高达约 100g/L⁻¹ 细胞干重(cdw)随后采用补料分批的培养方式以使乙醇和乙酸的积累降至最少而因此使细胞产物最多。每次发酵的整个过程通过计算机控制系统监测和控制, 计算控制系统如多发酵罐计算机系统(MFCS)

软件由 B.Braun 提供。由 B.Braun 提供的软件是一个监视控制和数据获取软件包；其它的公司可提供相似的软件包。补料控制规则用于控制补加的蔗糖以通过避免 Crabtree 效应获得最多的生物量，因而使乙醇和/或乙酸的产量降至最低。发酵管用热氢氧化钠清洗并用无热原的水(PFW)淋洗。热的无菌的容器将含约 10L 无菌的 MW10 培养基(表 1)分批盐加上微量元素。用于人重组白蛋白的培养基能经超滤(截流分子量 10,000)去除内毒素。

表 1

MW 10 培养基

成份	分批培养基	补料培养基
盐		
磷酸二氢钾	2.74g/L	10.9g/L
七水硫酸镁	0.58g/L	2.3g/L
二水氯化钙	0.06g/L	0.24g/L
磷酸(85% w/w)	0.88ml/L	1.76ml/L
维生素		
泛酸钙	20mg/L	180mg/L
尼克酸	33.3mg/L	300mg/L
m-肌醇	20mg/L	180mg/L
d-生物素	0.133mg/L	0.8mg/L
盐酸硫胺素	16mg/L	32mg/L
微量元素贮存液	10ml/L	20ml/L
蔗糖	0*	500g/L
微量元素贮存液成分		
七水硫酸锌	3g/L	
七水硫酸亚铁	10g/L	
四水硫酸锰	3.2g/L	
五水硫酸铜	0.079g/L	
硼酸	1.5g/L	
碘化钾	0.2g/L	
二水锰酸钠	0.5g/L	
六水氯化钴	0.56g/L	

微量元素加在去矿物质水中，用 98% 的硫酸按 35ml/L 酸化。

*在 20L 种子发酵阶段加入 20g 蔗糖/L 于分批培养基中。可用任何方便的方法除菌，亦作为除热原的方法，例如超滤。维生素通常过滤除菌。

培养基加入容器后，设置操作温度为 30℃，及最低搅拌速率，通常为 400 - 500rpm。起始 pH 用 pH 控制器设置在 5.7 ± 0.2 ，以氨溶液(特殊的比重为 0.901)调节。2M 的硫酸也用作 pH 校正剂。容器中加入蔗糖至 20gL^{-1} ，MW10 批培养维生素和 Breox FMT30 除泡剂至 0.04gL^{-1} 。

过滤除菌的空气以 0.5v/v/m(即每分钟每升培养基 0.5 升非压缩空气)速率注入容器中，培养基用无菌震荡培养物接种至每升含 $12 \pm 2\text{mg}$ 细胞干重并启动 MFCS 计算机系统。完成批生长期(以 30 分钟内溶解氧的压力(tension)上升大于 15% 为标志)之后，MFCS 系统控制下的开始添加补料培养基。控制策略实际上与下述的生产发酵是一样的。发酵时气流分两步增加以维持约 1v/v/m 的气流。通过改变搅拌速率将溶解氧压力(DOT)控制在 20% 空气饱和度。一旦搅拌速率不能进一步增加且气流率达到最高值，补料控制规则系统控制补料率以使发酵产物的形成降于最低。在补料结束时，培养物转入生产容器。

发酵生产：酵母[cir^o, pAYE 316]的无菌培养物是通过补料发酵获得细胞外重组人白蛋白生产所需的高水平的细胞干重($> 80\text{gL}^{-1}$)而产生的。本实施例中的发酵罐工作容积为 8000L，用种子发酵罐中生长的培养物接种生产发酵罐，其细胞干重优选地大于 80gL^{-1} 。移入种子发酵罐的培养物后，生产发酵罐的初始细胞干重浓度优选地在 $0.25 - 1.00\text{gL}^{-1}$ 。尽管优选地在一个小时开始补料，但如果需要也可以延迟。由于在补料期的开始阶段 OUR 和 CER 的值很低及其检测导致的误差，使用 RQ 的补料率的自动控制最初不可行。补料方法是试图使乙醇和乙酸的积累降至最低，从而使细胞和产物的产量达到最高。

发酵是在发酵罐中进行，如图 1 所示的具有最佳气体溶解和大量混合设计的发酵罐。经热氢氧化钠洗涤和无热原水淋洗的容器将容纳约 4000L 的无菌 MW10(表 1)，批量盐和微量元素。该培养基可在容器外以加热或过滤的方式除菌。根据本发明的发现，在诸如 MW10 的培养基中不含乙二胺四乙酸(EDTA)或其盐或其它重金属螯合剂有益，因为这些物质的存在导致所得的白蛋白中有色杂质的程度明显升高。

工作温度设置为 30℃，且搅拌速率调至足够维持溶液的均匀，通常约 50rpm。起始 pH 用氨溶液(特定比重 0.901)(控制器设置为 5.7±0.2)。2M 硫酸可作为第二种 pH 校正剂。加入 MW10 的批发酵的维生素，如需要加入适当的除泡剂(如 Breox FMT 30 至 0.125g/L⁻¹)。

向容器中以最初 0.5v/v/m 的速率注入过滤除菌的空气至耗气分析达最大灵敏度，并启动 MFCS 计算机系统。耗气量的分析，可以使用诸如连续质谱仪(如 Fisons VG 气体分析仪)。容器用所有的种子容器培养物(最低 0.4% v/v)接种。补料的 MW 10 的体积与批培养的体积相等。补料开始，RQ 不能控制，直至 OUR 和 CER 的值足够高时才能使控制有效。在没有 RQ 控制的阶段，如果 RQ 持续大于 1.2，补料率要手动调节。按照下面的计算公式，补料率通过计算机控制而上升。

$$\text{补料率(FR)} = Ke^{\mu t}$$

这里 K 是初始补料率， μ 是指数生长率，t 是时间。K 值作为初始补料率是由经验决定的，它是达到使乙醇和乙酸的积累降低最低的生长率所必需的。对于本实施例，K 确定为每升培养物每分钟加 0.08mL 的 MW 10 补料培养基。 μ 值与完全呼吸的生物的最大生长率有关，在本实施例为 0.1h⁻¹。

t 是从 0 开始的变化的计数，每分钟增加 1，除非 RQ > 1.2 或 DOT < 15%。在那种情况下，t 值下降。

容器必要的时候可加压以加强 OTR。在补料终结时，培养物维持在下游处理。

这一维持时间应保持一分钟，但如果需要可以处长至 48 小时或更长。在同步期，培养温度尽可能降至最低，通常在 4 至 15℃，优选地为 4℃，DOT 可降至 0%。停止补料，关闭通气，降低过压。但维持 pH 控制。维持足够的搅动以使细胞处于悬浮并有助于冷却和 pH 的均匀，优选地在约 50rpm。

根据上述步骤的预期收获是：生物量 > 80g 细胞干量/L 培养物；重组人白蛋白 > 1.5g 单体/L 培养物(用 SDS - PAGE 确定，与整个培养有关)。

当白蛋白是重组人白蛋白时，为了制备用于纯化处理的按本发明获得的不纯的白蛋白溶液，将微生物细胞从发酵培养基中分离。细胞优选在所描述的纯化步骤之前分离，但也可在一定条件下和第一步同时进行，如在流化床上进行的第一步纯化。在同步期，无通气条件下将于发酵罐中冷却

至 15°C 以下的发酵培养物转移至一罐中稀释使生物量的浓度达 180 - 210g/kg, 如需要可进一步冷却。稀释的培养物在无通气时降温应保持尽量短的时间同时有足够的搅拌以防止酵母细胞的沉淀。

细胞和上清进行初步分离, 例如微孔滤膜过滤或用诸如 Alfa Laval BTUX 510 连续出样口型的任何适宜的离心机以 5700rpm 运行进行离心。这样获得的浓缩液(centrate)可一起过滤, 例如用 Cuno 提供的深度过滤器(1 μ m 孔径), 转移所有的残留物和破碎的酵母细胞和其它颗粒。至少 75% 的存在于稀释培养物中的重组人白蛋白可仅通过离心操作回收。这步操作中的细胞浆渣可任意地重悬于水或缓冲液中并再次离心以获得第二次浓缩液(centrate), 以增加产物的回收。所得的溶液按本发明的方法纯化白蛋白, 如实施例 2 所示。

实施例 2: 根据本发明纯化白蛋白

准备或调整发酵物的浓缩液(centrate)(如实施例 1 所述), 或其它任何来源(如血清)的不纯的白蛋白溶液以使用阳离子交换基质进行层析, 同时防止白蛋白的多聚化(通过加入正率酸)和蛋白酶活性(通过加热或选择不含损害水平的蛋白酶的酵母)。优选地是加入辛酸钠(色谱溶液 13(CS13) - 表 2)至终浓度 1 - 10mM, 例如约 5mM 以稳定白蛋白。用乙酸(CS09)调 pH 至 4.3 - 4.8, 优选地为 4.5 \pm 0.1(最优选地为 \pm 0.05), 电导率检测应小于 5.5mScm⁻¹。

来源于某些宿主菌株或种的培养物上清含有在后续过程中能降解重组人白蛋白的蛋白酶。这种情况下, 这种蛋白酶的活性可通过对含有重组人白蛋白的培养物上清加热处理以破坏。通常 1 - 10mM 辛酸钠足以防止重组人的蛋白的热变性, 在 60 - 80°C 的温度下 30 秒至 10 分钟足以使蛋白酶失活。随后, 上清可进一步如前所述地调节。如果不存在蛋白酶的降解作用, 优选地省略热处理。

层析

所有的操作均可在室温下(20 \pm 50°C)进行。层析柱中白蛋白的上样量(g 白蛋白/L 基质)取决于用 SDS - PAGE(在 SP - FF 柱的情况下)或 GP - HPLC(对所有其它柱)确定的白蛋白滴度(g/L)。每一步骤的过程可用连机的紫外吸收, 如在 254 或 280nm 处的测定来监测。

这里所描述的层析步骤的程序在许多方面是新颖的和创造性的。第一步纯化步骤中阳离子基质的使用使大部分从酵母发酵中得到低分子量有色

物质直接通过柱子,而那些与基质结合的也是弱的结合且能用诸如 1M 氯化钠的高离子强度的盐洗涤液去除。因此,不象阴离子基质,其不可逆地吸附那类物质,阳离子基质可再生并用于纯化中第一步的层析的多次循环。因而,这一步骤形成了耐用的商品化的层析方法的基础。

在本实施例中应用 Cibacron 蓝型柱作为第二步纯化对于特异地用于去除一种由于其物理化学特征,如大小和等电点而难以从白蛋白中去除的 45KDa 的白蛋白片段是新颖的。该片段令人吃惊地比全长的白蛋白能更强地与染料结合,因而可将它们分离。

白蛋白纯化中所用的层析液详细列于表 2 中。因为在白蛋白纯化中大量使用,并且相对廉价,这种缓冲盐溶液因其工业上可提供高纯度的形式和与其它通常用于缓冲液的如 Tris、HEPES 或 MOPS 相比廉价而最适于本方法。其它的缓冲液可代替表 2 中所列,如相近 pKa 值的缓冲液(如苹果酸对乙酸),但在大多数情况下,价钱如在大范围的适用性排除了他们的应用。其它的盐形式的使用取决于其可溶性,可工业上提供及低价格。然而,在 CS06 和 CS10 柱中包含四硼酸盐离子有特殊的益处因为其在与大分子的碳水化合物部分复合和使其与基质中的阴离子基团紧密结合起特别的作用。这一结果可以增加洗脱液中白蛋白的纯度。

层析可使用轴流式柱(axial flow columns),如由 Pharmacia 提供的那种,或辐流式柱(radial flow columns),如由 Sepragen 提供的那种。在本实施例中,所用的柱子都是轴流式。

缓冲溶液可按下述浓度配制,或者配制浓缩的贮存液,使用时即时混和或稀释。

表 2: 用于纯化实施例 2 中白蛋白层析溶液

溶液	成分	浓度 (g/L ⁻¹)	pH	电导率 (mScm ⁻¹)
CS01	SP - EF 平稳液	CH ₃ COONa.3H ₂ O 3.69	5.45 - 5.65	1.9 - 2.2
		CH ₃ COOH(冰) 0.220		
CS02	SP - EF 洗脱液	CH ₃ COONa.3H ₂ O 13.6	5.45 - 5.65	6.5 - 7.5
		CH ₃ COOH(冰) 0.750		
CS03	DBA 洗脱液	NaCl 117	9.0 - 9.4	125 - 165
		CH ₃ COONH ₄ 3.84		
		NaOH 0.680		
CS04	0.5M NaOH	20.0	> 12	80 - 120
CS05	凝胶渗透	CH ₃ COONa.3H ₂ O 4.94	5.4 - 5.6	2.9 - 3.3
		CH ₃ COOH(冰) 0.380		
		辛酸 0.721		
		NaOH 0.190		
CS06	DE - EF 洗脱液	Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O 7.62	8.9 - 9.3	11.7 - 13.5
		NaCl 5.84		
CS07	20mM NaOH	0.800	> 12	3.5 - 5.5
CS08	DE - FF 平衡液	CH ₃ COONa.3H ₂ O 4.94	5.4 - 5.6	2.9 - 3.3
		CH ₃ COOH(冰) 0.380		
		辛酸 0.721		
		NaOH 0.190		

溶液		成分	浓度 (g/L ⁻¹)	pH	电导率 (mScm ⁻¹)
CS09	乙酸	CH ₃ COOH	Clacial	-	-
CS10	DE - FF 洗涤液	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	7.62	9.0 - 9.4	2.3 - 2.9
CS11	DE - FF 预平衡液	CH ₃ COONa·3H ₂ O	61.8	5.5 - 5.7	24 - 28
		CH ₃ COOH(冰)	2.98		
CS12	DBA 平衡液/洗涤液	NaCl	11.7	8.8 - 9.2	18 - 22
		CH ₃ COONH ₄	0.960		
		NaOH	0.150		
CS13	2M 辛酸钠	辛酸	288	7.7 - 8.2	-
		NaOH	76.0		
CS14	1.73M 磷酸	H ₃ PO ₄ (85% (w/w))	200	< 1.2	-
CS15	2M 氨	NH ₄ OH (30% NH ₃ (w/w))	113ml	-	-

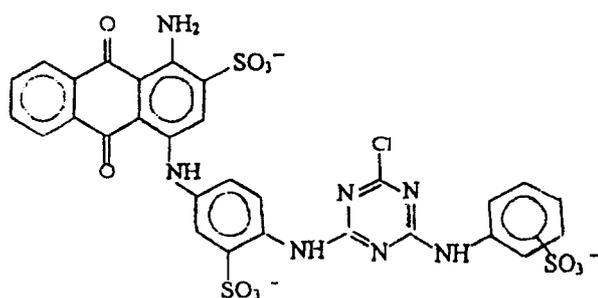
对比具体的实施例而言，所有称量都是±2%。

阳离子交换层析: 白蛋白是用阳离子交换层析, 从至少是酵母蛋白(如果白蛋白是来源于酵母发酵的重组人白蛋白)和其它抗原, 低分子量杂质和色素化合物中纯化和浓缩。本方法采用的是商品化的阳离子交换基质, 如 SP-琼脂糖 FF, SP-球状硅(Spnerosil), CM-琼脂糖 FF, CM-纤维素, SE-纤维素或 S-葡聚糖凝胶。优选的基质是 SP-琼脂糖 FF(Pharmacia)床高 5-25cm, 优选地为 10-15cm, 本实施例为 12.5cm, 柱的上样量为 10 至 50g 白蛋白/L 基质, 优选地为 40±10g 白蛋白/L 基质。基质以缓冲液平衡以去除碱性贮存液, 缓冲液优选地应具有足够的缓冲能力以降低 pH 至约 pH6.0。如 CS01 的缓冲液用于去除柱中的 CS07 贮存液; 然而, 任何 pH 小于 6.0 的缓冲液都可使用。当柱流出液的 pH 值约 6.0 时, 即可判断为平衡完成。

调整的浓缩液(centrate)以一定的流率加入层析柱, 例如以 1.0-8.0cm/min, 优选地为 4.0-70cm/min, 本实施例为 6.36cm/min, 然后以一种溶液洗涤柱子以去除残留的杂质。这种洗涤溶液应为 pH<6.0 并且电导率低于 5mScm⁻¹, 优选地低于 3mScm⁻¹ 以防白蛋白被洗脱。合适的溶液是 CS01。前面的步骤都以 6.36cm/min 的流率进行; 对于洗脱和所有随后的步骤流率降至 0.5-5.0cm/min, 优选地为 2.0-4.0cm/min, 本实施例为 3.18cm/min, 以减少洗脱的体积。增加离子强度将有效地洗脱白蛋白; 使用电导率范围在 5-10mScm⁻¹ 的溶液, 优选地为 6-8mScm⁻¹, 本实施例使用 CS02。当紫外吸收信号上升至 1.0A₂₈₀/cm 以上时开始收集白蛋白, 直至紫外吸收信号降至 0.6A₂₈₀/cm 或收集的最大体积达 6.5 倍柱体积时为止。层析柱然后用 CS03 和 04 清洗, 贮藏于 CS07。

亲和层析。这一步进一步纯化白蛋白以去除 45KDa 白蛋白 N-末端片段, 酵母抗原(如果白蛋白是来源于酵母发酵的重组人白蛋白)和色素。亲和基质可包括任何型的结合白蛋白的 Cibacron 蓝染料, 如活性蓝 2, Procion 蓝 HB, 蓝琼脂糖, 蓝丙烯酰基和其它葱醌型化合物。该基质优选地是下述的“Delta 蓝琼脂糖”基质。这可降低基质产生蓝浸出液的程度和增强基质的碱稳定性以有助于洗涤和去热原。和商品化的基质相比, 进一步改进的基质是在染料(活性蓝 2)和基质之间引入一间隔基团, 1,4-二氨基丁烷。这对于白蛋白纯品的洗脱而言, 间隔基团的长度是合适的。

活性蓝 2 的化学结构显示如下。



邻位，间位或对位异构体或任何其混合物都可使用。优选的异构体是邻拉 SO_3^- 型但难以制备理想的纯度，故使用间位异构体。氨丁酰-活性蓝 2 的制备达到用分析型高效液相色谱测定至少整个峰区占 98% 的纯度。还可通过使用粗的商品化的染料，其必须纯化氨丁酰衍生的染料，或使用纯的合成的染料。在后一种方法中，开始用的染料物质应在分析型高效液相色谱 280nm 测定纯度至少为 98%。这种材料由 ACL, Isle of Man 提供。通过加热混合物至 60°C ，使活性蓝 2 与 1,4-二氨基丁烷在水中反应，然后以混合物中纯化修饰的染料，如通过沉淀。然后氨丁酰-活性蓝 2 与基质偶合，例如与 3-氯-1-2-环氧丙烷活化的琼脂糖 CL-6B(Pharmacia, 瑞典)偶合。见 Porath 等(1971)色谱杂志(J.Chromatog.)60, 167-177。这种 Delta 蓝琼脂糖(DBA)基质的染料的含量优选地是 $50\pm 5\text{mmol/g}$ 干重。

蓝基质的使用。本方法使用 DBA，床高 10-30cm，优选地为 20-30cm(本实施例为 25cm)，柱的上样量为 7-14g 重组人白蛋白/L 基质，优选地为 8-12g/L(本实施例为 $10\pm 1\text{g}$ 白蛋白/L 基质)。所有步骤以 0.3-2.0cm/min 的流率进行，优选地为 1.0-2.0cm/min，本实施例中为 1.53cm/min。DBA 在来源于 CS07 的 CS01 中平衡；当柱中流出液的 pH 约为 9.5 时，平衡完成。层析之前，SP-FF 的洗脱液用氨调节 pH 约为 8.5-9.5，优选地 pH9.0，然后上样至层析柱。上样完毕后，层析柱以 1-5 倍体积的电导率 $10-30\text{mScm}^{-1}$ ，优选地是 $15-25\text{mScm}^{-1}$ 的缓冲液洗涤以去除杂质，例如用 CS12，优选地以 5 倍体积。白蛋白用电导率大于 100mScm^{-1} ，优选地为 $125-165\text{mScm}^{-1}$ 的高离子强度的缓冲液洗脱，例如用 CS03。当紫外信号(A_{280}/cm)升至高于 0.4 时开始收集洗脱液，在信号再次低于 0.4 时停止。层析柱再用 CS04 洗涤并贮存于 CS07。

中间体超滤。这一步为进行凝胶渗透层析而浓缩白蛋白。超滤装置中的纤

纤维素型滤膜(最小分子量截留低于或相当于 30,000, 例如 10,000)用于浓缩 DBA 洗脱液以保持白蛋白浓度 20 - 120g/L, 优选地为 80 - 100g/L。使用后, 滤膜以水或表 3 中的 CS03 或 CS05 冲洗去残留的蛋白质, 并以 0.1M 的氢氧化钠清洗。滤膜可贮存于 20mM 的氢氧化钠中。

凝胶渗透层析。这一步纯化白蛋白是针对酵母蛋白(如果白蛋白是来源于酵母发酵的重组人白蛋白), 色素和二聚化的白蛋白并进行缓冲液交换的步骤。本方法使用商品化的凝胶渗透基质, 如交联葡聚糖凝胶 G100, G150, G250, Sephacryl S - 100, S - 200 或 S - 300, Toyopearl HW50S 或琼脂糖凝胶 6 或 12。优选地, 基质为 Sephacryl S - 200HR(Pharmacia)凝胶床高度大于 60cm, 最好在 90±cm(3×30cm)。层析柱在 CS05 中平衡并以 0.1 - 1.5(cm/min, 优选地为 0.5 - 1.0cm/min 的流率进行层析, 在本实施例流率为 0.75cm/min; 然后当层析柱的 pH 达到 9.5 时, 将中间体超滤所得的白蛋白上样至层析柱。上样体积约相当 2 - 9% 细层析柱体积, 优选地为 5 - 8%, 本实施例为柱体积的 7.5%。白蛋白组分分三部分收集: 弃去最初小量的白蛋白二聚体直至 A_{280}/cm 上升至指针满偏(FSD)的 10%; 这时开始连续收集回收的组分直至达满偏的 90%; 然后所收集的白蛋白作为初级产品组分。这一连续收集直至 A_{280} 降至 5% 满偏值之下, 之后的流出液再直接弃去。回收初级产品组分分开收集。重复这一步骤直至所有原料上样至层析柱。

S - 200HR 回收超滤。一种最小分子量截留等于或小于 30,000, 或如本实施例所用的 10,000 的纤维素型滤膜置于超滤装置中, 用以浓缩汇集的回收组分至保留浓度为 20 - 120g/L 白蛋白, 优选地为 80 - 110g/L。使用后的滤膜按中间体超滤中所述方法处理。

另一种选择是, 在本方法的任何超滤步骤中, 最低分子量截留 \leq 30,000 的聚醚砜或 PVDF 膜可代替纤维素型的滤膜。这种膜由 Amicon 和 Millipore 提供。最好选用适宜用 NaOH 贮存和清洗的滤膜。

S - 200HR 回收超滤保留物的纯化。从回收超滤所得的保留物上样至和初级 S - 200 纯化同样的层析柱, 从每个峰收集产物组分, 然后与前面收集的大量的初级产物组分混和。重复这一步骤直至所有的原料上样至层析柱。

阴离子交换层析。这一步的目的是纯化白蛋白以去除至少酵母抗原(如果白蛋白是来源于酵母发酵的重组人白蛋白)和含色素的白蛋白。本方法使用的阴离子交换基质, 如 QMA - 球状硅(Spherosil), DEAE - Spheroex, Q - Hyper

D, DEAE - 纤维素, QAE - 纤维素或 TMAE - DMAE 或 DEAE 分级凝胶 (Fractogel) 优选地, 基质用商品化的阴离子交换基质二乙氨基乙基琼脂糖凝胶 - FF (DEAE Sepharose - FF) (Pharmacia), 床高在 5 - 25cm 范围内根据方便选择, 优选地为 10 - 15cm, 如 12.5cm, 柱的上样量为每升基质 10 - 60g, 优选地为 $35 \pm 15 \text{g/L}$ 基质。层析柱首先以强的缓冲液平衡将 pH 迅速降至工作范围, 如 pH 4.5 - 6.0, 优选地为约 pH 5.5 的乙酸钠, 以 CS11 为例。使用浓的缓冲液之后, 在加 S200 洗脱液于柱子之前, 用一种低电导率, 即范围在 $1 - 4 \text{mS cm}^{-1}$, 优选地为 $2.5 - 3.5 \text{mS cm}^{-1}$, 例如 CS08 的溶液平衡层析柱。所用的线性流率为 $1.0 - 8.0 \text{cm/min}$, 优选地为 $3.0 - 7.0 \text{cm/min}$, 本实施例为 4.4cm/min 。上样完毕后, 层析柱以 5 - 30mM 范围, 优选地是 15 - 25mM 的四硼酸钠溶液洗涤, 例如用 CS10。这导致洗脱白蛋白组分之前, 任何含碳水化合物的杂质更强地粘附在层析柱上。用任何范围在 $10 - 20 \text{mS cm}^{-1}$ 的高离子强度的溶液可有效地洗脱, 优选地用 CS06。当 $A_{280/\text{cm}}$ 达到 0.4 时开始连续收集洗脱液直至吸收峰降至 0.8 以下。

因此, 在本实施例中, 纯化步骤的顺序是: 阳离子交换, 亲和层析, 超滤, 凝胶渗透(加上回收组分的超滤)和阴离子交换。

用 TSK SW3000XL 柱, 上样量为 $25 \mu\text{l}$ 的含 10.0mg/ml 白蛋白的洗脱液, GP 高效液相色谱的分析发现从 DE - FF 柱所得的洗脱液中白蛋白二聚体的含量低于 0.1% (w/w), 白蛋白多聚体或聚合体低于检测水平。

实施例 3: 将纯化的白蛋白配制成最终产品

本实施例说明将高度纯化的白蛋白经浓缩透滤和加工成适当的产品, 在此为 25% (w/v) 的白蛋白。这一过程经过两个阶段实, 称为终末超滤(UF)和制剂。最后的 UF 开始时将二乙氨基乙基(DEAE)洗脱液(用磷酸调 $\text{pH} 7.0 \pm 0.3$)转移至最后的 UF 加料容器中, 在保留物和如果有的任何的洗涤物转移至配制剂容器的中止。含白蛋白的加工流出液随后在适于用纤维素的或更优选的标称分子量截流限于 10,000 的聚醚砜滤膜的超滤系统中进行初级浓缩, 透滤和次级浓缩。最初的浓缩步骤使白蛋白浓度增加至约 100g L^{-1} , 并立即进行对透滤液为至少 5 倍, 优选地至少为 7 倍的连续的透滤阶段, 保留物的体积与注射用水体积相当。

在本发明的某些纯化过程, 如在实施例 7 中使用固相化的氨基苯基硼酸盐, 胺离子可能在这一步出现。令人吃惊的是, 我们发现这些胺离子与

白蛋白结合相当紧密，不能通过对水的透滤完全去除。我们发现用盐溶液透滤是有效的。所用的氯化钠与白蛋白的比率为 0.5% 至 10% (w/w)，例如 1.0% 至 5% 或大约 3%。盐可加在白蛋白保留液中或更通常是加在透滤的水中。对于最终 5% (w/v) 的制剂来说，可直接从透滤步骤得到约 100g/L 的溶液。对于最终 25% (w/v) 的制剂，可从进一步的浓缩(UF)得到约 275 - 325g/L 的溶液。最后，所得的溶液转移至大的产品配制容器。

制剂步骤使白蛋白处于适宜于大量无菌过滤(0.22 μ m 亲水性的聚偏二氟乙烯滤膜)和灌装的合适的化学环境和浓度。分析转入的溶液以确定白蛋白，钠和辛酸的浓度。计算这些量并进一步加入必需的一定量的氯化钠储存液和丁酸钠赋形剂及适当级的水以获得特定的大量制剂。最终的白蛋白浓度可为 235 - 265g/L⁻¹(即约 25%)，钠的浓度 130 - 140mM。可制造其它任何可能的白蛋白浓度，但以最低浓度至少 4% (w/v) 为例。最优选地在 4% 至 2.5% (w/v)。在加入适当的、方便的、药学上可接受的赋形剂，如在美国或欧洲药典中对人白蛋白所说，和稀释用水后，制剂完成。

最终浓度为每克白蛋白 0.08 毫摩尔辛酸钠是理想的。产品是无菌和无热原的。用 TSK SW 3000XL 柱的 GP 高效液相分析检测，可能会有约 1% (w/w) 的二聚体白蛋白但无大的多聚体或聚合物。

实施例 4: 阳离子交换后直接阴离子交换

在实施例 2 方法的变化中，步骤的顺序会改变，工艺条件中会有一些变化。因此提供另一层析溶液表，如表 3。此外，除了凝胶渗透一步外，所有的层析柱是辐流式的。

表 3: 实施例 4 中的层析溶液

全部称量允许偏差 $\pm 0.5\%$

编号	溶液		成份	浓度(g.L ⁻¹)	pH	(mS.cm ⁻¹)
	名称					
CS20	SP - FF 平衡液/洗涤剂/		CH ₃ COOH	1.85	5.45 - 5.6	1.9 - 2.2
	DE - FF 平衡液		NaOH(27% (w/w))	4.00		
CS23	SP - FF 洗脱液/		CH ₃ COOH	5.13	5.4 - 5.6	5.0 - 6.0
	DE - FF 预平衡液		NaOH(27% (w/w))	11.5		
			辛酸	0.721		
CS24	SP - FF/DE - FF 盐清洗		NaCl	58.4	5 - 9	75 - 95
			Tween 80	5.00		
CS25	0.5M NaOH(UF 膜清洗)		NaOH(27% (w/w))	74.1	> 12	80 - 120
CS26	20mM NaOH		NaOH(27% (w/w))	2.96	> 12	3.5 - 5.5
CS27	DE - FF 洗涤剂		K ₂ B ₄ O ₇ ·4H ₂ O	4.80	9.0 - 9.4	2.5 - 3.5
CS29	DBA 平衡液/洗涤剂		CH ₃ COONH ₄	19.3	8.7 - 9.1	18 - 22
			NaOH(27% (w/w))	5.93		
CS30	DBA 洗脱液		NaCl	117	6.7 - 7.1	125 - 165
			NaOH(27% (w/w))	14.1		
			H ₃ PO ₄ (85% (w/w))	5.79		
CS32	0.1M NaOH(UF 膜贮存)		NaOH(27% (w/w))	14.8	> 12	16 - 24
CS33	2M 辛酸钠		NaOH(27% (w/w))	281	7.8 - 8.4	-
			辛酸	288		
CS34	乙酸		CH ₃ COOH	1045	-	-
CS35	0.5M 磷酸		H ₃ PO ₄ (85% (w/w))	59.0	< 1	-

开始的阳离子交换步骤与实施例2中同样是必需的，但有如下的变化。柱床的流经高度是 $11.0 \pm 1.0 \text{cm}$ 。层析按下述进行。

SP-FF(Pharmacia)层析柱用4倍柱体积的10-100mM的乙酸盐，优选地是20-40mM，例如30mM的CS20平衡，上柱的白蛋白溶液流率为每分钟0.07至0.75倍的柱床体积，优选地是0.3-0.6倍，本实施例是0.5倍柱床体积每分钟。柱子用8倍柱体积的10-100mM，优选地是30-70mM，例如50mM的乙酸盐(CS21)洗涤然后用10倍柱体积CS20洗涤，白蛋白用乙酸盐/辛酸盐缓冲液(例如40-120，优选地为60-100，即85mM乙酸盐和2-50，优选地为2-20，即5mM辛酸，如(CS23)洗脱，并用A254/cm值0.6和0.36为标志开始和停止收集洗脱液。柱子用0.25-3.0M的盐和0.05-2%的去污剂(CS24)再用0.1-1.0M氢氧化钠(CS25)清洗，并贮存在稀释的(10-50mM)氢氧化钠(CS26)中。在本实施例中，平衡、上样和洗涤步骤中的流率为每分钟0.5倍柱床体积。白蛋白洗脱的流率为每分钟0.04-0.6倍柱床体积，优选地0.15-0.35，在本实施例中为0.25倍柱床体积/分钟。预期的重组人白蛋白单体的回收率在44%和66%之间。

白蛋白用辛酸溶液从阳离子交换柱洗脱，成为一种新的从阳离子交换材料上对重组人白蛋白的生物特异的洗脱。pH值与白蛋白的等电点接近以致辛酸盐的结合引起明显的整个的电荷不同，例如，pH值至少4.5，优选地pH约为5.5。

从阳离子交换所得的洗脱液直接上样(即代替如实施例2中亲和凝胶渗透之后，但优选地在稀释之后)在阴离子交换树脂，其pH4.5-6.5优选约5.5，电导率最好在 1.5 至 5.0mScm^{-1} 范围，例如 $2.5 \pm 0.5 \text{mScm}^{-1}$ 。这会导致在阳离子交换层析过程中形成的任何二聚体白蛋白在阴离子交换层析的条件下转变成白蛋白单体。在这一步可获得约110%白蛋白单体的收率。

更详细的是，柱床流经高度 $11.0 \pm 1.0 \text{cm}$ 的二乙氨基乙基琼脂糖快流柱(Pharmacia)用阳离子交换洗脱缓冲液(CS23)预平衡，然后在以每升基质 $30.0 \pm 10 \text{g}$ 单体白蛋白上样之前用乙酸盐缓冲液(例如CS20)平衡。

柱子然后用如同实施例2中硼酸溶液(CS27)洗涤，如同实施例2洗脱，与阳离子交换柱一样用盐/去污剂(CS24)，氢氧化钠(CS25)清洗并贮存在稀释的氢氧化钠(CS26)。所有步骤的流率为每分钟0.07至0.75柱床体积，优选地是0.3-0.6，本实施例为每分钟0.5柱床体积。

从阴离子交换树脂(如 DE-FF)获得的洗脱液仍含有不纯物质并直接用亲和基质(如实施例 2 中所述的 Delta 蓝琼脂糖)处理。柱床高度从实施例 2 中的 25cm 降至 $11.0\pm 1.0\text{cm}$, 以使在常规操作压力下能有较高的流率。因此, 11.0cm 的床高是最佳的, 不会负面影响白蛋白的回收或白蛋白的纯度。层析柱以乙酸铵(100-300mM, 优选地 200-275, 例如象 CS29 中 250mM)平衡, 上样的白蛋白量按每升基质 7.0-14.0g, 优选地 8.0-12.0g 本实施例为 $10.0\pm 1.0\text{g}$ 。操作平衡、上样和洗涤步骤时的流率为每分钟 0.05-0.30 柱床体积, 优选地 0.15-0.27, 本实施例为每分钟 0.25 倍柱床体积。所有其它步骤以 0.04-0.30 操作, 优选地 0.1-0.25, 本实施例为 0.20 柱床体积/分钟。通过降低柱床高度所得的流率的上升因四个有利于大规模生产的因素之一而增加了产量并接近于 DBA 的最大工作能力。由于这种增加的流率对白蛋白的回收或白蛋白的纯度未显出不利影响, 因此采用这种较高的流速是可取的。

层析柱用 5 倍柱体积的乙酸铵缓冲液(CS29)洗涤, 白蛋白以强的盐和磷酸盐溶液(1.0-3.0M 氯化钠, 如 1.5-2.5M 或 2.0M 氯化钠和 5-100mM, 即在 CS30 中 50mM 磷酸盐)洗脱。

在本变化的方法中洗脱液的 pH 值从 9.2 改变为 7.0。缓冲液从 50mM 的乙酸铵改变为 50mM 的磷酸钠, 优选地因为其缓冲值为 pH7.0, 以及相对低廉的价格。低 pH 值的洗脱液导致增加 DBA 洗脱液中白蛋白单体的回收。低于 7.0 的 pH 增加片段的水平, 而高于 pH7.0, 白蛋白单体的回收率下降。pH 值, 可在 5.5-9.0 的范围, 优选地为 pH7.0。层析柱以如上所述的氢氧化钠(CS25, CS26)清洗和贮存。

DBA 的洗脱液(可选择用纤维素型滤膜(标称截流分子量 30,000)超滤后得到 80-110g/L 的白蛋白)然后进行凝胶渗透树脂, 如 S-200(HR)处理。S-200 所用的缓冲液改变为 40mM 磷酸钠 pH7.0。这种缓冲液由于价格原因省略了辛酸钠, 而代替以将溶液在透滤(加至浓度 1-20mM, 优选地为 5mM)加入。磷酸盐使使用的缓冲液具超高的电导率以增加纯度。可采用高盐浓度增加电导率但优选地还是使溶液具缓冲能力。优选地是 pH 7.0, 这是由于这是制剂的理想 pH 值。

因此, 在本实施例中, 纯化步骤的顺序是: 阳离子交换(以一种与白蛋白特异结合的分子洗脱), 阴离子交换, 亲和层析和凝胶渗透。

如果开始时白蛋白是 pH 7.0 会对制剂之前的透滤步骤有帮助。白蛋白在最终的洗脱液中比实施例 2 的方法更浓缩,有助于制剂(实施例 3)前的终末超滤步骤。

实施例 5: 阳离子交换剂的高盐洗涤

在本方法的进一步变化中,除了下述外,其余按照实施例 2 或 4 中的方法。白蛋白上样至阳离子交换柱(例如 SP-琼脂糖凝胶 FF, Pharmacia)后,柱子用 CS21(50mM 乙酸钠, pH3.9-4.1, $0.6-0.8\text{mScm}^{-1}$)洗涤,然后,进一步在最终的 CS20 洗涤之前用乙酸钠缓冲液(例如 10-50mM 乙酸钠,优选地为约 27mM, pH 3.5-4.5 优选地为 pH 4.0)中含 1-3M,优选地为 2M 的氯化钠的高盐缓冲液洗涤。这种更严格的洗涤方法导致洗脱液含有的非白蛋白的蛋白水平较低,这对于如果白蛋白来源于酵母发酵也许特别有用。白蛋白按实施例 4 所述洗脱。高盐洗涤前降低 pH 值有助于在洗涤过程中保留柱中的白蛋白,且最后的洗涤也被白蛋白回收达到最大。可能没有任何一个步骤对于回收的白蛋白的纯度有主要的影响。

实施例 6: 浓缩从阴离子交换剂获得的硼酸盐洗脱液

本实施例中,实施例 2 或 4 的方法(经或不经实施例 5 的变化)作如下的变更。阳离子交换柱的洗脱液稀释至电导率低于 10mScm^{-1} , 优选地低于 5mScm^{-1} , 然后上样于阴离子交换基质(例如二乙氧基乙基琼脂糖凝胶 FF, Pharmacia), 阴离子交换基质然后用稀释的四硼酸盐缓冲液(如 25mM 的四硼酸钾或四硼酸钠)洗涤,这具有使 pH 上升至约 9.2 的作用,白蛋白用浓度更高的四硼酸盐(如 80-150mM 四硼酸钾,优选地为 110mM 四硼酸钾)洗脱。在实施例 2 和 4 中,白蛋白是用 20mM 四硼酸盐, 100mM 氯化钠洗脱;用 80-150mM 四硼酸盐(如 33.6g/L)导致洗脱液含碳水化合物杂质如酵母蛋白的含量较低,这是因为在这种条件下,这些物质与阴离子交换基质的亲和力上升。使用四硼酸钾比四硼酸钠更优选是因为其在室温下有较高的溶解度。阴离子交换基质的洗脱液同实施例 2 或 4 中一样处理。例如,在实施例 4 的方法中,直接上样至亲和基质,如 Delta 蓝琼脂糖(DBA),如实施例 4 所述操作。

然后进行如实施例 2 或 4 的凝胶渗透步骤。

实施例 7: 固相化的氨基苯基硼酸盐

从 DAB 基质所得的洗脱液可在凝胶渗透基质上操作,如 Sephacrgl

S-200(HR)(Pharmacia), 其在一种乙酸铵缓冲液平衡(如 10 - 100mM, 优选地约 30mM, 含有氯化钠(20 - 2000mM, 优选地为 100mM)和辛酸盐(1 - 20mM 在 pH9.0 - 9.5 优选地为 9.2 时的 5M 辛酸盐为优选。)这种缓冲液在下文详述的最后的层析步骤中有效地将白蛋白交换到合适的溶液中。

S - 200 步骤操作如下。S - 200 工作的最低床高是 $90.0 \pm 3\text{cm}$ (如一套 $3 \times 3\text{cm}$)。 (a) 中间体超滤的保留液上样至柱子。循环并回收产物组分。这一步可重复直至所有原料上样至柱子。 (b) 混合的循环组分用上述的超滤浓缩至 80 - 110g 重组人白蛋白/升。 (c) 循环超滤的保留液上样至同样的柱子, 并收集每个峰的产物组分。重复这一步直至所有原料都上样至柱子。 (d) 初级和次级凝胶渗透步骤(a)和(c)的产物组分混合作为 S - 200 的洗脱液。

最后一步包括一去除糖缀合物, 如糖蛋白和糖脂, 和多聚、寡聚及单体糖。这一步用固相化的氨基苯基硼酸(PBA)作为配体。美国专利第 4562251 号(以参考文献形式并入本发明描述了制备二硼酸化或单硼酸化的琼脂糖的适当方法。(1)首先, 三嗪以 O 基与琼脂糖连接, 然后在第二个反应中与 3 - 氨基苯基硼酸(APBA)连接。如果三嗪上的 X 基团被氯取代则形成二取代的树脂。(2)首先, 三嗪与 APBA 反应产生单或二硼三嗪。其再通过三嗪上的自由氯基团以 O 基连接到 - ONa 激活的琼脂糖以产生单基团或二基团取代的琼脂糖。本专利中所有的实施例和说明都采用能导致 O - 连接的 ONa 激活的琼脂糖。

较早的专利 US 4269605 考虑用不同的基质激活方法。包括 3 - 氯 - 1, 2 - 环氯丙烷活琼脂糖, 在这里更优选。商品化的基质包括 Amicon 的 PBA 30 和 Sigma 的丙烯珠化的氨基苯基硼酸盐。

从 S-200 柱收集的白蛋白经已用 S-200 作缓冲液(见上)预平衡的 PBA 基质层析; 在这种情况下, 白蛋白并不明显地与基质结合, 而基于碳水化合物的杂质则在通过该柱时被阻滞于柱子足以有效地从白蛋白中分离。因此对于白蛋白来说层析处于消极状态。详述如下:

苯基硼酸盐基质的流经高度为 $11.0 \pm 1.0\text{cm}$, 用含铵离子(10 - 50mM), 乙酸盐(10 - 50mM)和 1.0 - 10.0mM 的辛酸盐(中 CS36 - 见下表)的缓冲液平衡。柱的上样量为 $35 \pm 15\text{g}$ 重组人白蛋白/升基质。PBA 是作为一负效应步骤来进行, 因此, 收集的产物是上样期间和随后以平衡缓冲液洗涤的流出液。所有层析步骤都可以范围在 0.005 - 0.4 柱床体积/min 的流率进行。平

衡和清洗柱子优选地用较高的流率，如 0.19 柱床体积/min，而不似上样和收集白蛋白溶液，其优选地以 0.01 - 0.05；优选地为 0.025 柱床体积/min。然后，柱子以硼酸缓冲液(如 CS37)、盐(CS38)和苛性碱(CS25)清洗再贮存在硼酸缓冲液(CS37)。

收集的流出液和洗涤液用磷酸溶液(CS35)调节 pH 至 7.0 ± 0.1 。

所用的缓冲液如下：

表 4: 实施例 7 的层析溶液

溶液		组分	浓度 (g/L)	pH	电导率 (mS.cm ⁻¹)
编号.	名称				
CS36	PBA 氨基苯基硼 酸平衡/洗涤	CH ₃ COONH ₄	2.31	9.0 - 9.4	12.0 - 15.0
		NaOH(27% w/w)	2.55		
		NaCl	5.84		
		辛酸	0.721		
CS37	硼酸盐清洗	K ₂ B ₄ O ₇ ·4H ₂ O	33.6	9.2 - 9.5	15.0 - 18.0
CS38	盐清洗	CH ₃ COOH	1.62	3.9 - 4.1	125.0 - 165.0
		NaOH(27% w/w)	1.19		
		NaCl	117.0		

由于在 PBA 缓冲液中使用了铵离子，在最后的超滤步骤中使用盐，如上述实施例 3 所解释的那样是有益。

在一个尤其优选的方法中，各步骤的顺序如下：

- (1) 如实施例 1 中的酵母发酵。
- (2) 如实施例 2 中调节浓缩液。
- (3) 如实施例 5 中，用高盐洗涤阳离子交换剂(SP - FF)，再如实施例 4 所示用白蛋白特异的化合物洗脱白蛋白。
- (4) 稀释并以实施例 6 中所述的用浓缩四硼酸盐洗脱的阳离子交换。
- (5) 如实施例 4 中的亲和层析(DBA)。
- (6) 中间体超滤然后凝胶渗透(S - 200)，伴以如实施例 7 的循环(recycle)超滤。
- (7) 如实施例 7，用固相化硼酸盐进行层析。
- (8) 如实施例 3 中的最终超滤和配制。

实施例 8: 固相化苯基硼酸盐的提前使用

涉及固相化苯基硼酸盐的步骤可在方法中提前使用, 例如一种方法其步骤确定为: 阳离子交换剂 - 阴离子交换剂 - 亲和材料 - 超滤/透滤 - 固相化苯基硼酸盐 - 凝胶渗透。

每步的条件参见实施例 4 至 7, 以下除外。DBA 洗脱液通过对实施例 7 中所用的那种乙酸铵的透滤(5 倍体积)浓缩至 80 - 110g/L 白蛋白, pH 调至 9.2。浓缩的 DBA 洗脱液用 PBA 层析, 收集流出液直接用于凝胶渗透(例如 S200)柱。由于现在凝胶渗透是最后一步, 可在一种适合于制剂步骤的缓冲液如 20 - 130mM(优选地为 50 - 100mM)pH 7.0 氯化钠进行。

实施例 9: 根据本发明制备的白蛋白的特征

本实施例说明根据本发明纯化的白蛋白进行纯度检测。除非另有说明, 所有进行测试是针对如实施例 3 所述制剂方法获得的最终产品白蛋白。

重组人白蛋白的糖基化

糖基化蛋白微量分析显示根据本发明纯化的重组人白蛋白不是通过非酶促的糖基化修饰的。微量分析是通过用高碘酸氯化 C-1 的羟基基团来测定糖基化蛋白的稳定的 Amabori 产物(AP)形式。高碘酸氧化释放的甲醛通过在氨中与乙酰丙酮反应而转变成生色基团, 二乙酰基二氢二甲基吡啶(DDL)来定量。DDL 在 405nm 进行比色检测。

白蛋白批次	Mol 己糖/mol 蛋白
A	0.092
B	0.116
C	0.090
D	0.132
E	0.060
G	0.04
H	0.01
I	0.07
J	0.07
K	0.05
L	0.740
M	0.70

N	0.96
O	0.78

批次为 A-K 是按实施例 2 纯化的重组人白蛋白。批次为 L-O 是不同来源的商品化的人血清白蛋白。8 批按实施例 7 纯化的重组人白蛋白与人血清白蛋白(0.387 ± 0.012)相比其糖基化水平(0.042 ± 0.018 moles/mole)可忽略。

低分子量杂质分析

原理：本分析的目的是使用酸性有机溶剂从重组人白蛋白和人血清白蛋白中去除非共价键结合的低分子量杂质(LMC)。可得出一与样品比较的高效液相色谱的指纹色谱图。

方法 - 在 100 μ l 最终产品(20mg, 重组人白蛋白或人血清白蛋白)中依次加入 50 μ l 甲酸(98% v/v), 100 μ l 氯仿和 50 μ l 乙醇, 每次加入后混匀器混匀。样品在室温常规混和 5 分钟。再加入 1ml 丙酮(30 分钟, -20°C)使蛋白沉淀。离心使蛋白样品沉聚, 去除上清, 用真空旋转蒸发干燥。干燥的样品重悬于 25% 乙腈/0.1% 三氟乙酸。然后低分子量杂质在用 10% - 90% 线性乙腈梯度的三氟乙酸(流率 = 30 μ l/min)的 ABI PTH C18 反相色谱柱(220 \times 2.1mm)中分离。样品在 214nm 用 Shimadzu 紫外检测仪检测。

结果 - 对一批商品化的人血清白蛋白和一批根据本发明纯化的重组人白蛋白进行比较。在本发明提供的样品中可见两个主要的明显的 $A_{214\text{nm}}$ 峰(Rt 分别为 31.1 和 42.8 分钟 - 见图 2 和表 9)在 2.15 分的峰认为是由通过柱的不溶或部分溶解的物质形成, 56.5 分钟的大峰出现在微量的水空白中因而被认为是假象。

表 5: 吸收峰结果

#	保留时间 (min)	面积 (uV.sec)	高 (uV)
1	0.800	3459686	219122
2	1.667	418606	33569
3	2.150	77883335	1963630
4	3.000	6293258	122295
5	20.433	297608	14424
6	22.900	205822	14601
7	27.567	150851	10835
8	31.117	2213883	170938
9	37.983	164710	15088
10	39.267	347946	29879
11	41.750	107515	8402
12	42.783	2303024	192911
13	43.217	139744	14141
14	43.457	254521	23979
15	50.467	152805	13226
16	50.950	162364	12577
17	56.533	5753796	83674

另一方面，商品化的人血清白蛋白有更多的峰。

表 6: 吸收峰结果

#	保留时间 (min)	面积 (uV.sec)	高 (uV)
1	0.350	244385	23957
2	0.633	607880	45310
3	0.783	3239730	243477
4	0.983	1072033	158146
5	2.233	76773569	2038028
6	2.933	6634089	182363
7	3.733	2812688	95459
8	12.483	818540	20185
9	12.650	218748	22750
10	14.150	5423715	98336
11	16.333	423403	17460
12	16.633	688525	24538
13	17.550	2301309	84781
14	18.033	1145045	47806
15	19.750	672721	21562
16	20.233	87799	9760
17	20.700	272171	13003
18	21.100	862146	55792
19	21.967	166471	8928
20	22.883	1381445	97660
21	23.583	1112632	89851
22	24.000	4740347	419780
23	24.417	352486	26374
24	24.917	171279	14625
25	25.133	99734	11473
26	25.267	133911	10515
27	25.667	223556	11854

#	保留时间 (min)	面积 (uV.sec)	高 (uV)
29	26.600	93906	7957
30	26.817	223113	18326
31	27.250	303831	29461
32	27.533	124218	12710
33	27.783	5747091	561629
34	28.550	1383761	119772
35	29.033	390986	33455
36	29.417	182131	12713
37	29.833	181333	12584
38	30.183	478320	30155
39	30.583	1048945	58465
40	31.067	3454425	214489
41	31.983	168275	8663
42	32.717	651406	43161
43	33.150	1142221	102588
44	34.017	420756	23883
45	35.100	115704	10008
46	37.033	166588	9468
47	38.267	145731	8078
48	38.983	781209	54029
49	41.800	86967	8868
50	48.883	95416	8522
51	50.267	174159	16737
52	50.483	176115	15573
53	51.267	158727	13701
54	52.183	297278	25795
55	56.533	5846645	85710

依据非共价结合的低分子量杂质,本发明的白蛋白的质量明显高于临床人血清白蛋白的质量。用数量表示,本发明的白蛋白在10分钟和55分钟之间的所有峰的面积约为6.4V.sec,而商品化物质在同样两个时间之间的所有峰面积约为39.7V.sec。

对在280nm检测进行相似的分析,在此情况下按本发明纯化的白蛋白的峰面积为0.56V sec,而人血清白蛋白为14.9Vsec。

低分子量杂质的荧光分析(在280nm激活,在350nm检测)再次表明用本发明纯化的白蛋白的全部峰面积低于人血清白蛋白的10%。

重组人白蛋白和人血清白蛋白的毛细管区带电泳。

毛细管电泳(CE)是标准十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)的一种替代方法,以便定性地比较本发明纯的人重组白蛋白和商品化的人血清白蛋白。CE是一种高分辨的电泳技术,它能分离仅能发现少量差别的同样蛋白的亚群。

方法-人血清白蛋白(Armour)和按本发明纯化的重组人白蛋白在20mM $\text{PO}_4/\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲液, pH 7.4, 20Kev 30°C下分离,在ABI 270 CE电泳。本发明的重组人白蛋白在电泳图上只有单一峰,表明其均一性。相比而言,在商品化的人血清白蛋白样品中发现有其它的峰,相信这些峰是表明存在诸如含有断裂的自由巯基或氨基末端降解的白蛋白分子。

C-末端分析

重组蛋白质量控制的一个重要方面是预定的一级结构的确定和稳定。

材料和方法

胰酶消化:人血清白蛋白(商业来源-一个样品存于-20°C,另一个在30°C 12小时),按本发明纯化的重组人白蛋白(存于4°C和30°C 6个月)和去除亮氨酸重组人白蛋白(重组人白蛋白去掉C末端亮氨酸的截短型)(每种1mg)用5mM的二硫苏糖醇(Calbiochem)在37°C下降解120分钟,然后以存在于溶于0.5M三羟甲基氨基甲烷盐酸pH 8.0中的6M盐酸胍中的10mM碘乙酰胺(Sigma)在37°C下烷基化90分钟。

然后,样品按1份溶于3份水中并用胰酶37°C消化48小时(TPCK处理的胰酶,购自Sigma,加入 $3 \times 10^6 \mu\text{l}$ 容量的1mg/ml的溶液过48小时)。

肽图:胰酶消化产物用反相(RP)高效液相色谱作图。高效液相色谱采用使用25cm Pharmacia Super Pac Pep-S色谱柱($5 \mu\text{mC}2/\text{C}18$)的Gilson高效液相色谱

谱系统。所用的洗脱液是 A: 0.1 % (v/v) TFA (ABI) 水溶液; B: 0.09 % (v/v) TFA 溶于 70 % (v/v) 乙腈 (Fisons Scientific), 线性梯度超过 60 分钟, 0.5 μ l/min。在 214nm 和 280nm 处进行紫外检测。

N-末端测序: 在 ABI 477A 蛋白测序仪上进行。

快原子轰击-质谱: 快原子轰击-质谱用 M-Scan Limited, Ascot, UK 生产的一种 VG Autospec 进行。

肽合成: 全长的 C 末端胰酶降解肽 LVAASQAA LGL (分子量 (mass) 1012) 由 ABI, Warrington, UK 合成; 截短的 LVAASQALG (分子量 899) 由 Nottingham 大学生物化学系, Nottingham 美国, 合成。

结果:

全长的 C 末端的胰酶酶解的肽 (分子量 1012) 用合成肽作标记显示在反相高效液相色谱 37.5 分钟时洗脱。从人血清白蛋白和重组人白蛋白收集这一峰并用 N 末端测序和快原子轰击-质谱鉴定。

去除 C 末端的亮氨酸获得用合成标记肽确定的显示在 28.5 分洗脱的截短的 C 末端肽 (分子量 899)。这一洗脱峰从胰酶消化的去亮氨酸的重组人白蛋白分离并用 N-末端测序和快原子轰击-质谱鉴定。在这 28.5 分钟的洗脱峰中显示存在两种其它的肽, AWAVAR (分子量 673) 和 DLGEENFK (分子量 950)。

28.5 分钟的洗脱峰从胰酶消化的, 人血清白蛋白 (HSA) 的反相高效液相色谱中收集。HSA 贮存在 30 $^{\circ}$ C 下 12 周。去除亮氨酸 rHA. rHA (本发明) 贮存于 4 $^{\circ}$ C 下 6 个月而本发明的 rHA 贮存于 30 $^{\circ}$ C 6 个月。

每种消化产物的洗脱峰随后用 N 末端测序和快原子轰击-质谱 (合成标记肽) 来分析。

表 7: 用 N-末端测序不自定的 28.5 分钟峰中存在的肽

样品	序列
脱 - Leu rHA	LVAASQAALG AWAVAR DLGEENFK
HSA 标准品	AWAVAR DLGEENFK + about 5 % LVAASQAALG
HSA 30°C 下 12 周	AWAVAR DLGEENFK
rHA 4°C 下 6 个月	AWAVAR DLGEENFK
30°C 下 6 个月	AWAVAR DLGEENFK

用快原子轰击, 存在于 28.5 分洗脱峰的主信号((M+H)⁺分子离)如表 8 所示。

表 8: 在 28.5 分的吸收峰的离子(M+H)⁺

合成的全长和截断 C 末端肽的混合物	1013 - LVAASQAALGL 900 - LVAASQAALG
脱 - Len rHA	673 - AWAVAR 900 - LVAASQAALG 951 - DLGEENFK 1028 - ? 1140 - ?
HSA 标准品	673 - AWAVAR 900 - LVAASQAALG 951 - DLGEENFK 1028 - ? 1140 - ?
rHA 于 30°C 下 6 个月	673 - AWAVAR 900 - LVAASQAALG 1028 - ? 1140 - ? 951 - 无信号

在 1028 和 1104 的信号可能是碎片的离子；它们不是可通过测序分析检测的肽。

结论:

去除亮氨酸的 C 末端胰酶消化肽在商品化人血清白蛋白检测到约 5-10% (不定量), 但在本发明的重链人白蛋白中, 即使 30°C 保存 6 个月也不能检测到。去除亮氨酸的肽不能在 30°C 贮存 12 周的人血清白蛋白中检测到, 全长 C 末端肽在 37.5 分钟的洗脱峰(尽管未分离)与其它样品相比非常弱, 显示可能正处于进一步的 C 末端降解。

这些结果显示, 按本发明纯化的重组人白蛋白有稳定和全长的羧基末端, 而以前商业来源提供的人血清白蛋白相比则显示出异质性。

纯化的人白蛋白中自由巯基的比色分析

导言 - Ellmani's 试剂 5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸(DTNB)是一种检测自由巯基如 Cys-SH 的特异的和灵敏的方法。反应可用在 412nm 处的光吸收跟踪监测, 其数值可用于计算自由 Cys-SH, 其可达到每分子重组人白蛋白少于 1 个残基水平的。检测中所用的溶液试剂如下:

5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸 DTNB, Sigma 产品, 编号 D8130

TRIS 预配的 pH 晶体 pH 8.0, Sigma 产品, 编号 T4753

EDTA, 二钠, Sigma 产品, 编号 ED2SS

二水磷酸二氢钠, 分析级

二水磷酸氢二钠, 分析级

缓冲液 1: 0.1M(12.1g)Tris-HCl; 0.01M(3.72g)EDTA Na₂·2H₂O, pH8.0、预配的 pH 晶体。溶于 500ml 水并定容至正好一升体积。室温下稳定 1 个月。

缓冲液 2: .05M 磷酸钠 pH 7.0, 二水磷酸氢三钠(5.45g)3.04g 二水磷酸二氢钠。溶于 500ml 水, 并定容至正好一升体积。室温稳定一个月。

试剂: 0.01M(39.4mg)DNTP 在磷酸缓冲液中。在 10ml 缓冲液 2 中溶解。每日新鲜配制。

样品: 白蛋白用缓冲液 1 稀释至约 10.3μM(0.66g/ml)。

步骤:

1)将分光光度室的温度设为 25°C。2)分别在样品和对照位置上放入加入 1.25ml 样品的比色杯和另一加入缓冲液 1 1.25ml 的 10mm 的体积减小的比色杯。3)在 412nm 调零。设置吸收度至 0.1AU 满值。4)在对照比色杯中

加入 50 μ l DTNB 试剂，并用干净的塑料搅棒轻微混和。5)在样品杯中加入 50 μ l DTNB 试剂，如上混和。6)立即开始读取数据(或打开绘图记录仪，随后反应持续 10 分钟以上)。7)重复每一样品，以得到三个重复的值。8)从稳定的吸收衰减外推至零时，并在 412nm 读出吸收值(δA_{412})(图 1)9)用分子消光系数 $\epsilon_{412} = 13.9\text{cm}^2\text{mM}^{-1}$ 计算巯基的含量。

结果:

大量的商品化的人血清蛋白样品用于检测自由巯基含量，结果归纳如下:

人血清白蛋白	自由巯基(mole SH/mol HSA)
1	0.29
2	0.22
3	0.35
4	0.05
5	0.08
6	0.46
7	0.36

这些值比按前述实施例制备的，常规检测为 0.85 - 0.9mol SH/mol rHA 的白蛋白的值明显较低。

用石墨熔炉分光镜(graphite furnace spectroscopy)检测人白蛋白中的金属离子杂质。

标准品和样品用高温包被的石墨管中的原子雾化。用下列条件检测样品的原子吸收。

金属离子	波长	原子化温度 $^{\circ}\text{C}$
Zn	213.9	1800
Cu	327.4	2300
Fe	248.8	2400
Al	309.8	2500
Mn	279.8	2200

铝的测定采用 Perkin Elmer M2100 原子吸收分光光度计，Perkin Elmer HGA - 700 石墨炉，有样品杯和铝管阳性灯 Perkin Elmer AS - 70 自动进样器。试剂为分析纯级的硝酸镁，一种铝标准溶液(1000 ppm)和分析纯级浓硝

酸。1.00% w/v 硝酸溶液用 milli-Q 水配制。在自动进样器中注入 15 μ l 铝标准溶液并以 0.20% 硝酸溶液稀释至 1500 μ l。用 15 μ l 得到的溶液，然后再用得到的 150 μ l 溶液重复该步骤，以得到 10ppb(μ g/l)铝溶液。

白蛋白样品以 0.20% 硝酸溶液稀释使得得到一在标准曲线范围内的铝浓度。通常 1:2 稀释是足够的。

镁的测定类似使用 Perkin Elmer AS-51 闪烁自动加样器和镁空心阳极灯。1000ppm 的镁标准溶液用 Milli-Q 水稀释得到 0.1, 0.2, 0.5 和 1.0ppm 的标准溶液。在 28.5nm 处检测样品的原子光吸收。

铜、铁、锰和锌用同铝一样的方法测定，除了锌用 1.0ppb(μ g/L)的标准溶液代替 10ppb 的溶液。金属离子的浓度以 ng/L 确定，并与白蛋白的浓度相关(μ g 金属离子/g 白蛋白)。这些资料列于表 9。

表 9: 按本发明制备的白蛋白的杂质分布
浓度(μ g/g 白蛋白)

化学元素	批 A	批 B	批 C	
铝	-	85	-	
铜	3720	9080	1780	
铁	460	810	440	
镁	1200	850	800	
锌	4510	1490	1790	
锰	20	191	16	
化学元素	批 D	批 E	批 F	批 G
铝	-	-	-	-
铜	660	2690	440	530
铁	930	380	2720	1880
镁	-	-	-	-
锌	1580	680	3520	2130
锰	42	14	58	27
化学元素	批 H	批 I	批 J	批 K
铝	9	22	86	96
铜	520	590	9920	8820
铁	1010	670	1030	100
镁	600	< 400	2000	2000
锌	1740	1040	4280	3520
锰	35	20	46	60

所有结果以总金属离子浓度表示。

表 10 显示商品化人血清白蛋白中相应的金属离子水平。

表 10: 以 ng 金属/白蛋白克数计的浓度

化学元素	来源 A(美国)	来源 B(美国)	来源 C(日本)	来源 D(日本)
铝	790	970	915	420
铜	2020	4510	23840	580
铁	41220	15200	23550	15240
镁	4500	500	15000	54000
锌	7230	1650	930	4580
锰	940	190	135	240
化学元素	来源 E(英国)	来源 F(美国)	来源 G(法国)	
铝	350	3190	155	
铜	4830	1180	7910	
铁	7910	25920	1850	
镁	1500	500	500	
锌	1520	3940	2130	
锰	160	65	80	

可见本发明的产品中铝的平均水平约为 60ng/g 而商品化的含 155 - 3190ng/g。同样, 本发明的产品含有平均约 948ng/g 的铁(比较现有技术的材料 1850 - 41, 200ng/g), 平均 2, 990ng/g 的铜(比较现有技术的材料 580 - 23, 840ng/g), 平均 1120ng/g 的镁(比较现有技术的材料 500 - 54, 000ng/g), 平均 2390ng/g 的锌(比较现有技术的材料 930 - 7230ng/g)和平均 48ng/g 的锰(比较现有技术的材料 65 至 940ng/g)。

培养基和长链脂肪酸的分析。

根据本发明所得的白蛋白和商品化的人血清白蛋白的脂肪酸的特征通过用酸性溶剂提取和以 C17:0 为内对照标准的游离脂肪酸的气相色谱分析。装置: 带火焰离子检测器的气相色谱(如 Shimadzu GC9A); 自动进样器(如 Shimadzu AOC 14); 综合仪/打印机(如 Shimadzu (R4A)); HP - FFA 30×0.53mm, 1.0μM 相层析柱(Hewlett Packard Ltd); 带有直接注射套筒的 Megabore 安装工具箱(用于 GcaA 的 J& W Scientigic 220 - 1150.)。

试剂：水(Milli-Q)；二氯甲烷超纯溶液(Romil Chemicals. Loughborough, Leics)；分析纯的三水乙酸钠(BDH Ltd. Poole)；分析纯冰乙酸(BDH Ltd. Poole)；人血清白蛋白溶液(ZenalbTM20, Bio ProduceTs Laboratory, Elstree, Herts)；无水硫酸钠(分析级)；Sigma 的标准脂肪酸。

溶液：

0.5M 乙酸钠缓冲液 pH 4.5：每 100ml 中乙酸钠 6.13g，乙酸 3.30g。游离脂肪酸标准混和物。在不同的玻璃试管中，分别称取各种脂肪酸 5mg。溶解每种脂肪酸于 1ml 二氯甲烷中，并分别按短链脂肪酸(C₆-C₁₄)，中等长度链脂肪酸(C₁₆-C₁₈)和长链脂肪酸(C₂₀-C_{22:1})转移至 3 个 12ml 的 P_{yx} 培养管中。在氮气流中干燥混和物并用 1ml 二氯甲烷溶解。将 50 μ l 量的混和物转入标记的玻璃管，氮气流中干燥，封口并贮存在 -20 $^{\circ}$ C。

内对照标准溶液 1mg/ml 十七酸(25.0mg 十七酸/25ml 二氯甲烷)。

步骤：

1. 加 50 μ l 内对照标准溶液于标为 6 的 40ml 的 P_{yx} 管。
2. 5% 的重组人白蛋白加 5ml 样品。25% 重组人白蛋白用 1ml 样品和 4ml 水。包括一个空白(5ml 水)和血清白蛋白样(1.25ml ZenalbTM20 和 3.75ml 水)。所有的样准备两份。
3. 所有管中加入 2.5ml 乙酸钠缓冲液，然后 10ml 二氯甲烷。
4. 盖好盖的管置于机械转床上室温 2 小时。
5. 20 $^{\circ}$ C，Sorvall RT 6000B 离心机中以 3000rpm 将所有管离心 5 分钟。
6. 弃去上层水相，从管底小心转移下层二氯甲烷相至标记的 12ml. P_{yx} 管。蛋白粒可能会妨碍二氯甲烷相的转移。若出现这种情况加入一满匙的无水硫酸钠，盖上盖并震荡。

7. 在氮气流中干燥二氯甲烷相，并存在 -20 $^{\circ}$ C 的氮气流中直到分析。

8. 安装毛细管柱，按操作指南设置气相色谱的下列条件：

检测器：火焰离子分光光度计；负载气体：30ml min⁻¹ 的氮气流；注射体积：0.5 μ l；柱起始温度：70 $^{\circ}$ C；维持时间：1.5 分钟；梯度 1：20 $^{\circ}$ Cmin⁻¹ 至 150 $^{\circ}$ C；梯度 2：4 $^{\circ}$ Cmin⁻¹ 至 240 $^{\circ}$ C；维持：7 分钟；检测器温度：280 $^{\circ}$ C；Shimadzu GC9A 的特殊设置为：检测器范围：10 $^{\circ}$ C；水压：0.5kg/cm²；气压：0.5kg/cm²；中心时间：50 分钟。

9. 打开综合仪(integrator)按操作指南从气相色谱中记录数据。

10. 使烤箱升温至 245℃，直至获得稳定的基线。

11. 降低烤箱温度至 70℃并让其平衡。

12. 融化一定量的长链、中等长链和短链脂肪酸标准品。将长链脂肪酸溶于 1ml 二氯甲烷中。将溶液转入中等长链脂肪酸使之溶解。重复操作处理短链脂肪酸。

13. 注入标准品混和物以确定脂肪酸存留时间。得到的色谱图应几乎没有峰拖尾现象，而存在平滑地缓慢上升的基线伴以适当数量明显的峰。己酸(C6:0)应在滞留约 6 分钟后洗脱，而顺芥子酸(C22:1)的滞留时间约 33 分钟。通过比较标准品样的色谱图可确定所有的峰。

14. 注入样品并记录数据。

计算：

1. 从空白样品确定内对照标准的峰。这将是滞留时间约 23.5 分钟的主要的峰。

2. 用下列公式计算所有样品的所有整合峰的峰面积比率。

$$\text{吸收峰面积比率} = \frac{\text{峰面积}}{\text{内对照标准品峰面积}}$$

3. 通过与标准品比较确定基于滞留时间的重组人白蛋白和人血清白蛋白样品中的脂肪酸吸收峰。

4. 使用下列用于将重组人白蛋白和人血清白蛋白样品所有峰面积率转换成大致的浓度(μg/g 白蛋白)。

$$\text{浓度}(\mu\text{g/g}) = \text{峰面积率} \times 200$$

5. 用脂肪酸分子量和下列公式将确定为脂肪酸的峰从 μg/g 白蛋白的浓度转换成 mole/mole 白蛋白。

$$\text{浓度}(\text{mole/mole}) = \frac{\text{浓度}(\mu\text{g/g}) \times 0.0665}{\text{脂肪酸分子量}}$$

实施例的结果显示一批按实施例 2 制备的白蛋白(图 4)和商品化的人血清白蛋白(图 5)。尽管两批蛋白的特征显示明显的区别，但无异常的脂肪酸在前者中被检测到。正如预料的，二者都显示大量加入的稳定剂，辛酸盐(C8:0)。除此之外，商品化的人血清白蛋白明显特异含有 C16:0, C16:1, C18:0,

C18:1 和 C18:2 而本发明的白蛋白主要含有 C10:0, C12:0, C16:1 并偶尔有 C14:0。进一步的实验显示, 重组人白蛋白最后产品中的 C10:0 和 C12:0 的水平与用于纯化过程后期的辛酸盐中的这些杂质的水平是一致的。

按实施例 7 生产的重组人白蛋白的数据如下:

表 11: 按本发明方法纯化的重组人白蛋白与商品化人血清白蛋白脂肪酸组成的比较

脂肪酸含量(mol/mol 蛋白质)		
脂肪酸	rHA	HSA
C10:0	0.100	0.005
C12:0	0.020	0.011
C14:0	0.005	0.017
C16:0	0.013	0.152
C16:1	0.064	0.023
C18:0	0.002	0.024
C18:1	0.012	0.145
C18:2	ND	0.089
C18:3	ND	0.006
C20:0	ND	0.001
C20:1	ND	0.001
C20:2	ND	ND
C20:4	ND	0.006
TOTAL	0.216	0.480

ND = 未检测

优选地, 总的 C18 脂肪酸的水平不超过辛酸基水平的 1.0% (mole/mole), 优选为不超过 0.5%。而且, 在本发明的白蛋白中, C18:2, C18:3 和 C20 脂肪酸的水平通常检测不到。在商品化的人血清白蛋白中, 通常每摩尔白蛋白中有 0.4 摩尔 C10 和 C20 脂肪酸。在本发明的产品中, 通常没有可检测到的 C20 脂肪酸且每摩尔白蛋白中只有约 0.01 和 0.02 摩尔的 C18 脂肪酸。显色分析 - 5% (w/v) 的最终产品的溶液在 1cm 的比色杯中, 测定在 350nm,

403nm 和 500nm 的光吸收并按每克白蛋白吸收值/升每厘米光程(即 $\text{AL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)计算。本发明的白蛋白的值如下:

波长 (nm)	平均吸收值(n = 10 批) ($\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
350	4.74×10^{-3}
403	2.12×10^{-3}
500	0.58×10^{-3}

总的说来, 本发明的白蛋白在所说的三个波长下各自的吸收值不会超过 6.0×10^{-3} , 2.5×10^3 和 0.75×10^{-3} 。

分析大量的商品化的人血清白蛋白制剂显示在这些波长下有较高的吸收值(见表 12)。

表 12: 现有技术人血清白蛋白制剂的吸收值

样品	A_{350}	A_{403}	A_{500}
1	9.95	4.10	0.8
2	9.25	5.36	1.1
3	7.40	3.26	0.6
4	7.20	3.60	0.6
5	8.68	4.08	0.8
6	11.45	6.26	1.2
7	7.20	3.70	0.8
8	6.82	4.78	1.8

SDS 还原的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行这种分析是显示重组人白蛋白是由当用一种还原剂(β -巯基乙醇)处理时在 SDS 还原的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)上以一条带(单体)迁移的单一多肽链组成。

白蛋白样品在 SDS 还原缓冲液(含有 2mM 乙二铵四乙酸, 5% (w/v) SDS 和 10(v/v) β 巯基乙醇的 20mM Tris - HCl, pH 8.0)中达 1mg/ml, 煮沸, 然后上样 1 μ l 的溶液用 SDS 均匀的(12.5%)快速胶(Phastgels)(Pharmacia)分离。蛋白带用考马斯亮蓝 R250 染色, 在 Shimadzu CS9000 光密度仪中扫描检测。白蛋白的分离显示一单一的考马斯染色带表明以单体存在的白蛋白组分至少 99.9%。

凝胶渗透高压液相色谱

本发明方法中主要的实施方案(即阴离子交换步骤是超滤和制剂之前的最后步骤)中, 将从阴离子交换基质洗脱的浓度为 10mg/ml 的白蛋白溶液 25 μ l 注入 Shimadzu LC6A 高效液相色谱的 TSK3000SWXL 柱中。发现产品为至少 99.9% 的单体。

已配制成 25% w/v 的根据本发明纯化的第二个 10mg/ml 的白蛋白 25 μ l 以同样的方式分析, 发现含有的多聚白蛋白低于 0.1%。这一结果表明这里所述的制剂对纯化的白蛋白的多聚体/聚合体含量无影响。

双向凝胶电泳

将 2 μ g 用本发明的方法制备的重组人白蛋白用 Millipore 研究系统进行双向凝胶电泳。第一向分离是 PH3-10 的等电聚焦凝胶, 然后, 用 10% 聚丙烯酰胺/SDS 进行第二向电泳。在考马斯亮染色的凝胶中, 只可见一个点, 表明只存在一种蛋白。

电子发射质谱

电子发射质谱是用 VG Quattro 电子发射质谱仪完成的, 用马心肌球蛋白(16951 Da, 购自 Sigma)校准 m/z 范围超过 950-1750 Da/e。商品化的人血清白蛋白样品和按本发明纯化的重组人白蛋白样品在分析之前通过采用含梯度三氟乙酸的乙腈的反相高效液相色谱脱盐。图 6a 和 b 分别显示本发明的白蛋白和现有技术的人血清白蛋白的质谱图。后者显示存在断裂的自由巯基和 N 末端降解。

本发明的白蛋白在本测试中可见是完全均一的, 换句话说它只显示单一明显的峰, 出现在质量约为 66441 Da 处。

长期稳定性

用电泳方法检测发现在两年内没有白蛋白的降解, 显示不存在蛋白酶的活性。

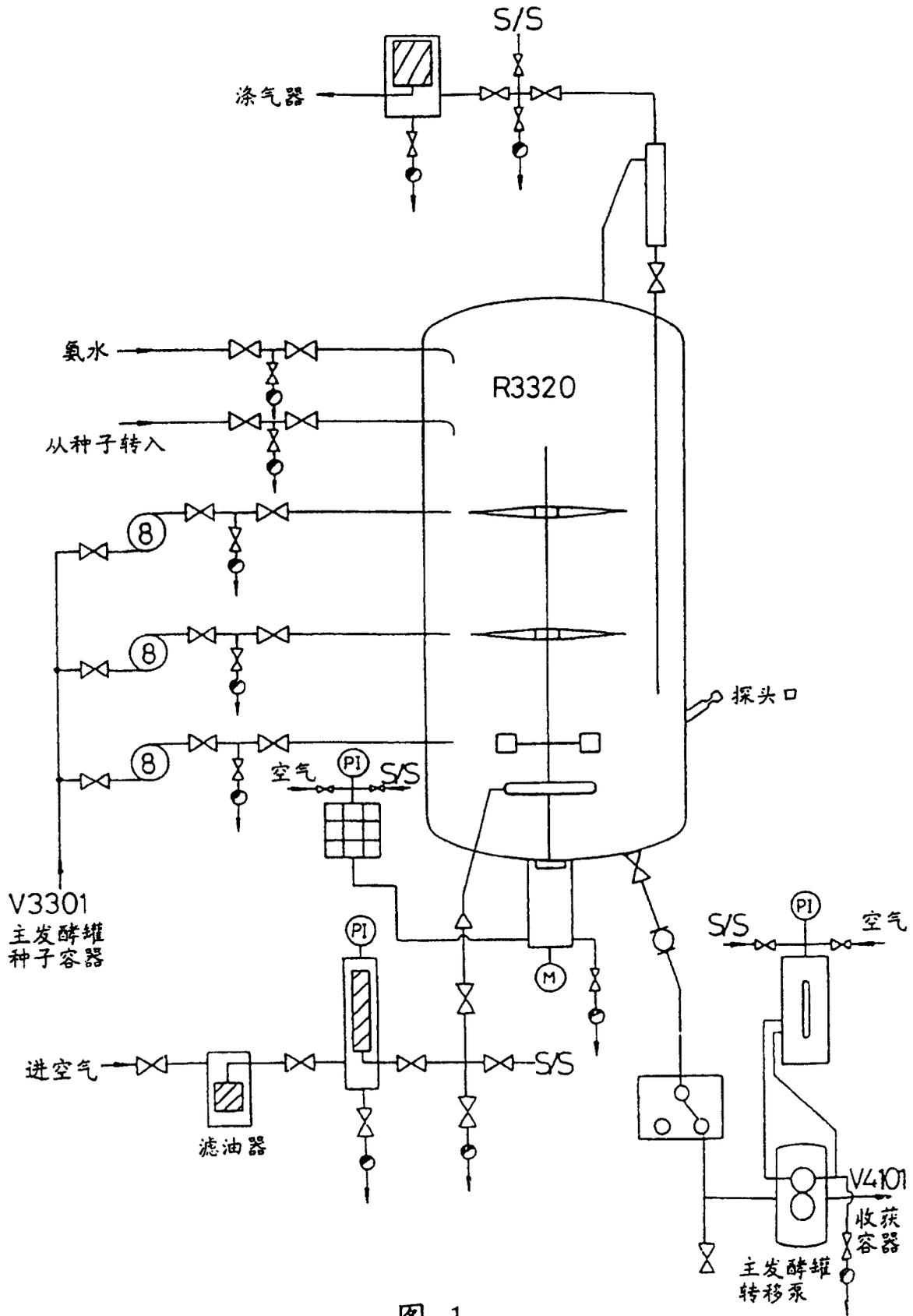


图 1

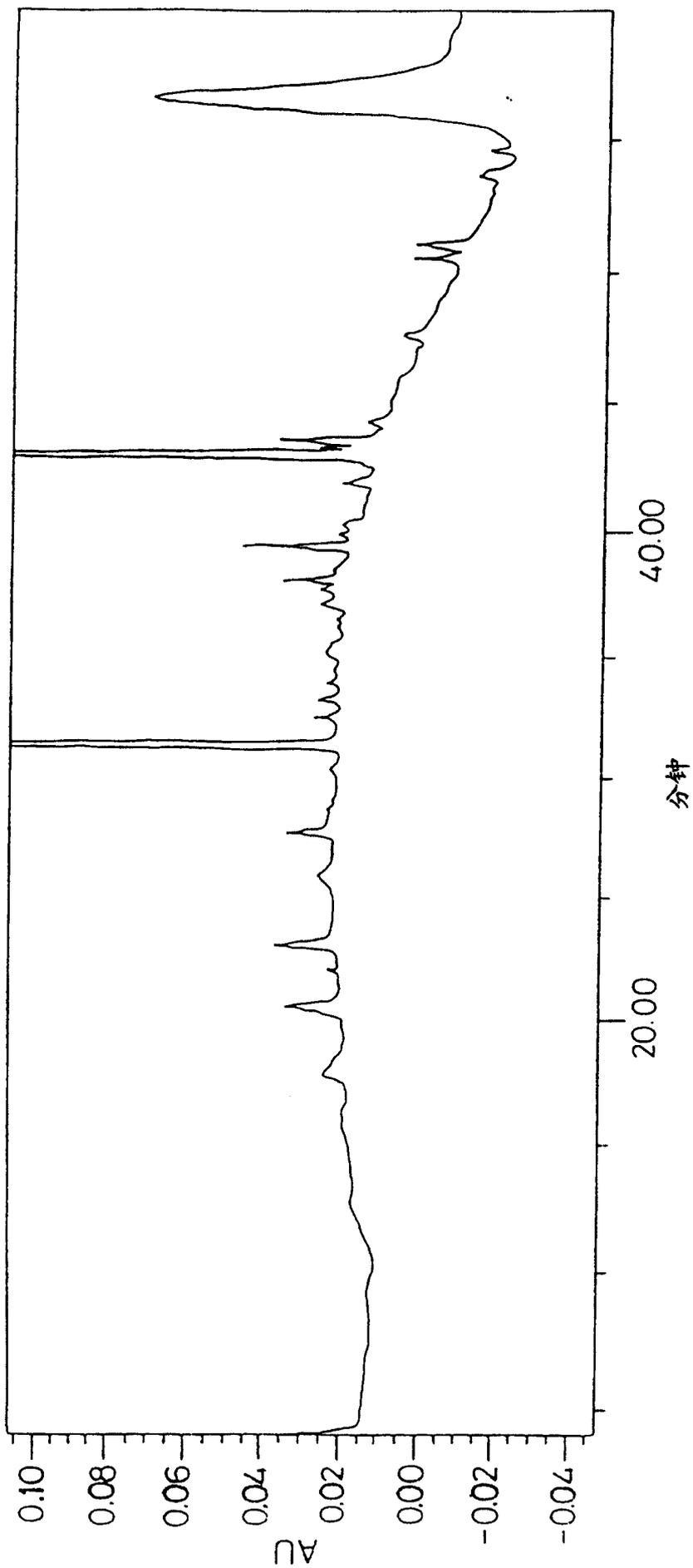


图 2

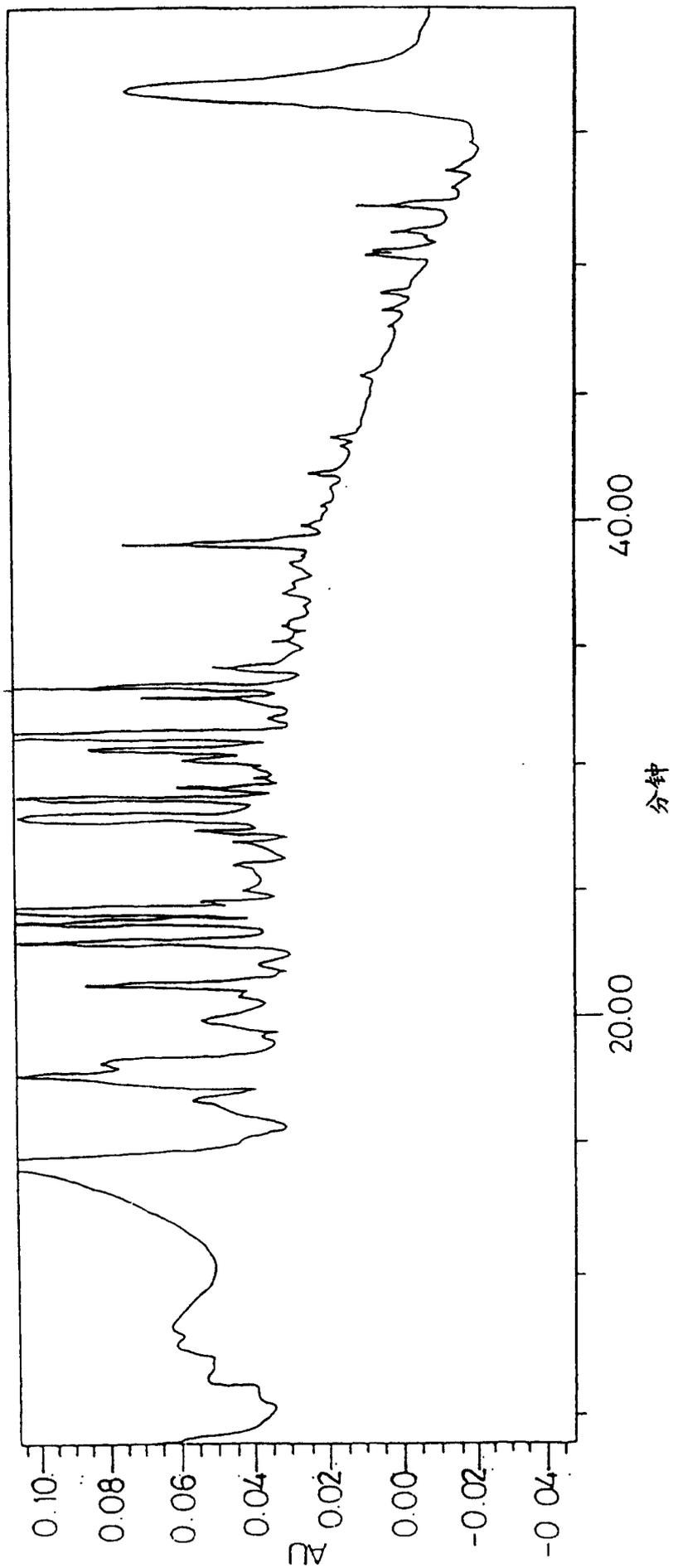


图 3

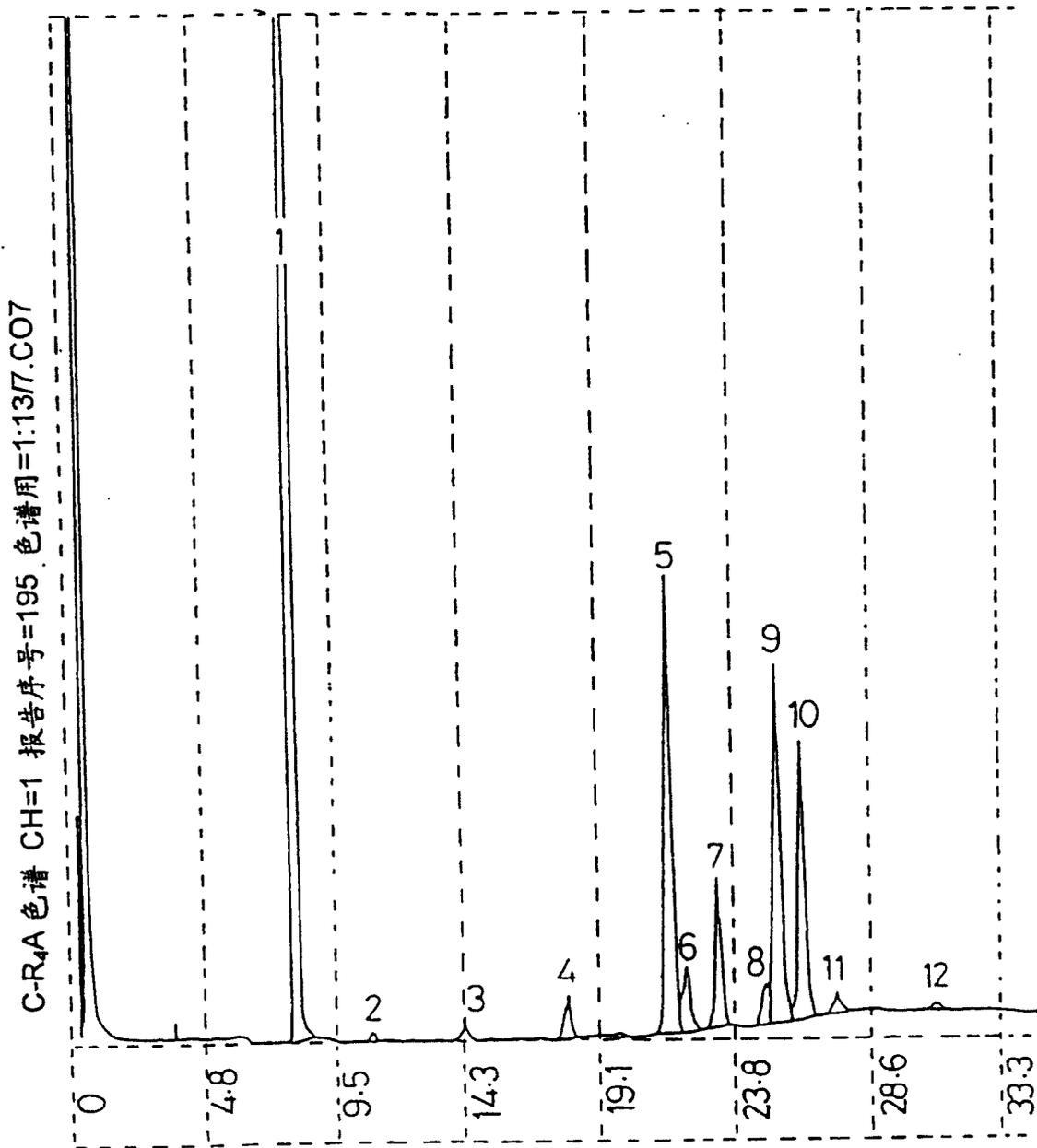


图 4

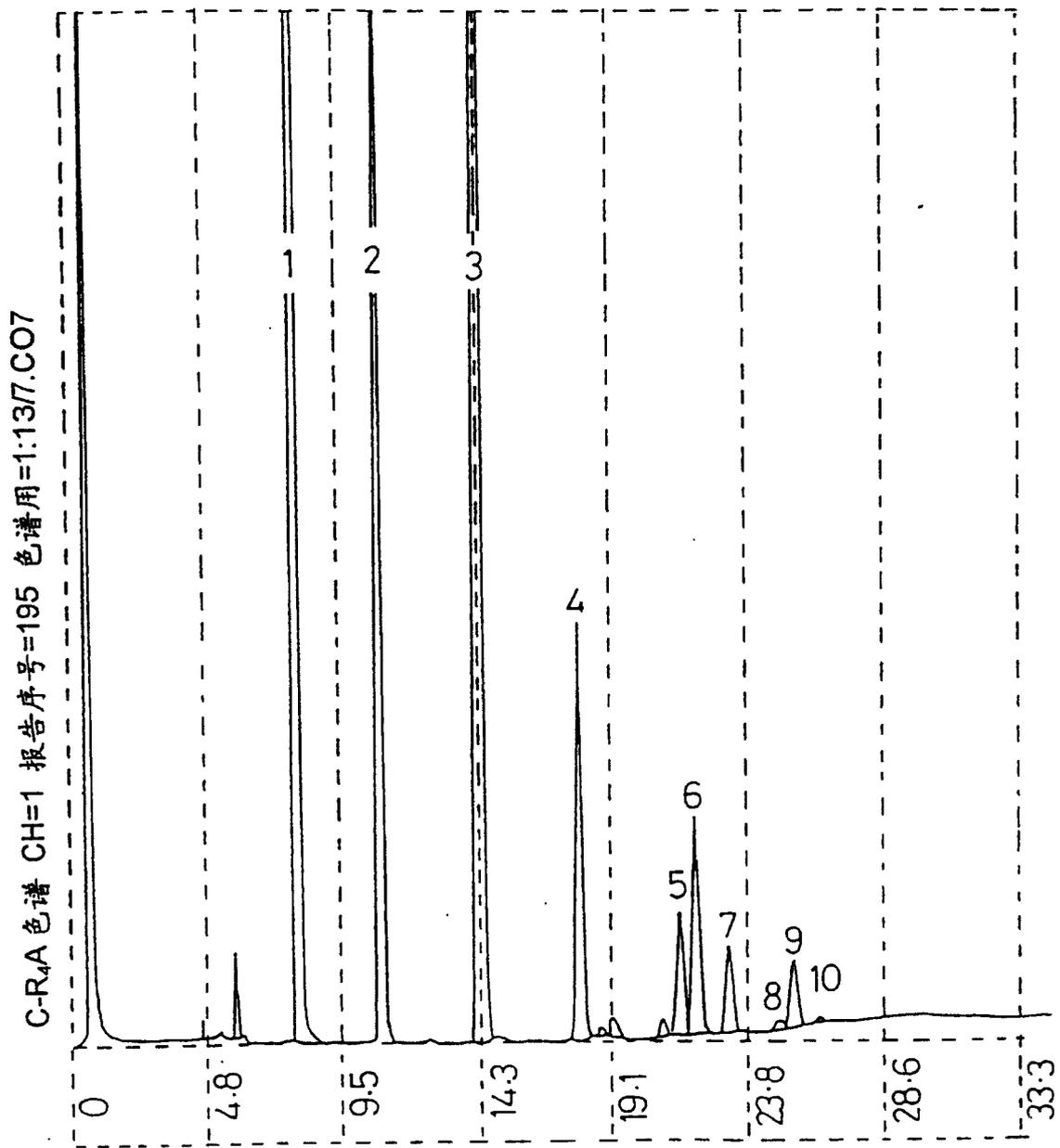
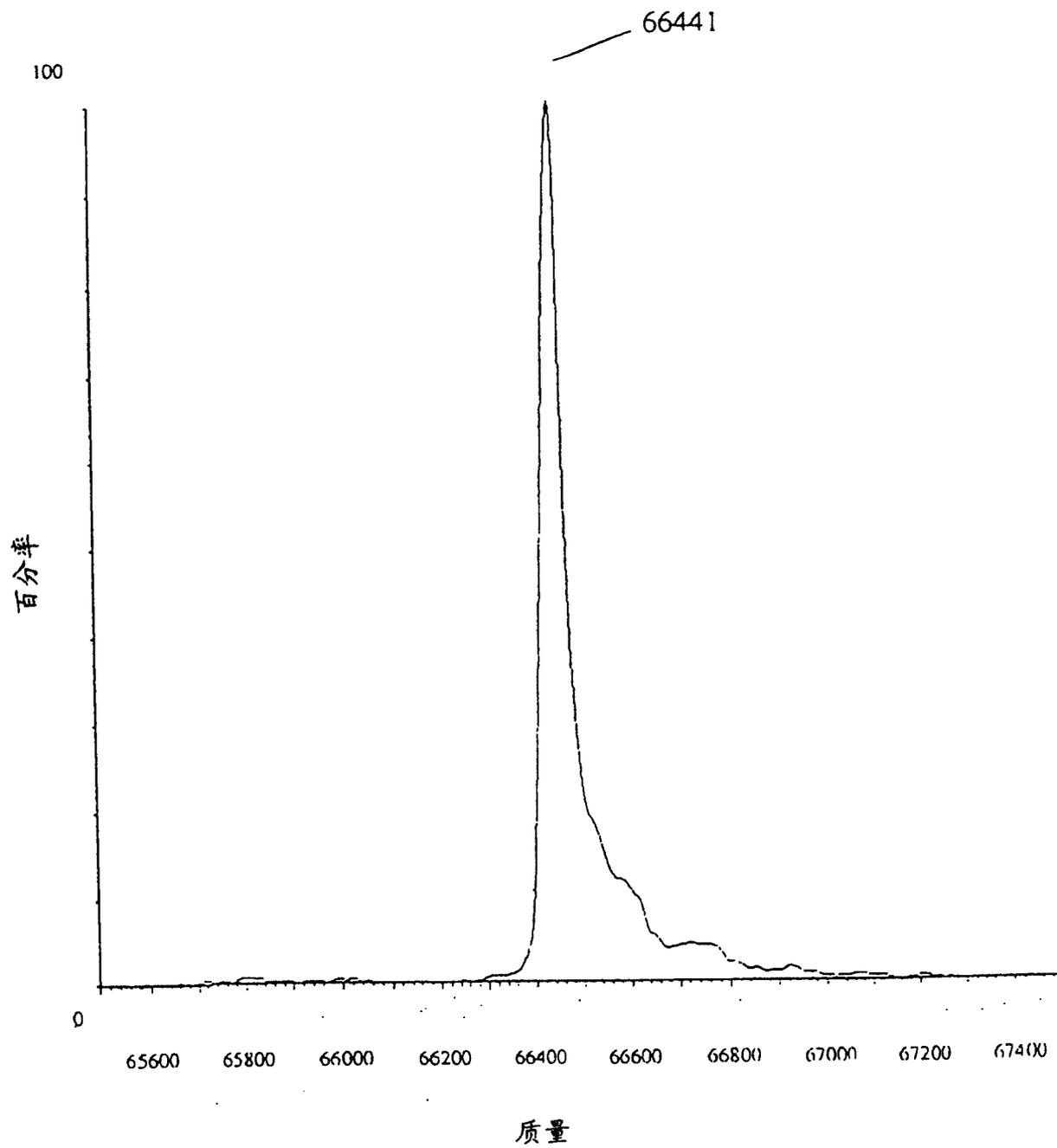
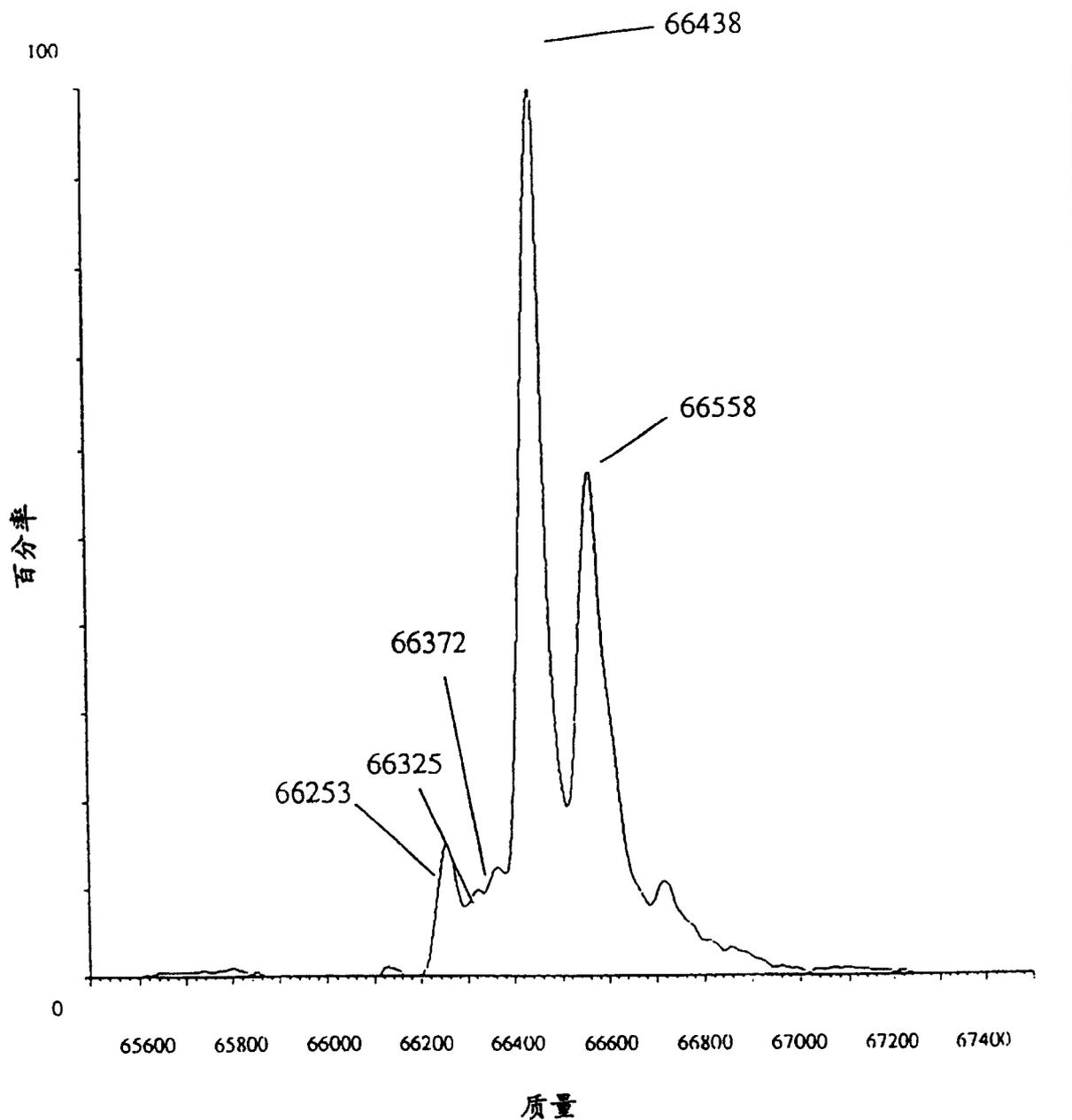


图 5



rHA 的 ESMS

图 6a



HSA 的 ESMS

图 6b