



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105315362 B

(45)授权公告日 2019.10.25

(21)申请号 201510264800.9

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

(22)申请日 2015.05.22

有限公司 11262

(65)同一申请的已公布的文献号

代理人 李平 郑霞

申请公布号 CN 105315362 A

(51)Int.CI.

C07K 14/765(2006.01)

(43)申请公布日 2016.02.10

A61K 38/38(2006.01)

(30)优先权数据

(56)对比文件

201430824 2014.05.29 ES

EP 1245217 A2,2002.10.02,

(73)专利权人 基立福有限公司

EP 1538151 A1,2005.06.08,

地址 西班牙巴塞罗纳

US 4094965 A,1978.06.13,

(72)发明人 胡安·伊格纳西奥·霍尔克拉涅托

审查员 孙雅圣娴

安娜·玛丽亚·奥尔蒂斯费尔南德斯

蒙特塞拉特·科斯塔里尔若拉

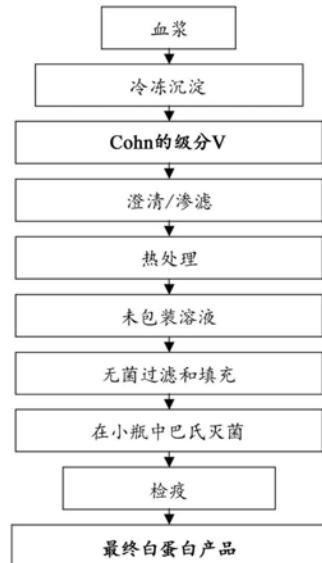
权利要求书1页 说明书7页 附图7页

(54)发明名称

用于制备具有降低的溶解氧的水平的人白蛋白的方法

(57)摘要

本发明涉及用于制备人白蛋白溶液的方法，更具体地，本发明涉及一种方法，所述方法包括降低所述白蛋白溶液中的溶解氧直到等于或小于0.5ppm的浓度的步骤。以本发明的方法，获得具有与在人血浆中存在的白蛋白的氧化还原态更接近的氧化还原态的人白蛋白的溶液是可能的。



1. 用于制备人白蛋白溶液的方法,其特征在于所述方法包括降低所述白蛋白溶液中溶解氧的步骤,其中所述氧的水平被降低至等于或小于0.5ppm的浓度。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述降低所述白蛋白溶液中溶解氧的步骤通过以惰性气体表面处理所述白蛋白溶液来进行。
3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述降低所述白蛋白溶液中溶解氧的步骤通过将惰性气体鼓泡进入所述白蛋白溶液的内部来进行。
4. 根据权利要求1至3中的任一项所述的方法,其特征在于所述白蛋白是血浆重组来源的或转基因来源的。
5. 根据权利要求1至4中的任一项所述的方法,其特征在于所述白蛋白溶液具有在约4%和25% (w/v)之间的白蛋白的浓度。
6. 根据权利要求2至5中的任一项所述的方法,其特征在于所使用的惰性气体是氮气或氦气。
7. 根据权利要求1至6中的任一项所述的方法,其特征在于所述降低所述白蛋白溶液中溶解氧的步骤在所述白蛋白溶液的巴氏灭菌的步骤之前来进行。
8. 根据权利要求1至7中的任一项所述的方法,其特征在于所述降低所述白蛋白溶液中溶解氧的步骤在所述白蛋白溶液的巴氏灭菌的步骤之后来进行。
9. 根据权利要求1至8中的任一项所述的方法,其特征在于在所述降低所述白蛋白溶液中溶解氧的步骤之后,所述白蛋白溶液被维持在惰性气体气氛中。
10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于所述惰性气体气氛是氮气的或氦气的。
11. 根据权利要求1至10中的任一项所述的方法,其特征在于所述白蛋白溶液被包装和/或被储存在由对氧不渗透的材料制成的容器中。
12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于所述对氧不渗透的材料是玻璃。
13. 组合物,所述组合物包含通过根据权利要求1至12中的任一项的方法制备的人白蛋白,其特征在于所述组合物具有等于或小于0.5ppm的溶解氧的浓度。
14. 根据权利要求13的组合物用于制备药物的用途。

## 用于制备具有降低的溶解氧的水平的人白蛋白的方法

### [0001] 描述

[0002] 本发明涉及用于制备人白蛋白溶液的方法,更具体地,本发明涉及一种方法,所述方法包括降低所述白蛋白溶液中的溶解氧直到等于或小于0.5ppm的浓度的步骤。以本发明的方法,获得具有与在人血浆中存在的白蛋白的氧化还原态更接近的氧化还原态的人白蛋白溶液是可能的。

[0003] 人白蛋白是66kDa的非糖基化的蛋白。数量上,它是最重要的血浆蛋白质并且在正常血浆中其浓度在35g/1和50g/1之间,构成总血浆蛋白的达60% (Peters T.J.:All About Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications. Academic Press, San Diego, 1996)。

[0004] 人白蛋白的结构由具有585个氨基酸的多肽组成,具有约67% $\alpha$ 螺旋,不具有 $\beta$ 折叠存在 (Otagiri M., Chuang V.T.: Pharmaceutically important pre-and posttranslational modifications on human serum albumin. Bio Pharm Bull 2009年, 32期, 527-534页)。人白蛋白包含参与17个二硫键的形成的6个甲硫氨酸残基和35个半胱氨酸残基。Cys-34是在整个分子中唯一游离的半胱氨酸。人白蛋白由于与多重配体 (multiple ligands) 结合的能力和其自由基俘获 (radical entrapment) 特性而具有特定的抗氧化功能,与多重配体结合的能力和其自由基俘获特性二者均与其结构紧密相关。

[0005] 尽管存在氧化白蛋白的许多可能性,但是Cys-34是对氧化/还原特别地敏感的位点。因此,通常,在Cyst-34的方面谈及白蛋白的氧化还原态是合理的。根据Cys-34的氧化还原态,通过白蛋白的层析分离,获得三种级分 (Peters, 1996, 同前) :

[0006] (i) 还原形式,其中半胱氨酸是以游离的硫醇基的形式,被称为人巯基白蛋白 (human mercaptoalbumin, HMA) ;

[0007] (ii) 氧化形式,其中半胱氨酸与小的硫醇化合物,主要是半胱氨酸或半胱氨酰甘氨酸形成二硫键,尽管也与高半胱氨酸和谷胱甘肽形成二硫键,被称为人非巯基白蛋白1 (human non-mercaptopoalbumin 1, HNA1) ; 以及

[0008] (iii) 最高氧化形式,其中半胱氨酸是亚磺酸或磺酸,被称为人非巯基白蛋白2 (human non-mercaptopoalbumin 2, HNA2) 。

[0009] 在健康人中,约50-69%的总白蛋白呈HMA的形式,27-42%呈HNA1的形式,以及3-5%呈HNA2的形式 (Oettl K., 等人Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. Biochim. Biophys. Acta 2008年, 1782期, 469-473页; Oettl K. 和 Marsche G. Redox State of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease. Methods Enzymol. 2010年, 474期, 181-195页; 以及 Oettl K., 等人Oxidative albumin damage in chronic liver failure: Relation to albumin binding capacity; liver dysfunction and survival. J Hepatol, 2013年, 59期, 978-983页)。通常人们相信 HMA 氧化成 HNA1 是可逆的过程,而 HMA 氧化成 HNA2 是不可逆的过程。

[0010] 白蛋白在体内和在产生治疗性白蛋白而使用的方期间,可以经历多种结构的修改,导致其构象的修改,并且结果是,结合特性与其氧化还原态一起的修改 (Oettl, K. 等人,

2010年,同前)。

[0011] 在用于获得纯化的蛋白的人血浆的分级分离中通常使用的方法,其中被用于发现白蛋白的是Cohn法(Cohn E.J.等人,‘Preparation and properties of serum plasma proteins, IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids.J.Am.Chem.Soc.1946年,68期,459-475页),或其较小的修改。

[0012] Cohn法以人血浆开始,对其进行沉淀和分离的相继步骤。在各自步骤中,获得富含血浆蛋白之一的沉淀物和倾析上清液(decantation supernatant)。为实现沉淀相继的Cohn级分(级分I、级分II+III、级分IV和级分V),以改变不同蛋白质的溶解度的目的,需要修改溶液的参数,例如,尤其是, pH、介电常数、温度、蛋白质浓度和离子强度。此外,应该指出的是所述Cohn级分包含递增浓度的乙醇。结果,包含在级分IV的上清液中的白蛋白以约40% (v/v) 乙醇被沉淀,并且继续形成级分V的浆体(paste)的部分。

[0013] 在获得级分V之后,将后者重悬在溶液中并且对其进行不同步骤直到获得最终产物。习惯地,这些步骤包括:透析过滤、热处理、灭菌、装入小瓶、以及所述小瓶的最终巴氏灭菌,随后通常在30-32°C不少于14天的时间段期间,提交所述小瓶检疫(quarantine),目的是保证最终产品的无菌。

[0014] 本发明人已经发现,在从人血浆开始的获得白蛋白溶液的过程期间,白蛋白遭受对Cys-34的氧化还原态的修改。这些修改从根本上发生在氧存在的储存期间,藉此它们本质上按照检疫步骤被检测。在若干生产批次(n=7)中,已经发现HMA、HNA1和HNA2的水平分别是40-53%、39-44%和7-16% (w/v),并且结果,HMA和HNA2的水平主要地不同于在健康人中描述的那些(Oettl K. 2008、2010和2013,同前)。这由于,例如,在HNA2的情形中,如上文中陈述的向HNA2的氧化是不可逆的过程的事实,而可以是显著重要的。

[0015] 令人意外地,发明人已经发现,通过在产生人白蛋白溶液过程中加入包括降低溶液中的溶解氧的步骤,其中氧的水平被降至等于或小于0.5ppm的浓度,实现Cys-34的氧化的降低,获得的白蛋白的氧化还原态与在血浆中存在的白蛋白的氧化还原态非常相似。这导致以下事实:获得的白蛋白的特性,例如,其抗氧化特性,与在血液中存在的白蛋白的那些特性更相似,这可以导致在其许多应用中其治疗功效的改进。

[0016] 因此,本发明揭示了用于制备人白蛋白溶液的方法,其特征在于它包括降低所述白蛋白溶液中溶解氧的步骤,其中所述氧的水平被降低至等于或小于0.5ppm的浓度。优选地,在降低白蛋白溶液中溶解氧的步骤之后,所述白蛋白溶液被维持在惰性气体气氛中。

[0017] 所述降低白蛋白溶液中溶解氧的步骤可以以本领域目前已知的多种方式来进行。优选地,白蛋白溶液的表面处理可以以惰性气体来实现或惰性气体可以被鼓泡进入所述白蛋白溶液的内部。在本发明的方法中使用的所述惰性气体可以是氮气、氦气或类似的气体。

[0018] 本发明的方法可以被用于获得具有在约4% 和25% (w/v) 之间的白蛋白浓度的白蛋白溶液。优选地,获得的白蛋白是治疗性白蛋白。

[0019] 此外,本发明的白蛋白可以是以重组的形式或转基因的形式获得的白蛋白。重组的白蛋白或转基因的白蛋白的分子在其氨基酸的序列方面与人白蛋白相同,它不存在糖基化并且,以它是功能性的目的,它必须展示与人血浆来源的白蛋白相同的构象折叠。如果不是这样,除了由所述差异引起的其他可能副反应以外,由于免疫原性的危险它不能被向人

施用。

[0020] 降低本发明的白蛋白溶液中的溶解氧的步骤可以在所述白蛋白溶液的巴氏灭菌步骤之前或之后被实行,或此外,尽管所述白蛋白溶液的巴氏灭菌步骤不被实现,它也可以不依赖于制备最初的白蛋白溶液的过程而被执行。

[0021] 为获得通过本发明的方法获得的白蛋白溶液中Cys-34的氧化还原态方面更好的结果,优选地,在降低白蛋白溶液中溶解氧的步骤之后,所述白蛋白溶液被维持在惰性气体气氛中。所述惰性气体气氛可以是氮气、氦气或类似的气体。

[0022] 尽管利用通过本发明的方法获得的白蛋白被包装和/或储存在其中的那些中的任何容器是可能的,优选的是所述容器是由对氧不渗透的材料制成,更优选的是由玻璃制成。

[0023] 本发明的另一目的是揭示组合物和其作为药物的用途,所述组合物包含通过本发明的方法制备的人白蛋白。

[0024] 最后,本发明揭示了包含根据上文中描述的方法制备的白蛋白的组合物用于制备药物的用途。

[0025] 本发明关于实施例和比较实施例更详细地在下面被描述,所述实施例和比较实施例不构成本发明的限制。此外,对附图进行参考,其中:

[0026] 图1显示了在现有技术中利用的从血浆获得治疗性人白蛋白的方法的示意图。

[0027] 图2显示了白蛋白的Cys-34的HMA、HNA1和HNA2形式的浓度的图,表示为在本发明之前的现有技术中利用的方法的多个步骤中通过色谱分析法获得的峰的高度:(□)来自健康供体的血浆(n=59);(★)来自冷冻沉淀法的上清液(n=3);(⊕)稳定剂加入之前和热处理之前的白蛋白溶液(n=3);(●)具有稳定剂和热处理之前的白蛋白溶液(n=1);(■)具有稳定剂和热处理之后的白蛋白溶液(n=1);(◆)无菌过滤之前的20%白蛋白溶液(n=3);(▲)无菌20%白蛋白溶液并且在最终的容器中(n=4);(▼)在最终的容器中并且未检疫的巴氏灭菌的20%白蛋白溶液(n=4);和(○)最终的20%白蛋白产品(n=7);其中n表示分析的批次的数目。

[0028] 图3显示了白蛋白的Cys-34的HMA、HNA1和HNA2形式的浓度的图,表示为利用本发明之前的现有技术的方法在多个步骤中通过色谱分析法获得的峰的高度:(▲)无菌的25%白蛋白溶液并且在最终的容器中(n=1);(▼)巴氏灭菌的未检疫的25%白蛋白溶液(n=1);和(●)25%最终的白蛋白产品(n=1);(△)无菌的5%白蛋白溶液并且在最终的容器中(n=1);(▼)在最终的容器中并且未检疫的巴氏灭菌的5%白蛋白溶液(n=1);以及(●)最终的5%白蛋白产品(n=1);其中n表示分析的批次的数目。

[0029] 图4显示了白蛋白的Cys-34的HMA、HNA1和HNA2形式的浓度的图,表示为利用本发明的方法在多个步骤中通过色谱分析法获得的峰的高度,其中在巴氏灭菌之前使用以气态氮表面处理的步骤:(▲)无菌的20%白蛋白溶液并且在最终的容器中(n=3);(▼)在最终的容器中并且未检疫的巴氏灭菌的20%白蛋白溶液(n=3);和(○)最终的20%白蛋白产品(n=3);其中n表示分析的批次的数目。

[0030] 图5显示了白蛋白的Cys-34的HMA、HNA1和HNA2形式的浓度的图,表示为利用本发明的方法在多个步骤中通过色谱分析法获得的峰的高度,其中在巴氏灭菌之前使用将气态

氮鼓泡进入白蛋白溶液的处理的步骤: (▲) 无菌的20%白蛋白溶液并且在最终的容器中 (n=3); (▼) 在最终的容器中并且未检疫的巴氏灭菌的20%白蛋白溶液 (n=3); 和 (○) 最终的20%白蛋白产品 (n=3); 其中n表示分析的批次的数目。

[0031] 图6显示了白蛋白的Cys-34的HMA、HNA1和HNA2形式的浓度的图, 表示为利用本发明的方法在多个步骤中通过色谱分析法获得的峰的高度, 其中在巴氏灭菌之前使用以气态氮表面处理的步骤: (▲) 未包装的无菌的25%白蛋白溶液 (n=1); (▼) 巴氏灭菌的并且未检疫的25%白蛋白溶液 (n=1); 和 (○) 最终的25%白蛋白产品 (n=1); (▲) 无菌的5%白蛋白溶液并且在最终的容器中 (n=1); (▼) 在最终的容器中并且未检疫的巴氏灭菌的5%白蛋白溶液 (n=1); 以及 (○) 最终的5%白蛋白产品 (n=1); 其中n表示分析的批次的数目。

[0032] 图7显示了白蛋白的Cys-34的HMA、HNA1和HNA2形式的浓度的图, 表示为利用本发明的方法在多个步骤中通过色谱分析法获得的峰的高度, 其中在巴氏灭菌之前使用以气态氮表面处理的步骤: (▲) 无菌的25%白蛋白溶液并且在最终容器中 (n=1); (▼) 在最终的容器中并且未检疫的巴氏灭菌的25%白蛋白溶液 (n=1); 和 (○) 最终的25%白蛋白产品; 其中n表示分析的批次的数目。

## 实施例

[0033] 实施例1: 根据现有技术用于获得白蛋白的方法

[0034] 根据Cohn的方法 (Cohn E.J. 等人, 1946, 同前) 对从健康供体获得的人血浆进行沉淀和分离的相继的步骤, 从获得最初的冷冻沉淀上清液直到实现级分V的沉淀 (见图1)。将Cohn的级分V悬浮在冷的注射用水 (water for injection, WFI) 中, 将它调整至pH 7.0并且通过深度过滤器 (in-depth filter) 澄清。澄清的溶液, 应用由一价离子的盐 (氯化钠) 形成的透析溶液并且维持温度在5°C, 以恒定的体积被渗滤 (diafilter) (图1, 澄清/渗滤步骤)。辛酸钠和N-乙酰色氨酸作为稳定剂加入至渗滤的溶液。对所述溶液进行在60°C加热处理 (图1, 热处理步骤)。随后, 热处理的溶液用WFI稀释或浓缩为期望的最终蛋白质的期望的浓度的函数 (例如, 5%、20%或25% (w/v)) (图1, 未包装的溶液)。最终溶液然后以无菌的方式 (0.22μm过滤器) 过滤并且在无菌区进行最终无菌容器的填充 (图1, 无菌过滤和填充步骤)。在最终容器中的溶液在60°C加热不少于10h (图1, 在小瓶中巴氏灭菌步骤)。最后, 小瓶在30-32°C孵育不少于14天 (图1, 检疫步骤)。在所述时间段之后, 小瓶被目视检查以弃去任何微生物污染的指征 (图1, 最终白蛋白产品)。

[0035] 基于由Oettl K., 2010, 同前描述的方法和如下面详细描述的, 来自获得白蛋白的过程的不同步骤的白蛋白样品的氧化态 (图2) 通过高效液相色谱 (HPLC) 被分析。

[0036] 在0.3M氯化钠、0.1M磷酸钠pH 6.87的缓冲液中将在研究中的白蛋白的样品稀释成6.5mg/ml的浓度, 并且将5μl样品以1.0ml/min流速注射进入Shodex Asahipak ES-502N DEAE阴离子交换柱 (7.5×100mm, Shodex, 日本)。按照利用50mM乙酸钠和400mM硫酸钠梯度, 在pH 4.85执行其洗脱, 直到在35°C在1.0ml/min恒定流速下达到6%乙醇, 实现根据其氧化态将白蛋白样品分离成三种级分 (HMA、HNA1和HNA2)。

[0037] 洗脱的前5分钟在不存在乙醇下来进行。在接下来的5-35分钟, 乙醇的浓度以线性方式升高至6%, 随后在另外的5分钟期间维持其恒定。最终, 从第40至45分钟, 乙醇的浓度

再次降至0%。没有乙醇再5分钟后,可以分析下一样品。

[0038] 分别利用280nm和340nm的激发波长和发射波长,将三种白蛋白级分作为其氧化态的函数的检测通过荧光来进行。考虑在对应的色谱图中获得的感兴趣的每一个峰的高度而进行白蛋白的Cys-34的HMA、HNA1和HNA2形式的浓度的定量。

[0039] 图2显示了在获得现有技术的白蛋白的过程期间,来自不同步骤的人血清白蛋白的样品的氧化态的改变。数据显示HNA1和HNA2形式的升高不利于HMA形式,尤其在以巴氏灭菌、随后检疫的步骤之后(最终的20%白蛋白产品)。在以现有技术的方法来自人血浆的纯化的5%和25%白蛋白浓度中,在巴氏灭菌和检疫的步骤之后的白蛋白的氧化态的性能(图3)等同对在相同的技术之后的最终的20%白蛋白产品观察到的性能(图2)。在两个图中,获得的数据显示HNA1和HNA2形式的升高不利于HMA形式,尤其,在以巴氏灭菌、随后检疫的步骤之后。

[0040] 实施例2:利用在巴氏灭菌之前利用以氮气表面处理的步骤获得本发明的白蛋白的方法。

[0041] 用于获得本发明的白蛋白的方法与在实施例1中描述的方法对应,还包括降低白蛋白溶液中溶解氧的步骤,如以下描述的。

[0042] 在最终容器中获得无菌溶液之后(图1,无菌过滤和填充步骤),并且以取代在容器的内部存在的氧的目的,进行以氮气的表面处理,将两个皮下注射针(是商业类型的,Braun Sterican 21G x 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub>”,0.80x 40mm,德国,或类似的)插入小瓶的氯化丁基橡胶塞,所述皮下注射针连接至两个0.22μm PVDF过滤器(是商业类型的,Millex GV Millipore,0.22μm, PVDF,13mm过滤器,美国,或类似的),避免针与白蛋白溶液接触。针的一个被预定为氮气的入口并且另一个为其出口,具有防止容器中压力过高的目的。以表面氮气处理在室温下执行两小时,维持氮气的恒定流,具有允许观察容器中液体运动,而它在容器中不飞溅的目的。

[0043] 完成以氮气的表面处理后,继续如在实施例1中描述的从人血浆获得白蛋白的方法(图1,在小瓶中巴氏灭菌步骤),直到获得最终白蛋白产品。以如实施例1中相同的方式,通过阴离子交换色谱法分析以本发明的技术获得的20%浓度样品的氧化态。具体地,分析了经历在巴氏灭菌之前以氮气表面处理的步骤的白蛋白的样品、在巴氏灭菌之后和检疫之前的白蛋白的样品以及检疫时间段之后的白蛋白的样品。图4显示了获得的结果,观察到以现有技术的用于获得白蛋白的方法,在图2和图3中,HMA形式没有降低,HNA1和HNA2形式没有升高。

[0044] 除了氧化态的分析,在以氮气表面处理之后进行测量样品中存在的溶解氧,结果是在所有情况下溶解氧的浓度等于或小于0.5ppm。

[0045] 测定在室温下通过使用用于测量溶解氧的探针(是商业类型的,HI9828Multiparameter Meter,Hanna Instruments,美国)进行。具体地,具有预先地经历以氮气表面处理的白蛋白溶液的容器在具有氮气气氛的小隔间(cubicle)的内部打开,并且用于测量样品中氧的探针被立即浸入。使用的探针,其功能基于原电池的原理,包括银(Ag)正极,所述银正极套有功能为负极的铂(Pt)线。将前述装配物插进充满氯化钾电解溶液的防护罩,其在其末端具有Teflon<sup>®</sup>膜,一种允许在溶液中存在的氧通过,但不允许溶液自身通过的能透过氧的材料。通过施加790mV电势,在细胞中存在的氧在阴极被还原为氢氧

离子(OH<sup>-</sup>)，并且氯化银在正极沉淀。此反应带来具有与样品中存在的氧的量成比例的强度的电流。然后仪表将测量的电流转化成对应的溶解氧的浓度。

[0046] 实施例3:利用在巴氏灭菌之前将氮气鼓泡进入溶液的步骤获得本发明的白蛋白的方法。

[0047] 用于获得本发明的白蛋白的方法与在实施例1中描述的方法对应，并包括下面描述的步骤。在最终容器中获得无菌溶液之后(图1,无菌过滤和填充步骤)，并且以取代在容器的内部存在的氧的目的，通过将两个皮下注射针(是商业类型的，Braun Sterican 21G x 1<sup>1/2</sup>”，0.80x 40mm,德国,或类似的)插入小瓶的氯化丁基橡胶塞执行氮气鼓泡的处理，所述皮下注射针连接至两个0.22μm PVDF过滤器(是商业类型的，Millex GV Millipore,0.22μm, PVDF, 13mm过滤器,美国,或类似的)。将被预定为氮气的入口针，腰椎穿刺针(是商业类型的，Terumo Spinal Needle,18G x 3<sup>1/2</sup>”，1.20x 90mm,日本,或类似的)，浸入白蛋白溶液中，并且将避免与液体接触而定位的皮下注射针(是商业类型的，Braun Sterican 21G x 1<sup>1/2</sup>”，0.80x 40mm,德国,或类似的)，预先指定为其出口，具有防止在容器中压力过高的目的。将氮气鼓泡的处理在室温下执行两小时，维持氮气的恒定流，具有允许观察液体中小气泡的目的。

[0048] 完成将氮气鼓泡的处理后，继续如在实施例1中描述的用于从人血浆获得白蛋白的方法(图1,在小瓶中巴氏灭菌步骤)，直到获得最终白蛋白产品。

[0049] 以如实施例1和实施例2中相同的方式，通过本发明的技术获得的20%白蛋白浓度的样品的阴离子交换色谱法分析氧化态。具体地，分析在巴氏灭菌的步骤之前经历将氮气鼓泡的步骤的白蛋白的样品、在巴氏灭菌之后和检疫之前的白蛋白的样品以及检疫时间段之后的白蛋白样品。图5显示了获得的结果，这些与利用在巴氏灭菌之前以氮气表面处理的步骤的图4中获得的那些结果是类似的。观察到以现有技术的用于获得白蛋白的方法，在图2和图3中，HMA形式没有降低，HNA1和HNA2形式没有升高。

[0050] 在这种情况下，以如实施例2中的相同的方式进行在将氮气鼓泡处理之后样品中存在的溶解氧的测量，结果是在所有情况下，溶解氧的浓度等于或小于0.5ppm。

[0051] 实施例4:利用在巴氏灭菌之前以氮气表面处理的步骤的用于获得本发明的白蛋白的方法，应用于白蛋白的不同最终的浓度。

[0052] 用于获得本发明的白蛋白的方法与在实施例2中描述的方法对应，应用于例如，5和25%的白蛋白的其他浓度。以如实施例2中相同的方式，通过阴离子交换色谱法分析以本发明技术获得的5和25%浓度的白蛋白的样品的氧化态。具体地，分析经历在巴氏灭菌之前以氮气表面处理的步骤的5和25%白蛋白的样品、在巴氏灭菌之后和检疫之前的5和25%白蛋白的样品以及检疫时间段之后的5和25%白蛋白的样品。图6显示了获得的结果，这些与对于在20%的浓度的白蛋白的图4中获得的那些结果是类似的。观察到以用于获得现有技术的白蛋白的方法，在图2和图3中，HMA形式没有降低，HNA1和HNA2形式没有升高。

[0053] 此外，进行氧化态的分析、在以氮气表面处理之后的样品中存在的溶解氧的测量，结果是在所有情况下溶解氧的浓度等于或小于0.5ppm。

[0054] 实施例5:利用在巴氏灭菌之前以氦气表面处理的步骤用于获得本发明的白蛋白的方法。

[0055] 用于获得本发明的白蛋白的方法与在实施例1中描述的方法对应，并包括以下描

述的步骤。在最终容器中获得无菌溶液之后(图1,无菌过滤和填充步骤),并且以取代在小瓶中剩余的空气室中存在的氧的目的,进行以氦气的表面处理,将两个皮下注射针(是商业类型的,Braun Sterican 21G x $1\frac{1}{2}$ ”,0.80x 40mm,德国,或类似的)插入氯化丁基橡胶塞,所述皮下注射针连接至两个0.22μm PVDF过滤器(是商业类型的,Millex GV Millipore,0.22μm,PVDF,13mm过滤器,美国,或类似的),避免针与白蛋白溶液接触。针的一个被预定为氦气的入口并且另一个为其出口,具有防止在容器中压力过高的目的。以表面氦气处理在室温下执行两小时,维持氦气的恒定流,具有允许观察容器中液体运动的目的,而它在容器中不飞溅。

[0056] 完成以氦气的表面处理后,继续如在实施例1中描述的用于从人血浆开始获得白蛋白的方法(图1,在小瓶中巴氏灭菌步骤),直到获得最终白蛋白产品。

[0057] 以如实施例1至4中相同的方式,通过阴离子交换色谱法分析以本发明的技术获得的白蛋白的样品的氧化态。具体地,分析在巴氏灭菌之前经历以氦气表面处理的步骤的白蛋白的样品、在巴氏灭菌之后和检疫之前的白蛋白的样品以及检疫时间段之后的白蛋白的样品。图7显示了获得的结果,这些结果与利用在巴氏灭菌之前以氮气表面处理的步骤的在图4和图6中获得的那些结果是类似的,并且也与利用在巴氏灭菌之前将氮气鼓泡进入溶液的步骤的图5中获得的那些结果是类似的。观察到以现有技术的用于获得白蛋白的方法,在图2和图3中,HMA形式没有降低,HNA1和HNA2形式没有升高。

[0058] 在此情况下,以如实施例2中同样的方式进行在通过鼓泡氦气的处理之后测量样品中存在的溶解氧,结果是在所有情况下溶解氧的浓度等于或小于0.5ppm。

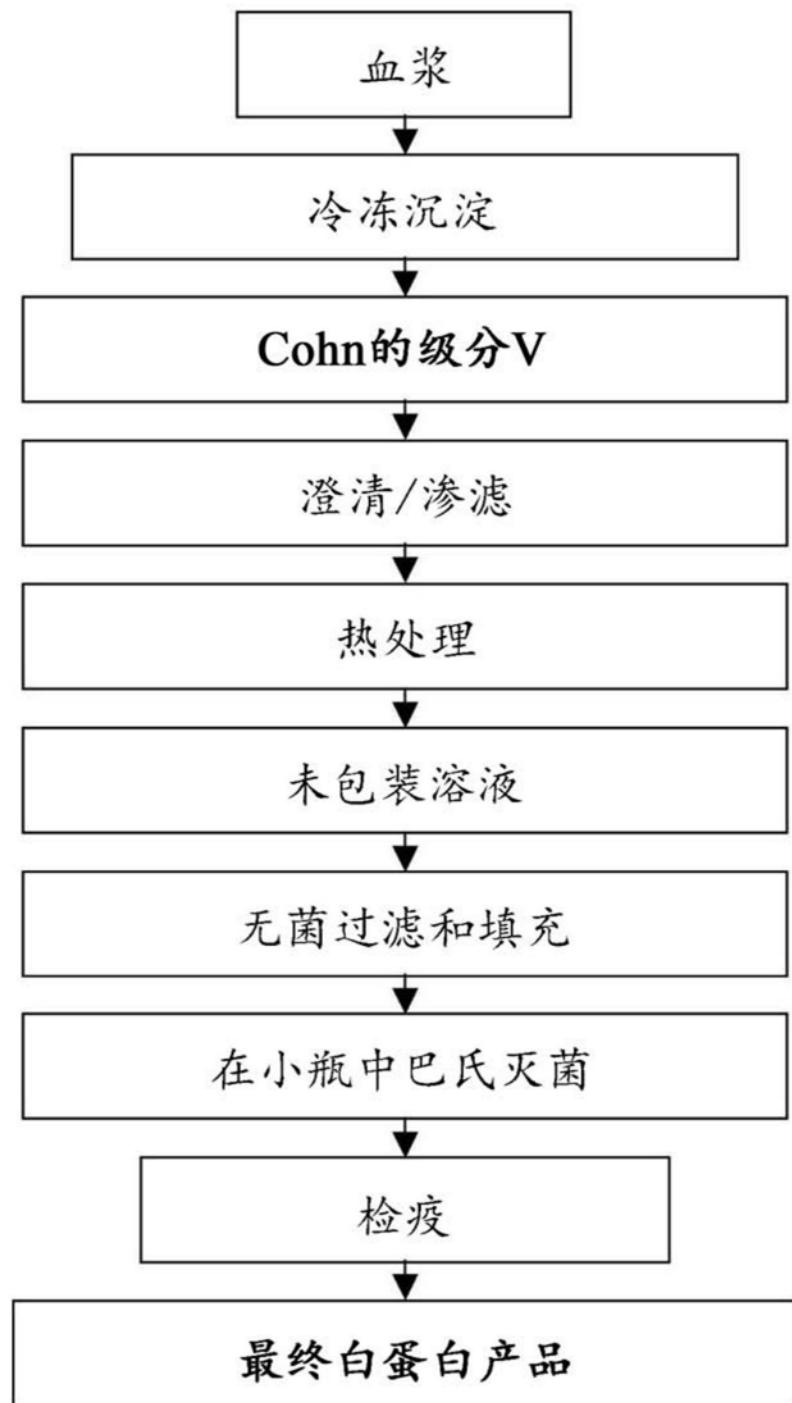


图1

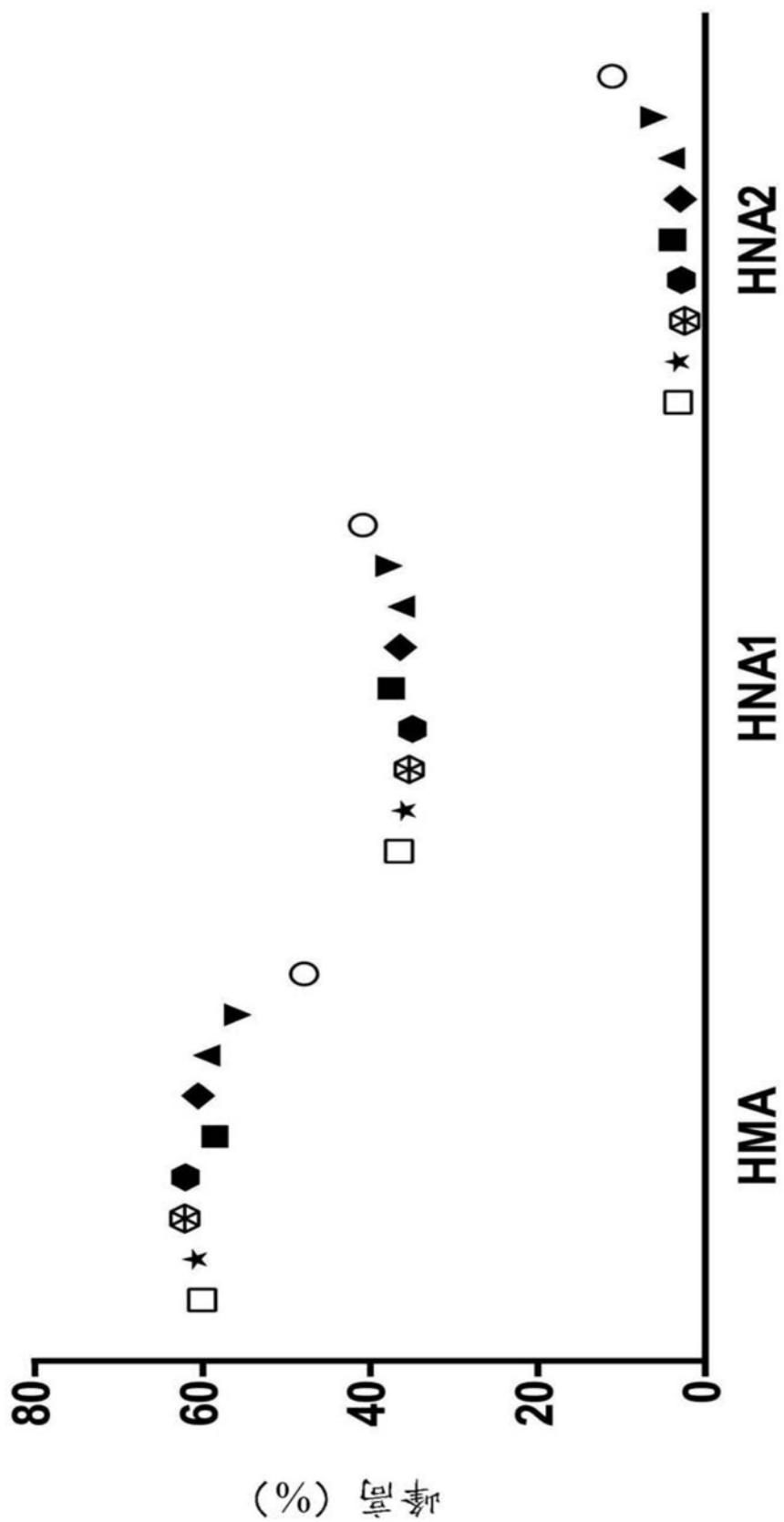


图2

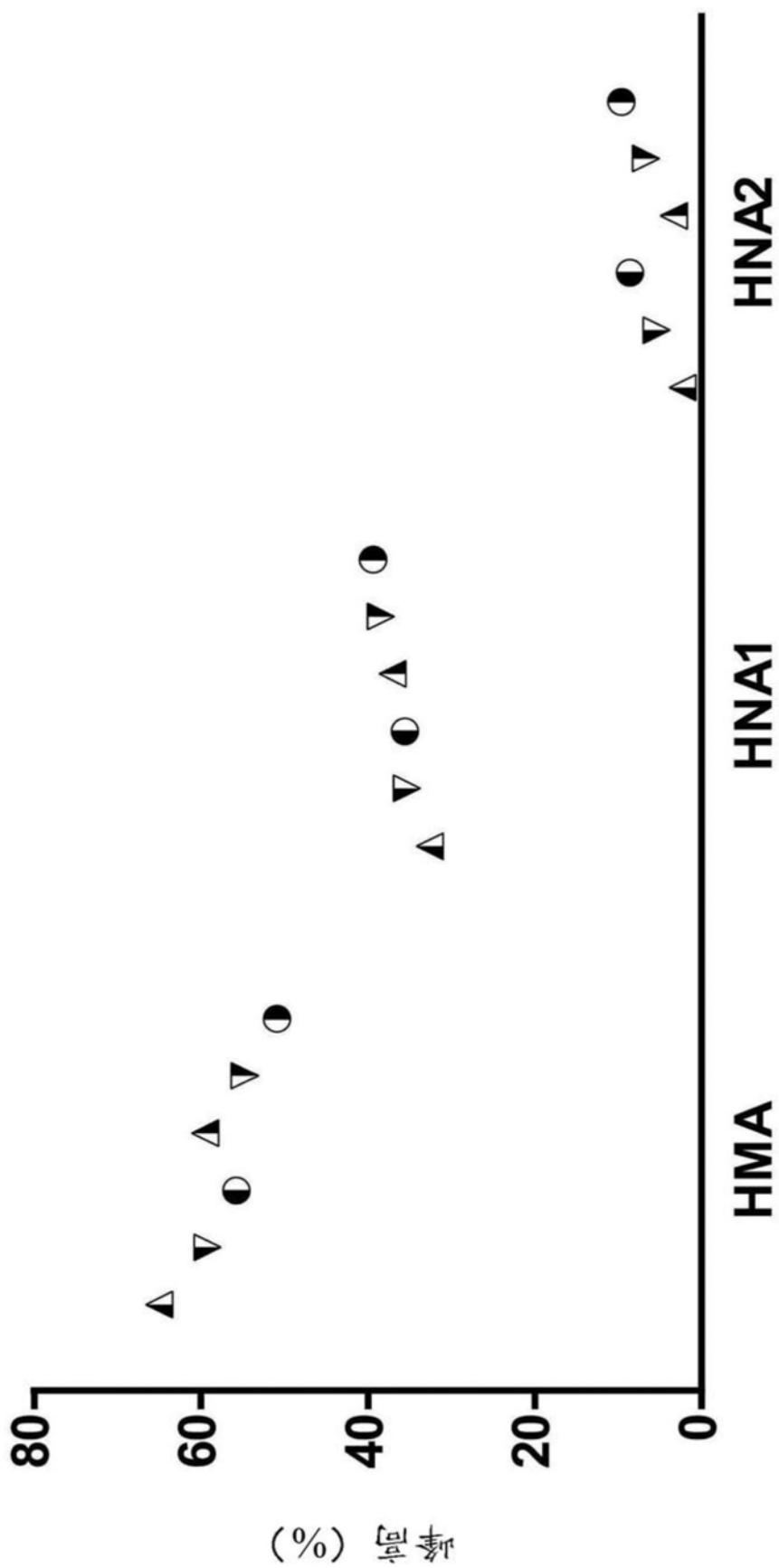


图3

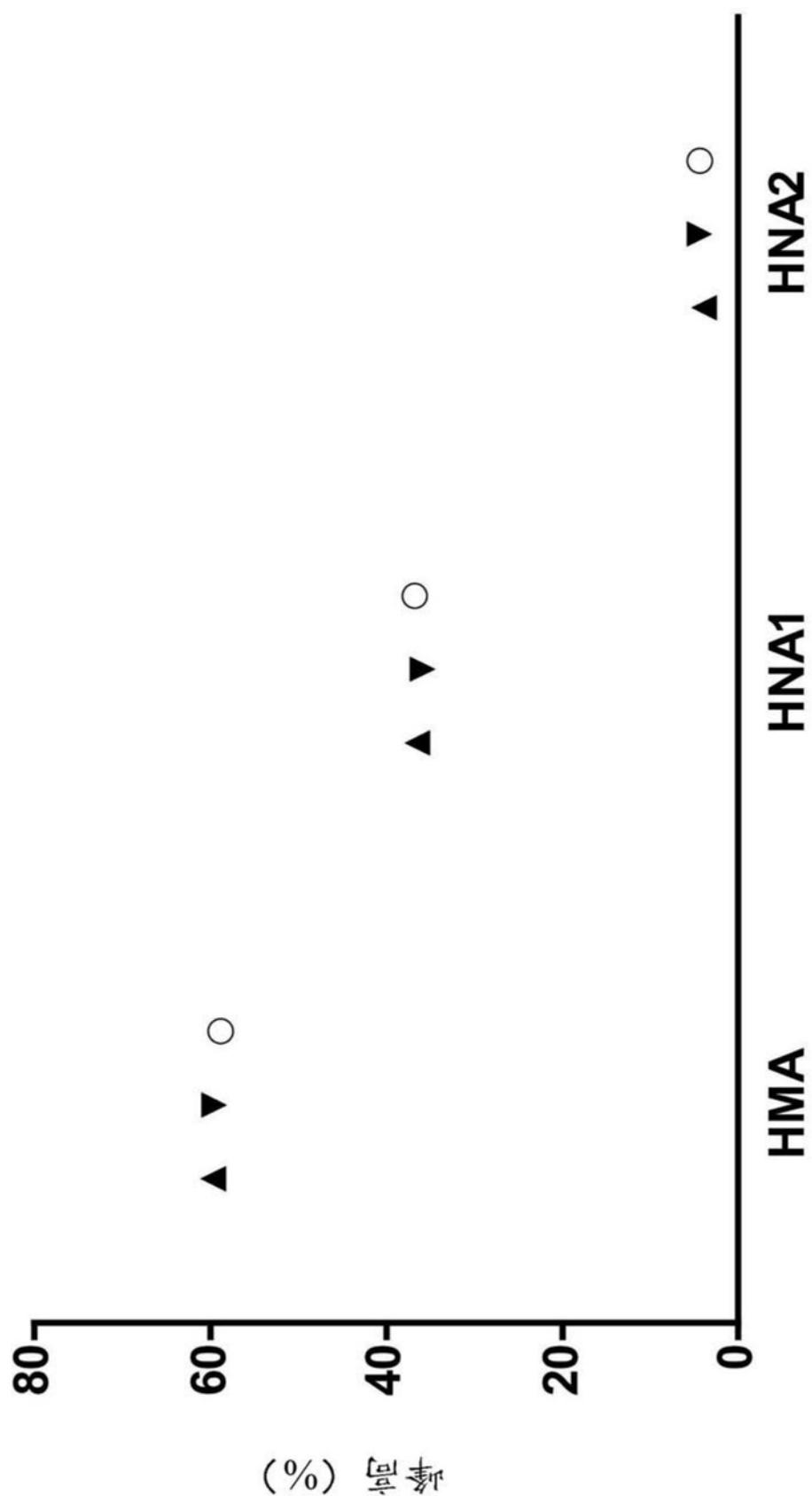


图4

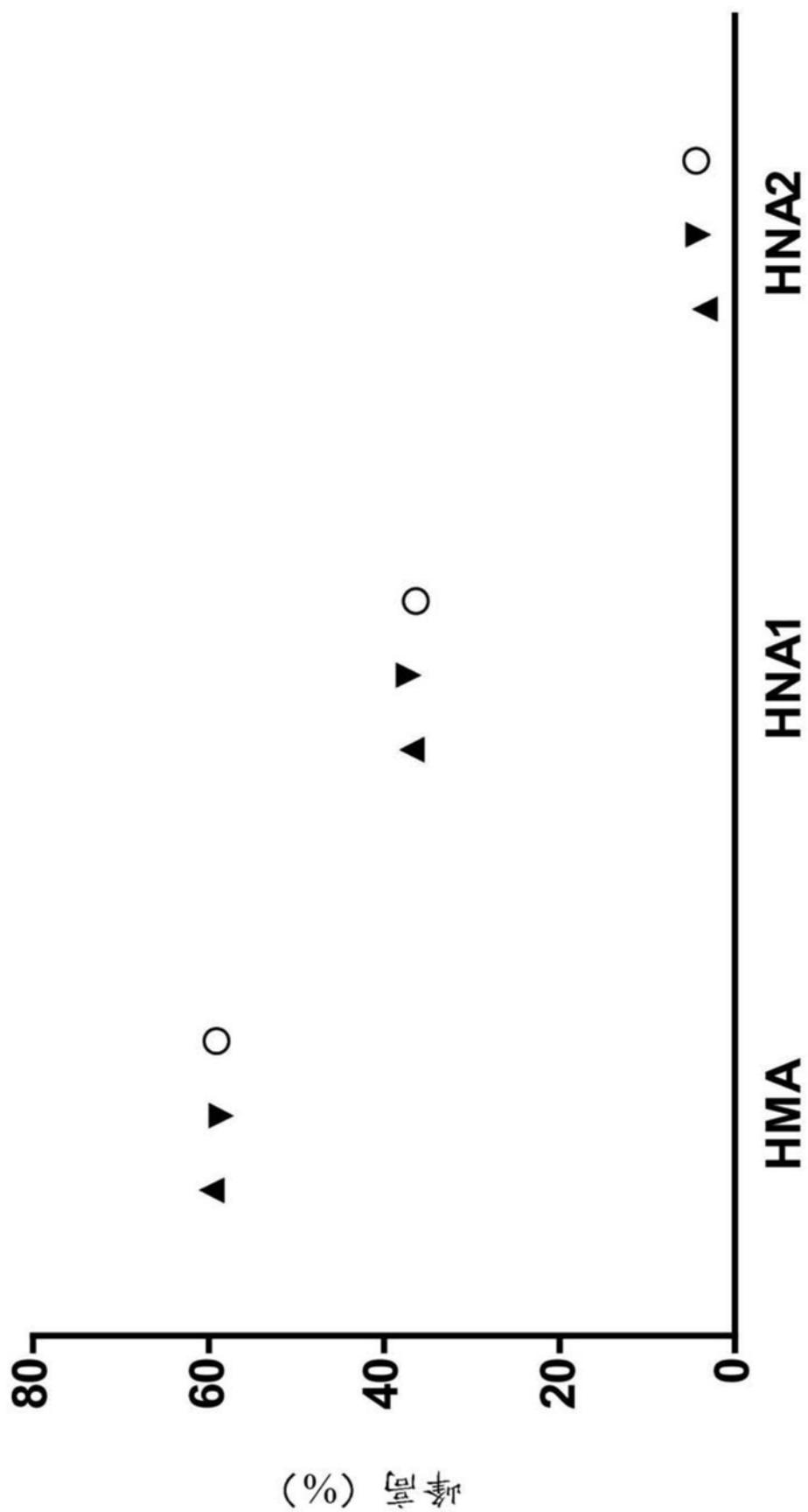


图5

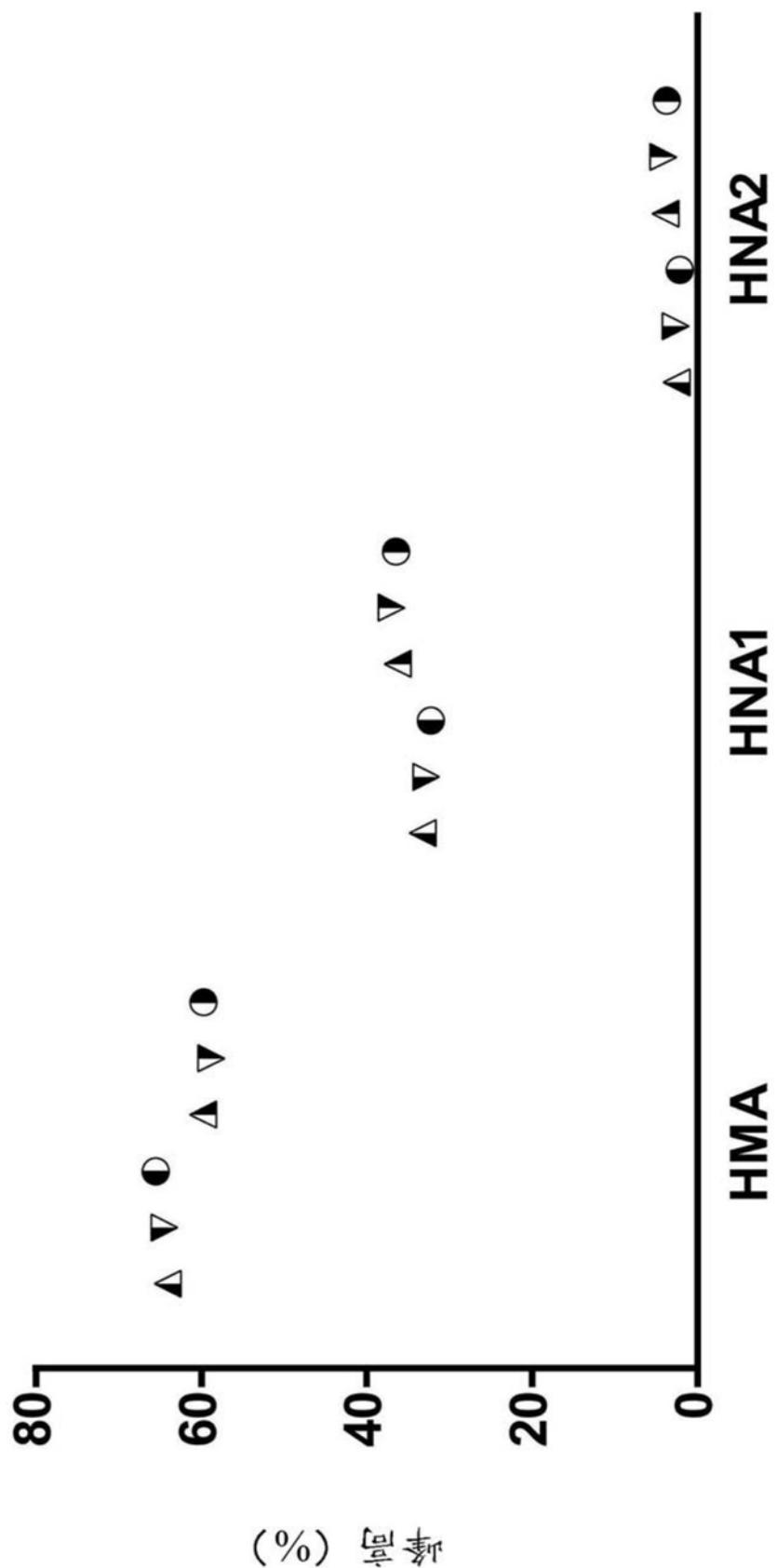


图6

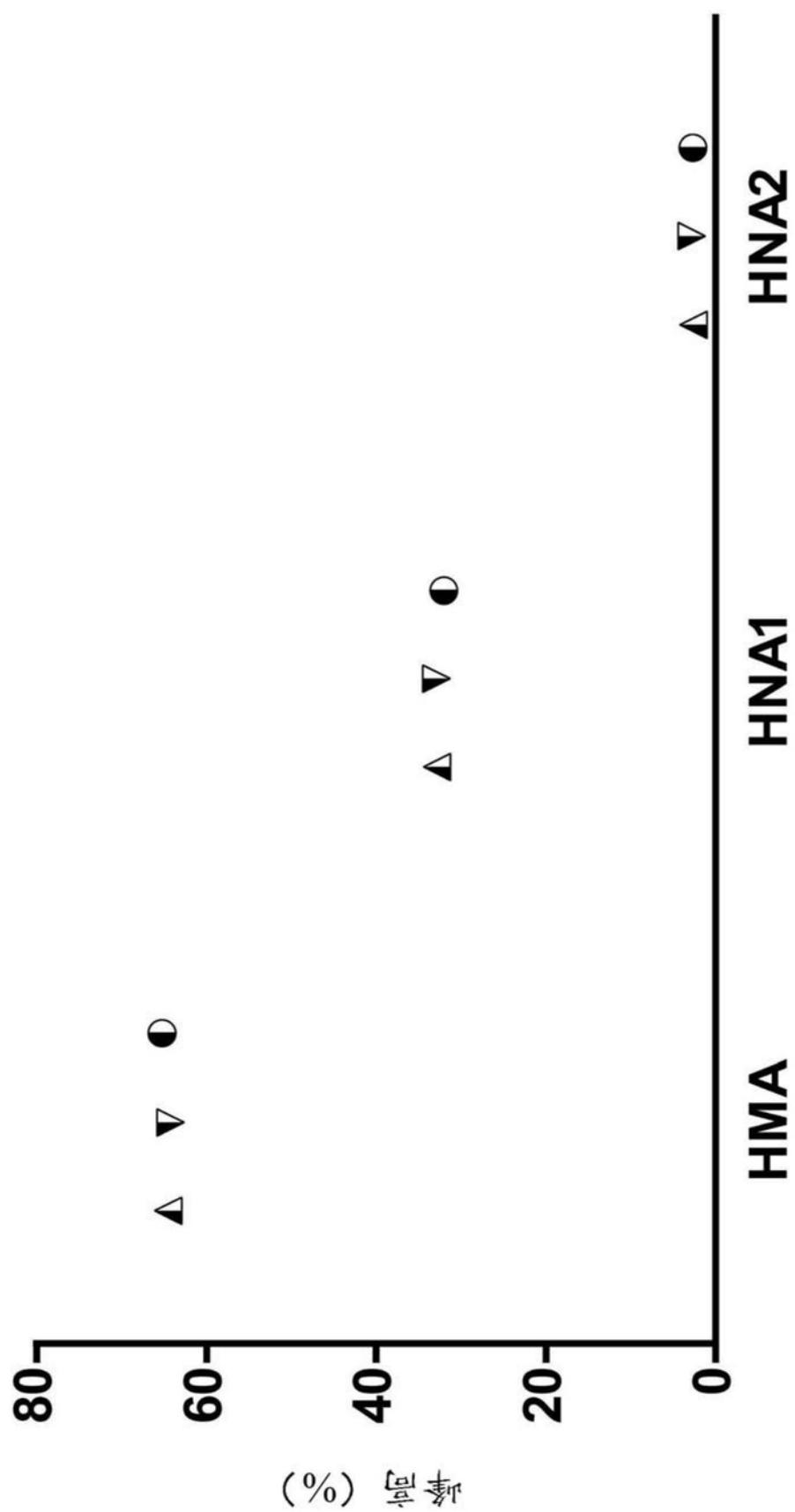


图7