

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680034739.8

[43] 公开日 2008年9月17日

[11] 公开号 CN 101268182A

[22] 申请日 2006.9.12

[21] 申请号 200680034739.8

[30] 优先权

[32] 2005.9.20 [33] US [31] 60/718,759

[86] 国际申请 PCT/US2006/035600 2006.9.12

[87] 国际公布 WO2007/035341 英 2007.3.29

[85] 进入国家阶段日期 2008.3.20

[71] 申请人 马林克罗特贝克公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 南都·德奥卡 托马斯·R·利里

丹尼尔·N·拉福

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张平元 赵仁临

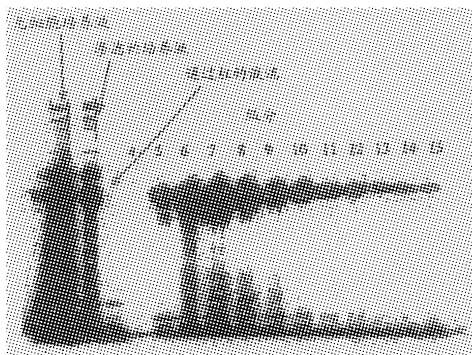
权利要求书4页 说明书12页 附图5页

[54] 发明名称

不使用动物来源成分的蛋白 A 的制备和纯化

[57] 摘要

本发明涉及制备没有被动物产品污染的蛋白 A 的方法。本发明也涉及植物发酵培养基，金黄色葡萄球菌在其中生长以产生植物蛋白 A。本发明还涉及植物蛋白 A 和植物蛋白 A 在治疗和预防方法中的用途。



1. 制备植物蛋白 A 的方法，其包括：

在包含植物氨基酸或肽的培养基中发酵金黄色葡萄球菌（*S. aureus*）的分泌菌株以制备蛋白 A，所述培养基中没有动物产品；

收集含有蛋白 A 的培养基；和

纯化蛋白 A，其通过将含蛋白 A 的培养基施加到不含动物产品的合成色谱树脂上和从树脂中洗脱蛋白 A。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述金黄色葡萄球菌为分泌菌株 Staph Imre。

3. 权利要求 2 的方法，其中将所述用于接种到发酵罐的金黄色葡萄球菌菌种保持在植物培养基中。

4. 权利要求 3 的方法，其中将所述金黄色葡萄球菌发酵 10 至 24 小时。

5. 权利要求 4 的方法，其中将所述金黄色葡萄球菌发酵 13 至 14 小时。

6. 权利要求 5 的方法，其中通过使用 10 毫摩尔的羟甲基氨基甲烷和 NaCl 渗滤，将含蛋白 A 的培养基的 pH 调节到约 7.5 至 8.5 且将电导率调节到小于 2 毫西门子/厘米。

7. 权利要求 6 的方法，其中将所述含蛋白 A 的培养基施加到用于纯化的阴离子交换色谱树脂上。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述色谱在约 24 厘米高的柱子上，以线流速约 5.7 至 7.9 厘米/分钟进行。

9. 权利要求 8 的方法，其中使用至少 20 毫摩尔的 TrisHCl 和 NaCl 在约 8 毫西门子/厘米的电导率下，从色谱柱中洗脱所述蛋白 A。

10. 权利要求 9 的方法，其中通过使用 14 毫摩尔的 pH 6.8 的磷酸钠渗滤，将所述蛋白 A 洗脱液的 pH 调节到约 pH 6.5 至 7.1，且将电导率调节到约 1 至 2 毫西门子/厘米。

11. 权利要求 10 的方法，其中使用具有 10,000 分子量截止点的膜渗滤所述蛋白 A。

12. 权利要求 11 的方法，其还包括使用 10,000 分子量的滤膜将所述蛋白 A 滤液浓缩至约 5 至 20 毫克/毫升，和调节所述蛋白 A 溶液至中性 pH。

13. 权利要求 10 的方法，其中使用磷酸盐缓冲液将蛋白 A 溶液的 pH 调节到中性 pH。

14. 权利要求 11 的方法，其还包括将所述蛋白 A 滤液施加到羟基磷灰石色谱柱上以除去非蛋白污染并从柱子中洗脱出蛋白 A。

15. 权利要求 14 的方法，其中用 pH 6.8 的 14 毫摩尔磷酸钠洗涤所述施加到柱子上的蛋白 A，并用 pH 6.8 约 370mM 的磷酸钠洗脱。

16. 权利要求 15 的方法，其中柱子中树脂床的高度为约 20 厘米。

17. 权利要求 16 的方法，其还包括使用 10,000 分子量的滤膜将来自羟基磷灰石色谱柱的蛋白 A 洗脱液浓缩至约 5 至 20 毫克/毫升，并将所述蛋白 A 溶液调节到中性 pH。

18. 权利要求 17 的方法，其中使用磷酸盐缓冲液将所述蛋白 A 溶液的 pH 调节到中性 pH。

19. 用于发酵金黄色葡萄球菌的植物培养基，其基本上由下列组成：酵母提取物、植物氨基酸和肽、葡萄糖和必需的盐。

20. 权利要求 19 的植物培养基，其中所述植物氨基酸和肽为大豆肽。

21. 权利要求 20 的植物培养基，其中所述酵母提取物的浓度为约 50 克/升，所述大豆肽的浓度为约 15 克/升，且所述葡萄糖的浓度为约 5 至 10 克/升。

22. 制备植物蛋白 A 的方法，其包括：

在基本上由酵母提取物、大豆肽、葡萄糖和必需盐的组成的培养基中发酵 *Staph Imre* 以制备蛋白 A；

收集含有蛋白 A 的培养基；

通过将含蛋白 A 的培养基施加到没有动物产品的强阴离子交换树脂上和从树脂中洗脱蛋白 A 而纯化蛋白 A。

23. 权利要求 22 的方法，其中将所述用于接种到发酵罐的金黄色葡萄球菌菌种保持在植物培养基中。

24. 权利要求 23 的方法，其中将所述金黄色葡萄球菌发酵 10 至 24 小时。

25. 权利要求 22 的方法，其中将所述金黄色葡萄球菌发酵 13 至 14 小时。

26. 权利要求 25 的方法，其中使用 10 毫摩尔的三羟甲基氨基甲烷和 NaCl，将含蛋白 A 的培养基的 pH 调节到约 7.5 至 8.5 且将电导率调节到小于 2.0 毫西门子/厘米。

27. 权利要求 26 的方法, 其中所述色谱在约 24 厘米高的柱子上, 以线流速约 5.7 至 7.9 厘米/分钟进行。

28. 权利要求 27 的方法, 其中使用至少 20 毫摩尔的 TrisHCl 和 NaCl 在约 18 毫西门子/厘米的电导率下, 从色谱柱中洗脱所述蛋白 A。

29. 权利要求 28 的方法, 其中通过使用 14 毫摩尔 pH 6.8 的磷酸钠渗滤, 将所述蛋白 A 洗脱液的 pH 调节到约 pH 6.5 至 7.1, 且将电导率调节到约 1.0 至 2.0 毫西门子/厘米。

30. 权利要求 29 的方法, 其中使用具有 10,000 分子量截止点的膜渗滤所述蛋白 A 洗脱液。

31. 权利要求 30 的方法, 其还包括使用 10,000 分子量的滤膜将所述蛋白 A 滤液浓缩至约 5 至 20 毫克/毫升, 和调节所述蛋白 A 溶液至中性 pH。

32. 权利要求 31 的方法, 其中使用磷酸盐缓冲液将蛋白 A 溶液的 pH 调节到中性 pH。

33. 权利要求 30 的方法, 其还包括将所述蛋白 A 滤液施加到羟基磷灰石色谱柱上以除去非蛋白污染物并从柱子中洗脱出蛋白 A。

34. 权利要求 33 的方法, 其中所述施加到柱子上的蛋白 A 滤液用 pH 6.8 的 14 毫摩尔磷酸钠洗涤, 并用 pH 6.8 约 370mM 的磷酸钠洗脱。

35. 权利要求 34 的方法, 其中柱子中树脂床的高度为约 20 厘米。

36. 权利要求 34 的方法, 其还包括使用 10,000 分子量截止点的滤膜将来自羟基磷灰石色谱柱的蛋白 A 洗脱液浓缩至约 5 至 20 毫克/毫升, 并将所述蛋白 A 溶液调节到中性 pH。

37. 权利要求 36 的方法, 其中使用磷酸盐缓冲液将所述蛋白 A 溶液的 pH 调节到中性 pH。

38. 通过权利要求 1 的方法制备的植物蛋白 A。

39. 植物蛋白 A。

40. 药物组合物, 其包括权利要求 39 的植物蛋白 A 和适当的载体。

41. 通过给药权利要求 40 的药物组合物治疗所需的患者的方法。

42. 权利要求 41 的方法, 其中治疗患者以刺激细胞因子或冷球蛋白产生。

43. 权利要求 41 的方法, 其中治疗感染或免疫系统缺乏的患者。

44. 权利要求 43 的方法, 其中通过注射到患者的血流给予所述药物组

合物。

45. 权利要求 39 的植物蛋白 A, 其固定到色谱树脂上以得到植物蛋白 A-色谱树脂。

46. 权利要求 45 的植物蛋白 A-色谱树脂, 其中所述色谱树脂为合成聚合物或无定形物质。

47. 权利要求 46 的植物蛋白 A-色谱树脂, 其中所述合成聚合物为聚甲基丙烯酸酯或聚半乳糖。

48. 权利要求 46 的植物蛋白 A-色谱树脂, 其中所述无定形物质为二氧化硅或硅藻土。

49. 权利要求 45 的植物蛋白 A-色谱树脂, 其通过将植物蛋白 A 上的羧基或氨基与色谱树脂上的化学官能团反应而制备。

50. 将抗体或抗体片段结合到色谱树脂上的方法, 其包括将抗体或抗体片段施加到权利要求 45 的植物蛋白 A-色谱树脂上。

51. 权利要求 50 的方法, 其中将所述抗体或抗体片段施加到植物蛋白 A-色谱树脂上以纯化抗体或抗体片段。

52. 药物组合物, 其包括通过权利要求 51 的方法制备的纯化的抗体或抗体片段和适当的载体。

53. 通过给予权利要求 52 的药物组合物治疗所需患者的方法。

54. 权利要求 53 的方法, 其中治疗癌症患者。

55. 药物组合物, 其包括权利要求 45 的植物蛋白 A-色谱树脂和适当的载体。

56. 通过给药权利要求 55 的药物组合物治疗所需患者的方法。

57. 权利要求 56 的方法, 其中治疗获得性血友病的患者。

58. 权利要求 56 的方法, 其中治疗自身免疫疾病或免疫相关问题的患者。

59. 权利要求 58 的方法, 其中所述自身免疫疾病为类风湿性关节炎或扩张型心肌病。

60. 权利要求 58 的方法, 其中所述免疫相关问题为移植物抗宿主疾病。

不使用动物来源成分的蛋白 A 的制备和纯化

发明背景

蛋白 A 是金黄色葡萄球菌产生的细胞壁蛋白。蛋白 A 的用途源自其与大多数哺乳动物免疫球蛋白 G (IgG) 的 Fc 区和较小程度与具有 V_{H3} 区的免疫球蛋白 M (IgM) 结合的能力, 而不影响免疫球蛋白对抗原的亲合力。商业上使用蛋白 A 纯化单克隆抗体, 所述抗体通常反过来用于治疗人类疾病, 如炎症性疾病和癌症。而且, 蛋白 A 自身可以用于治疗。可将蛋白 A 给药患者以结合如类风湿性关节炎的自身免疫疾病中的循环免疫复合物, 或刺激感染患者中的特异性细胞因子产生。而且, 当与色谱树脂偶联时, 蛋白 A 可以作为治疗吸收剂起作用以通过移除病症中的 IgG 复合物治疗血浆或全血, 所述病症如自身免疫疾病和移植器官排斥反应。

最初, 蛋白 A 源自金黄色葡萄球菌细胞壁, 但是已经分离了分泌该蛋白的菌株, 且这些菌株也用于得到蛋白 A。然而, 通过常规方法制备蛋白 A 在用于人类治疗中存在问题。金黄色葡萄球菌在含有动物产品的培养基中生长, 所述动物产品作为细菌的氨基酸源。尤其是, 通常使用牛水解产物和提取物作为细菌生长培养基中的补充剂。因此, 从含有动物源产物的生长培养基中得到的蛋白 A 导致动物产品如蛋白酶侵染子, 疯牛病、绵羊疯痒病和消耗性疾病中的病原体, 可能在培养基中出现并传递到人类患者的可能性。在下游纯化过程中, 蛋白 A 制剂也可能暴露于动物产品和被动物产品污染。例如, 在现已使用的方法中, 使用 IgG 琼脂糖色谱柱纯化蛋白 A, 且偶联到琼脂糖色谱柱的 IgG 一般为动物源的。然而, 在分离和纯化过程中伴随蛋白 A 制备出现的动物产品不容易通过当前已知的方法从制剂中纯化。

发明简述

本发明涉及制备没有动物源产物污染的蛋白 A 的方法, 其包括通过在含有植物氨基酸或肽代替动物肽的培养基中发酵金黄色葡萄球菌分泌菌株 (secretor stain), 收集含有蛋白 A 的培养基和纯化蛋白 A, 并且将其施加到没有动物肽的合成树脂上和过滤来自树脂的洗脱液。

在本方法的一个实施方案中，所述金黄色葡萄球菌分泌菌株为 *Staph aureus, var Imre*(S. Imre)。在本发明的另一个实施方案中，使用阴离子交换色谱树脂从培养基中纯化蛋白 A。在本发明另一个实施方案中，通过羟基磷灰石或阳离子交换色谱进一步纯化从色谱树脂中洗脱的蛋白 A 以除去非蛋白污染。纯化后，可以浓缩蛋白 A 并使其达到生理 pH。

本发明也涉及用于金黄色葡萄球菌发酵的植物培养基，其由酵母提取物、植物氨基酸和肽、葡萄糖和必需的盐组成。在一个实施方案中，植物氨基酸或肽为大豆肽。而且本发明涉及通过在植物培养基中生长细菌而制备植物蛋白 A 的方法，所述植物蛋白 A(vegetarian protein A)即为没有动物产品污染的蛋白 A 制剂。

本发明还涉及通过本发明方法制备的植物蛋白 A 制剂。本发明还涉及含有植物蛋白 A 和适当载体的药物组合物。在一个实施方案中，在治疗所需患者的治疗方法中使用所述药物组合物。尤其是，在治疗需要通过给予患者植物蛋白 A 药物组合物刺激细胞因子或冷球蛋白产生的患者的方法中使用所述药物组合物。

本发明也涉及固定在色谱树脂以生成植物蛋白 A-色谱树脂的植物蛋白 A。在一个实施方案中，在结合抗体或抗体片段的方法中使用所述植物蛋白 A-色谱树脂。在尤其优选的实施方案中，所述植物蛋白 A-色谱树脂用于纯化抗体。本发明也涉及包含纯化的抗体和适合载体的药物组合物。在一个实施方案中，使用纯化的抗体的药物组合物以治疗所需患者，且在优选实施方案中抗体用于治疗患有癌症的患者。

本发明还涉及包含植物蛋白 A-色谱树脂和适合载体的药物组合物和其中使用所述药物组合物治疗所需患者的方法。在本方法的一个实施方案中，所述药物组合物用于治疗获得性血友病。在另一个实施方案中，在治疗自身免疫疾病或免疫相关问题的方法中使用所述药物组合物。在本方法的另一个实施方案中，所述药物组合物用于治疗自身免疫疾病类风湿性关节炎或扩张型心肌病。在本方法的一个实施方案中，所述药物组合物用于治疗移植物抗宿主疾病(graft-versus-host disease)的免疫相关问题。

因此，本发明以防止动物蛋白污染的方式提供了用于制备蛋白 A 的方法。而且，本发明有利地提供了植物蛋白 A 制剂和蛋白 A 药物组合物，其不与动物产品接触，确保蛋白 A 不被它们污染。对于在使用蛋白 A 对人类

的治疗中这点尤其重要。

附图说明

图 1 为表示从植物蛋白 A 得到的级分的 SDS-PAGE 凝胶图，所述植物蛋白 A 是从 MacroPrep High Q 阴离子交换柱中洗脱出来的。

图 2 为表示植物蛋白 A 中级分 6 的线性色谱图，所述植物蛋白 A 是从 MacroPrep High Q 阴离子交换柱中洗脱出来的。

图 3 为表示与标准蛋白 A 制剂相比的植物蛋白 A 活性的蛋白印迹图，所述植物蛋白 A 是通过 MacroPrep High Q 阴离子交换色谱中纯化的。

图 4 为表示植物蛋白 A 的级分的 SDS-PAGE 凝胶图，所述植物蛋白 A 是从陶瓷羟基磷灰石柱中洗脱出来的。

图 5 为表示植物蛋白 A 中级分 3 的每条带成分的线性色谱图，所述植物蛋白 A 是从陶瓷羟基磷灰石柱中洗脱出来的。

发明详述

本发明的优选实施方案的描述如下。蛋白 A 可以从任何产生蛋白 A 的金黄色葡萄球菌菌株中获得，所述菌株包括那些天然存在的、分离的 (isolated) 或遗传工程的菌株。产生蛋白 A 的金黄色葡萄球菌菌株也可以包括那些其中蛋白 A 包含在细胞壁中的菌株和那些分泌蛋白 A 到生长培养基中的菌株，优选例如 *S. aureus*, var *Imre*。从金黄色葡萄球菌细胞壁中回收蛋白 A 的方法(例如酶消化)是本领域技术人员公知的。可以纯化以这种方式回收的蛋白 A 以除去消化的细胞成分。然而优选从葡萄球菌株得到蛋白 A，所述葡萄球菌株分泌蛋白 A 到培养基中使得仅需要从培养基中收集蛋白 A。

发酵和收集

在没有动物源肽条件的培养基中发酵金黄色葡萄球菌菌株以防止蛋白 A 被动物产品污染。本文所用的“动物产品”是指从非人动物传播或产生的任何物质，所述物质包括肽、蛋白、氨基酸、类蛋白质、核酸、病毒等。本文所用的“植物蛋白 A”是指没有被动物产品或任何动物源肽污染的蛋白 A 组合物，其是从发酵培养基或纯化培养基中产生的。相似地，术语“植物培养基”是指没有被动物产品或任何动物源肽污染的发酵培养基。本文中所用的术语“植物氨基酸或肽”是指不是来自非人动物的任何肽、蛋白、氨基

酸或类蛋白质。

分泌细菌可以在任何足以使细菌生长和产生所需量蛋白 A 的量的植物培养基中发酵。最优选的是，在发酵罐中大批量生长金黄色葡萄球菌。发酵条件（即气流、温度、搅动、pH 和压力）可以用如微机或通过任何其它电子工具控制的和/或电子监测。一些尤其优选的条件包括在约 37°C 和每升培养基约 1 升/分钟无菌空气的气流下发酵金黄色葡萄球菌。培养基可以由本领域中已知的用于以金黄色葡萄球菌生长为条件的培养基成分组成，一般为酵母提取物、葡萄糖和必需的盐，且在本发明的一些情况中包括植物氨基酸和肽（如大豆、豌豆水解产物或棉籽水解肽）作为氨基酸源。例如植物氨基酸或肽可以来源于任何非动物（如植物或类植物）或合成（如化学合成）源，且在本发明的一个实施方案中，植物氨基酸和肽源自大豆。所述成分可以为浓度约为 50 克/升（g/L）的酵母提取物、15g/L 的大豆肽和 5 至 10g/L 的葡萄糖，这些成分溶解于纯化的去离子水中，发酵时视需要加入稀磷酸和稀氢氧化钠以控制 pH 在约 7 至 8 之间。所述培养基还可以含有至少 0.67 毫升/升（mL/L）的聚乙二醇以防止在发酵混合物中起泡。

在优选实施方案中，为大批量制备在发酵培养液中接种大约 5×10^9 的 Staph Imre 菌株的金黄色葡萄球菌。为确保蛋白 A 制剂中完全没有动物产品污染，将用于接种到发酵培养液中的金黄色葡萄球菌种也保持在植物培养基中。优选金黄色葡萄球菌在 37°C 发酵 13 至 14 小时以得到高密度的细菌，在 560 纳米（nm）下检测浓度大于 50（或大于 5.2×10^8 S. aureus/mL），但是可以在任何地方发酵 10 至 24 小时以得到所需细菌浓度，由本领域技术人员确定合适的生长时间。通过在 Mueller Hinton Agar（其有利于革兰氏阴性菌的生长）上，生长特定控制的发酵培养液样品，进一步检测证实培养物纯度，且对于简单代谢产物如谷氨酰胺、半乳糖、mellobiose 等，根据代谢产物鉴别生长或非生长的固定图形。市售用于进行这种鉴定和纯化分析的试剂盒，例如来自 BioMérieux。

可以在显微镜下可视地评估发酵培养液以确保所述培养液没有被其它微生物污染。相似地，可以使用显微镜观察培养物中金黄色葡萄球菌的适当形态，其包括：具有革兰氏阳性球菌的形状、多形态（即单菌落(single colonies)、杆状(chains)或玫瑰花形(roseates)）和大约 0.6 微米的大小。也可以通过检测是否它们在血液琼脂平皿上呈现为圆形、突起、浅灰色形态；48

小时后他们有引起羊血的 β -溶血的能力；和对于酶凝固酶和过氧化氢酶的检测阳性，来评估所培养的金黄色葡萄球菌的品质和健康。

优选在所需的条件下培养液的发酵将导致植物蛋白 A 产物的浓度为 0.68 毫克/毫升 (mg/mL) 培养基。然后通过使培养液通过使用 0.1 微米过滤器的过滤系统（例如 Millipore Prostack 过滤系统）收集发酵培养基中的植物蛋白 A。也可以使用其它适合的过滤方法以除去细菌细胞，例如任何有基质辅助剂，如硅藻土的深层过滤方法。也可以通过金黄色葡萄球菌发酵培养基的连续高速离心消除葡萄球菌细胞，离心使细菌细胞沉淀且使培养基富含分泌的蛋白 A。然后进一步纯化前，将没有细胞的培养液 (cell-free broth) 通过无菌 0.22 微米过滤器或其类似物。

纯化

植物蛋白 A 通过下游一些方法步骤以产生纯化的植物蛋白 A 制剂。因此，本发明的方法也涉及植物蛋白 A 的纯化。在一个实施方案中，含有植物蛋白 A 的培养基可以通过渗滤 (diafiltration) 以降低溶液的电导率并移除与植物蛋白 A 同时存在的非蛋白质物质。优选降低植物蛋白溶液的电导率使得其不大于 2 毫西门子/厘米 (mS/cm)。可以使用过滤器和所需的缓冲液对溶液进行渗滤，且在本发明的实施方案中使用 10,000 分子量截止点 (molecular weight cut-off) (MWCO) 的膜在 pH 7.8 的 10 毫摩尔 (mM) TrisHCl 缓冲液中完成渗滤。渗滤的方法是本领域中已知的，且可以包括 MWCO 膜（如 Millipore PROCON）、中空纤维透析过滤器（如 Fresenius OptiFlux）或任何其它分子量截止点适合得到最大和/或所需产率的植物蛋白 A 的过滤系统。

然后可以使用色谱方法纯化含有植物蛋白 A 的培养基，其中色谱材料不含动物源的物质。在本发明的一个实施方案中，通过将含有植物蛋白 A 的溶液施加到阴离子交换色谱树脂上而纯化蛋白 A。可以使用多种阴离子交换树脂，且适合的材料包括纤维素、丙烯酰胺和硅胶。市售有许多阴离子交换色谱系统，且在本发明的最优选实施方案中，使用 MacroPrep High Q 阴离子交换树脂纯化含有植物蛋白 A 的溶液。通过本领域公知的方法可以将蛋白 A 施加到阴离子交换色谱基质上。一般，使色谱柱与含有植物蛋白 A 的溶液（即 pH 7.5 至 8.5）的 pH 和电导率保持平衡，且含有植物蛋白 A 的培养基通过柱子，柱子与植物蛋白由于分子间相互作用结合。在一个实施方案中，用平衡缓冲液洗涤与柱子结合的植物蛋白 A，且可以用任何适合 pH 和电导率的

缓冲液洗涤。色谱优选在高度为约 24 厘米的柱子上以 5.7 至 7.9cm/分钟的流速进行。然后使用带适当电荷的缓冲液从柱子中洗脱出植物蛋白 A，且在本发明的具体实施方案中，使用 20mM 的 TrisHCl 和电导率为约 18mS/cm 的氯化钠 (NaCl)。在本发明的一个实施方案中，植物蛋白 A 培养基的阴离子交换色谱产生含有至少 95% 纯蛋白 A 的植物蛋白 A 洗脱液。在优选实施方案中，蛋白 A 洗脱液含有的蛋白 A 纯度高于 95%，且最优选纯度为 97 至 99%。

在本发明的另一个实施方案中，渗滤来自阴离子交换色谱柱的植物蛋白 A 洗脱液以调节该溶液的 pH 和电导率。最优选使用 10,000 MWCO 的膜进行渗滤以产生 pH 为约 6.5 至 7.1 且电导率为 1 至 2mS/cm 的植物蛋白滤液。

在本发明另一个实施方案中，然后可以任选通过羟基磷灰石色谱进一步纯化植物蛋白 A 以去除非蛋白污染物。羟基磷灰石是混合型离子交换色谱树脂，其使蛋白 (蛋白 A) 先洗脱出来而含糖化合物在蛋白之后洗脱出来。优选在色谱柱中，羟基磷灰石树脂具有高度为 20cm 的树脂床。一旦将植物蛋白施加到羟基磷灰石树脂上，便用缓冲液洗涤，且在本发明的实施方案中，缓冲液为 pH 6.8 的 14mM 的磷酸钠。在优选实施方案中，然后使用 pH 6.8 的 370mM 的磷酸钠将植物蛋白 A 从羟基磷灰石柱中洗脱出来。

纯化后，可将植物蛋白 A 浓缩到所需体积和/或适合存储或使用的浓度。浓缩蛋白的机理是本领域中公知的，且一般包括过滤或离心。在本发明的一个实施方案中，通过阴离子交换色谱后浓缩植物蛋白 A 溶液，而在另一个实施方案中通过羟基磷灰石色谱后浓缩植物蛋白 A 溶液。在本发明的优选实施方案中，可以使用 10,000 MWCO 的过滤器浓缩植物蛋白 A 洗脱液使植物蛋白 A 制剂达到 5 至 20mg/mL。为了在要求生理 pH 的应用中使用植物蛋白 A，可以将浓缩的植物蛋白 A 的 pH 调节到中性 pH，优选使用磷酸缓冲液。

组合物和治疗方法

本发明还涉及通过本发明的方法制备的植物蛋白 A。可以将植物蛋白 A 直接给予患者或更优选地与适合载体组合给药。因此，本发明也涉及包含植物蛋白 A 和适合载体的药物组合物。适合药学载体 (如 Eupergit 或 Glyoxal 琼脂珠) 是本领域中已知的且根据给药途径改变。

本发明还涉及用植物蛋白 A 药物组合物治疗患者的方法。在一个实施方案中，给予所需患者植物蛋白 A 药物组合物以刺激细胞因子或冷球蛋白产

生。最优选的，以这种方式治疗患者以抵抗感染或增强缺乏免疫力的免疫系统。本领域技术人员合适地确定给予植物蛋白 A 药物组合物，但是更合适的给药方法是通过注射到患者的血流中。

本发明也涉及固定到色谱树脂的植物蛋白 A。植物蛋白 A 固定的树脂可以小至 40 微米或大至 300 微米。在本发明的一个实施方案中，所述树脂为合成聚合物（如，聚甲基丙烯酸酯）、半合成聚合物（如，聚半乳糖）或无定形物质（如，硅藻土或二氧化硅）。本发明的另一个实施方案，可以通过将植物蛋白 A 上的羧基或氨基与色谱树脂上的化学官能团反应产生植物蛋白 A-树脂。在本发明的一个优选实施方案中，将植物蛋白 A 的羧基与树脂上的氨基反应以产生植物蛋白 A-树脂。在另一个实施方案中，用三嗪活化树脂且蛋白 A 与结合到树脂的三嗪反应。在另一个实施方案中，使用醛活化的基质或糖基质可以得到非常高的蛋白 A 结合效价，方法是首先通过用高碘酸钠氧化树脂，然后使用抗坏血酸或硼氢化钠还原基质上的蛋白 A。在最优选的实施方案中，在蛋白中多个位点将植物蛋白 A 连接到树脂上以使蛋白 A 从树脂上的脱离最小化。

本发明也涉及将抗体或抗体片段与植物蛋白结合的方法。术语“抗体”和“抗体片段”指包括多克隆和单克隆抗体。而且，本文所用的术语抗体也包括多种抗体，其包括人抗体、嵌合抗体、人化抗体、灵掌源抗体、veneered 或单链抗体。可以通过本领域公知的方法将抗体或抗体片段施加到植物蛋白 A-树脂上而将抗体或抗体片段与植物蛋白 A-树脂结合。例如，一般用下述方法将抗体与树脂结合，通过在抗体与树脂结合的条件下将抗体溶液应用到树脂上，并用适合的缓冲液洗涤抗体结合树脂以除去未结合的材料。在一个实施方案中，为了纯化抗体，将抗体或抗体片段与植物蛋白 A-树脂结合。

本发明还涉及包含使用植物蛋白 A-树脂纯化的抗体或抗体片段和适合载体（如，Dohkai MicroSphere 硅珠）的药物组合物。可以通过本领域技术人员已知的方法纯化抗体。事实上，使用蛋白 A-色谱树脂纯化抗体是最广泛使用的方法和本领域公知的方法（参见，如 Harlow, E., 和 Lane, D. P., *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1988)) 之一。本发明还涉及用在合适载体中的纯化的抗体和抗体片段的药物组合物治疗所需患者。存在许多疾病，其可以使用纯化的抗体治疗，所述疾病包括炎症性疾病（如，克罗恩病、贝切特氏病和结肠炎）、风湿性疾病、

多发性硬化症、阿尔茨海默病、狼疮、癌症、皮肤病和过敏症。在具体实施方案中，治疗癌症患者。

本发明也涉及包含植物蛋白 A-树脂和适合载体的药物组合物和通过给予植物蛋白 A-树脂药物组合物治疗所需患者的方法。在本发明的一个实施方案中，治疗获得性血友病患者。在本发明的另一个实施方案中，治疗自身免疫疾病和免疫相关问题的患者。在本发明的另一个实施方案中，自身免疫疾病为类风湿性关节炎和扩张型心肌病。在本发明的另一个实施方案中，免疫相关问题为移植物抗宿主疾病和移植器官的排斥反应。

适合载体和给药方式

根据所述方法，可以通过合适的途径，单独或与其它药物组合给药药植物蛋白 A 组合物或纯化的抗体或抗体片段至患者。给予患者有效量的药物组合物（如，植物蛋白 A、固定到色谱树脂上的植物蛋白 A 或使用植物蛋白 A-树脂纯化的抗体）。有效量为在给药条件下足以实现所需治疗或预防作用的量，如足以刺激免疫细胞或结合疾病相关蛋白的量。可以以单剂量或多剂量给药药物组合物以确保在治疗期间患者维持植物蛋白 A 药物组合物或被植物蛋白 A 纯化的抗体的高血浆含量。可以通过本领域已知的方法确定剂量，且剂量依赖于例如特定的试剂选择、受试者的年龄、体重、对药物的敏感性和耐受性和整体健康状况。对于含有植物蛋白 A 的药物组合物的适合剂量为每次治疗约 0.001 毫克/千克 (mg/kg) 至约 10mg/kg 体重，且对于用植物蛋白 A 纯化的抗体的剂量为每次治疗约 0.01mg/kg 至约 100mg/kg 体重。

根据试剂和所要治疗的疾病或病症，多种给药途径是可能的，其包括例如口服、饮食、局部、经皮、直肠、胃肠外（如，静脉内、动脉内、肌内、皮下注射、真皮内注射）和吸入（如，气管内(intrabronchial)、鼻内或口腔吸入、滴鼻剂）的给药途径。根据指示，给药可以是局部或全身的。给药的优选方式可以根据具体选择的试剂和所要治疗的具体疾病而改变；然而，一般优选口服或胃肠外给药。

植物蛋白 A 药物组合物和纯化的抗体的制剂将根据所选择的给药途径（如溶液、乳剂或胶囊）而改变。适合的药学载体可含有惰性成分，其不与植物蛋白 A 药物组合物或植物蛋白 A 纯化的抗体相互作用。可以使用标准药制剂技术，如在 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. 中所述。用于胃肠外给药的适合药学载体包括，例如无

菌水、生理盐水、抑菌盐水（盐水含有约 0.9% mg/ml 的苯甲醇）、磷酸盐缓冲的盐水、汉克溶液、林格乳液等。包裹组合物的方法（如在硬明胶或环葡聚糖中的包衣）是本领域中已知的。对于吸入剂，试剂可以溶解或装载到用于给药的适合的分配器中（如喷雾器或雾化器或加压的气雾剂分配器）。

以本发明的示例的方式给出下述实施例，且并不是为了以任何方式限制本发明。

实施例

实施例 1

其中培养金黄色葡萄球菌以制备植物蛋白 A 的发酵培养液(fermentation broth)的成分为浓度约 50 克/升的酵母提取物、15 克/升的大豆肽和 5 至 10 克/升的葡萄糖。具体地，为了制备分批发酵，植物培养基含有的物质的浓度见于表 1。

表 1. 用于发酵培养液的物质

说明	所需的量
大豆胨	6.75±0.2kg
氯化钠	1.875±0.2kg
葡萄糖	0.938±0.1kg
磷酸二氢钾	0.938±0.1kg
酵母提取物	18.75±0.4kg
聚乙二醇 P-2000 消泡剂	250±5mL
金黄色葡萄球菌, var. IMRE “vegan working seed”	1 瓶 (5 × 10 ⁹)
磷酸, N.F. 未稀释	视需要, 以保持 pH 7 至 8
氢氧化钠, 50%, 未稀释	视需要, 以保持 pH 7 至 8

实施例 2

在制备分批发酵制备中，用于发酵产生植物蛋白 A 的金黄色葡萄球菌的条件列于表 2。

表 2. 发酵罐参数

可控体系	温度	气流	压力	搅动	pH
说明	37±1℃	325±25sLpm	6.0±1psig	400±25rpm	8.0±0.5

实施例 3

植物蛋白 A 活性检测

通过使用简单的试验测定每阶段蛋白 A 的活性和产率。验证小 IgG-琼脂糖柱对于使用通过标准方法制备的蛋白 A 的结合活性和结合能力。使用含有亚饱和量蛋白 A 的样品,洗涤柱子,用 pH 2.2 的甘氨酸缓冲液洗脱蛋白 A,且用 OD₂₇₅ 检测蛋白 A 的浓度。始终使用该试验以检测植物蛋白 A 的活性和产率。或者,使用 HPLC 和反相离子交换或空间排阻柱色谱(size exclusion column chromatograph) 几乎可以更方便地定量检测粗提取物。

MacroPrep High Q 阴离子交换色谱

经过评估许多市售的色谱树脂 (Mallinckrodt、EMD、BioRad、Millipore) 后,选择 BioRad MacroPrep High Q (quaternary) 阴离子交换树脂。使用 Pharmacia Biotech BioPilot 自动化色谱系统将渗滤后的培养液施加到小的 67mL 柱上,使用 Unicorn 软件用于配制管理 (1.5cm × 38cm 柱; 12mL/分) 并收集数据。施加渗滤后的培养液后,用 6 倍柱体积的 pH 7.8 的 10mM 的 TrisHCl 洗涤柱子。使用 6 倍柱体积的 pH 7.8 的 20mM 的 TrisHCl + NaCl 至 8mS/cm (分步梯度) 洗脱活性植物蛋白 A。随后用 pH 7.8 的 20mM 的 TrisHCl + 0.5M 的 NaCl 洗涤柱子以除去粘附在柱子上半部分的褐色物质。定期地,使用几倍柱体积的 0.1M 的 NaOH 完全淋洗柱子,然后用几倍柱体积的 pH 7.8 的 0.2M 的 TrisHCl 洗涤以调节 pH 并用 10mM 的 TrisHCl 调节电导率。

将 150mL 含有大约 0.5 克 (gm) 蛋白的渗滤/浓缩的培养液施加到含有 106mg 植物蛋白 A 的 67mL 柱子上。在所选择 (收集的 (cut)) 的级分中,回收 58mg 的植物蛋白 A (55%)。在其它可用的级分中含有约 28mg 的植物蛋白 A (26%)。而仅深入研究第一次收集的级分, SDS-PAGE 表明后面的级分可能也是适合的。如果能够收集所有洗脱液,那么对于阴离子交换色谱步骤回收率将达到 81%。

图 1 表示在无细胞培养液、渗滤的培养液 (diafiltered broth)、通过 MacroPrep Q 的液流和从 MacroPrep High Q 色谱运行获得的各级分的 SDS-PAGE 的图谱。没有调整上样量,因此一些通道对于一个或多个条带上

样过量。尽管一些条带饱和，但是仍可以进行一些所关心的观察。图谱分析表明植物蛋白 A 可以说明在培养液中存在差不多 20% 的蛋白。(尽管有二者的间接存在的化学证据，但没有检测存在的脂质或糖类的量。)第二，在培养液中一些蛋白明显没有与 MacroPrep Q 结合且通过了柱子(见通过柱子的液流)。

稀释级分 5 至 11 并将其施加到 SDS-PAGE Novex 4 至 12% 梯度凝胶。以前的研究已经证明了使用该系统对 0.05 微克 (μg) 至 2.0 μg 的样品线性响应。在主条带下，一些次级条带是明显的。这对蛋白 A 是典型的，且表示异构体 (isoforms)，其它研究已经证明了其存在于发酵产物中。异构体的存在不是因为下游纯化过程中的降解产生的，而很可能是因为发酵过程中金黄色葡萄球菌分泌的公知的蛋白酶的降解。图 2 中出现了与级分 6 的行扫描相对的条带扫描(更精确)。主峰占 90.2% 的蛋白，另外异构体占 8.4%。级分 7 (图谱中没有表明)具有 96.5% 的主峰和 1.9% 的异构体。级分 8 (图谱中没有表明)具有 97.4% 的主峰和 1.0% 的异构体。

参见图 3，通过进行蛋白 A 活性的蛋白印迹(western blot)确定表明作为异构体的条带含有蛋白 A 活性的证据。将 100 纳克和 10 纳克的双份(in duplicate)MacroPrep Q 制备的植物蛋白 A 的合并样品在 Novex SDS-PAGE 4 至 12% 凝胶上进行电泳。凝胶上包含预染的分子量标准。当凝胶电泳完成后，该蛋白样品被电泳 (60V/300mAmp/1hr) 转移至 Towbin 转移缓冲液中的 0.2 微米硝化纤维素膜 (BioRad)。在 TrisHCl 缓冲的盐水中洗涤印迹膜 (blotted membrane)，然后用 SuperBlock 封闭 1 小时。用 0.05% Tween-20 的 TrisHCl 缓冲盐水 (TTBS) 洗涤后，将该膜用兔抗鼠 IgG-碱性磷酸酶缀合物培育 30 分钟。用 TTBS 洗涤 2 次(每次 5 分钟)后，将该膜浸渍在来自 Vector Labs 的 Vector Black 染色剂 (BCIP/NBT Substrate Kit, 5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯/硝基蓝四唑) 中。化学反应过程中底物与碱性磷酸酶的反应副产物在膜中形成黑色沉淀，并且可以鉴定碱性磷酸酶的位点。由于碱性磷酸酶与兔 IgG 缀合，所以其位点与膜上的蛋白 A 活性位点相同。

使用该技术不仅方便地染色植物蛋白 A 和通过标准方法(参见 Fresenius SpA, 图 3) 制备的蛋白 A 的主条带，而且主条带下的一些次级条带也很容易的显示出来。而且，植物蛋白 A 的主条带跑至 50,000 千道尔顿 (KD) 至 38,000KD 分子量之间的标记处。通过 MALDI TOF 质谱检测，通过标准方

法制备的蛋白 A 具有 47,000KD 的分子量。因此，蛋白印迹法确认植物蛋白 A 为所需大小。

实施例 4

1 型陶瓷羟基磷灰石 (ceramic hydroxylapatite)

用 pH 6.8 的 14 mM 的磷酸钠 (磷酸 Na) 将 MacroPrep Q 的合并级分渗透至小于 2mS/cm。将该样品施加到 8mL 的用 14mM 磷酸钠平衡的 BioRad 陶瓷羟基磷灰石色谱柱。在液流通过期间出现浅峰。(BioPilot 使用大约 260 至 290 纳米的 UV 带宽过滤器(filter)。) 因为该峰为浅峰，所以虽然其可能表示真实的物质，但其可能表示携带的缓冲液或一些其它缓冲系统的鬼峰 (artifact)。然后用 5 倍柱体积 pH 6.8 的 14mM 磷酸钠 (1.7mS/cm) 洗涤柱子。然后用 5 倍体积 pH 6.8 的 370mM 磷酸钠 (25mS/cm) 洗脱植物蛋白 A。

首先，将要通过活性试验检测的 26mg 植物蛋白 A 上样到柱子上，且回收了 27mg 活性植物蛋白 A，即在试验误差内完全回收。为适合上样至 NOVEX 4 至 12% 的 SDS-PAGE (参见图 4) 上，将主峰样品进行稀释或不稀释。再次出现一条主条带，就在主植物蛋白 A 条带下有一些次级条带。接近染色前沿的凝胶的接近底部处的次级条带是明显的。

通过蛋白印迹法检测级分 2 样品的蛋白 A 活性。如图 3 所示，主条带和异构体是非常明显的。在蛋白印迹上没有其它的蛋白 A 活性。图 5 中，对 SDS-PAGE 上的级分 3 的每条条带进行图谱分析。各图主条带分别表示存在的 94.9% 和 94.6% 的蛋白。异构体分别为 2.8% 和 2.6%。因此，植物蛋白 A 表示存在约为 97% 至 98% 的蛋白。

通过对优选实施方案的引用具体说明和描述了本发明，本领域的技术人员将理解在不脱离从属权利要求包括的本发明范围内可以在形式和细节上进行不同的修改。

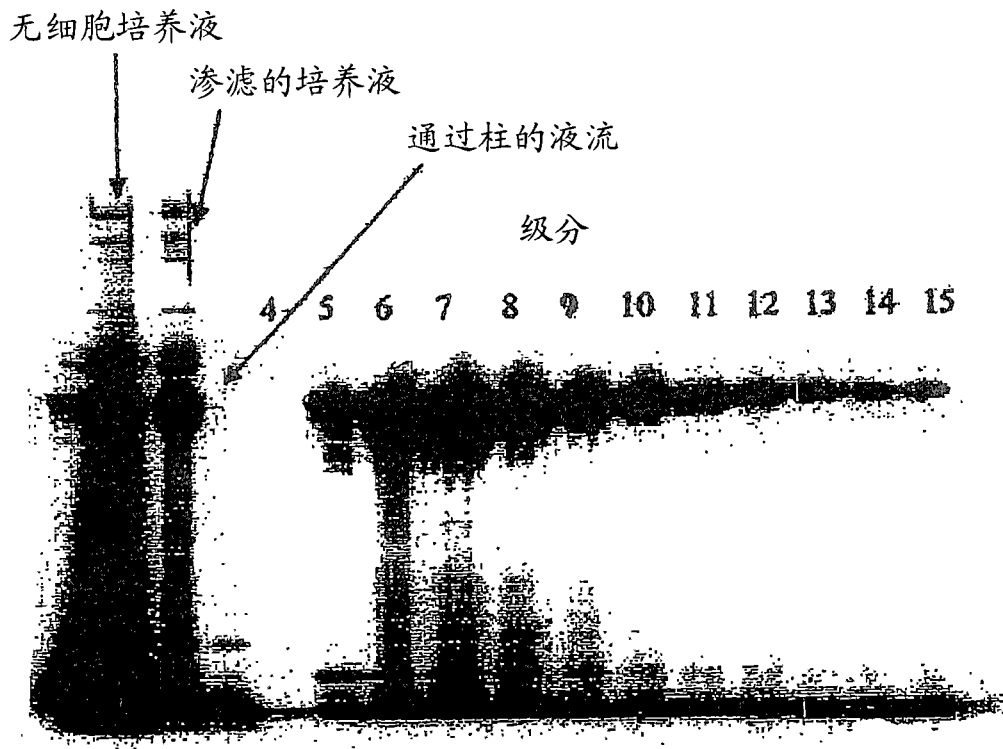


图 1

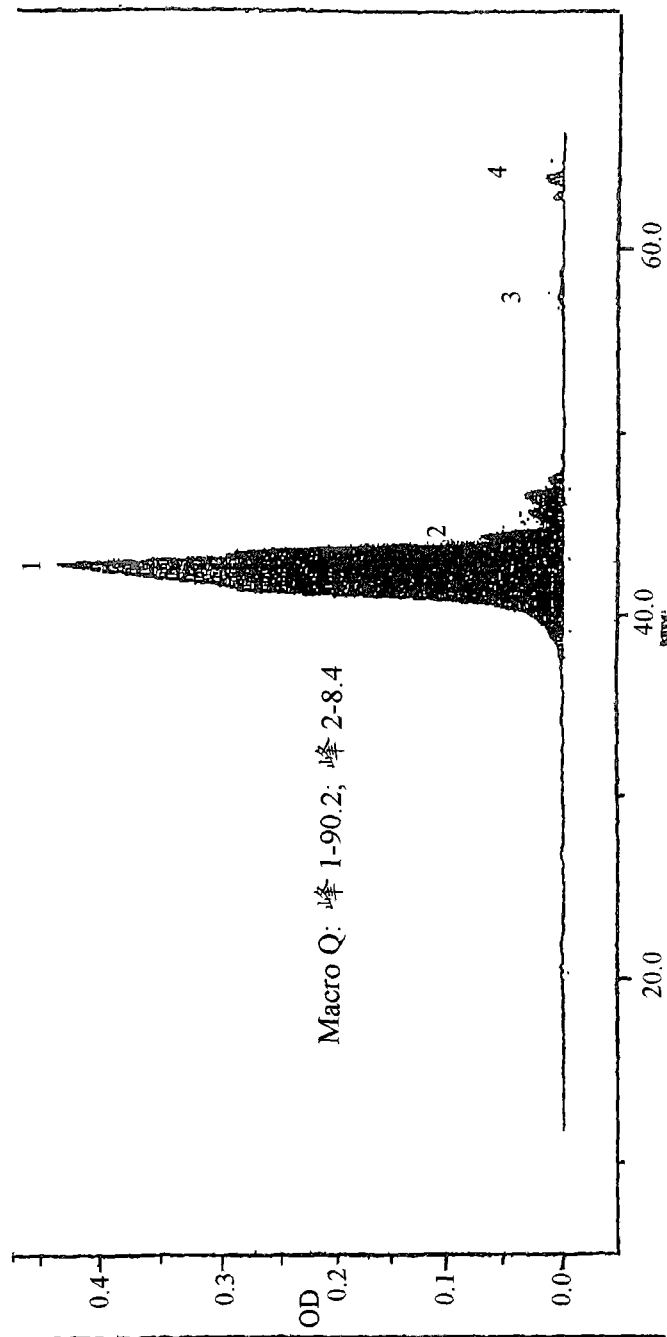


图 2

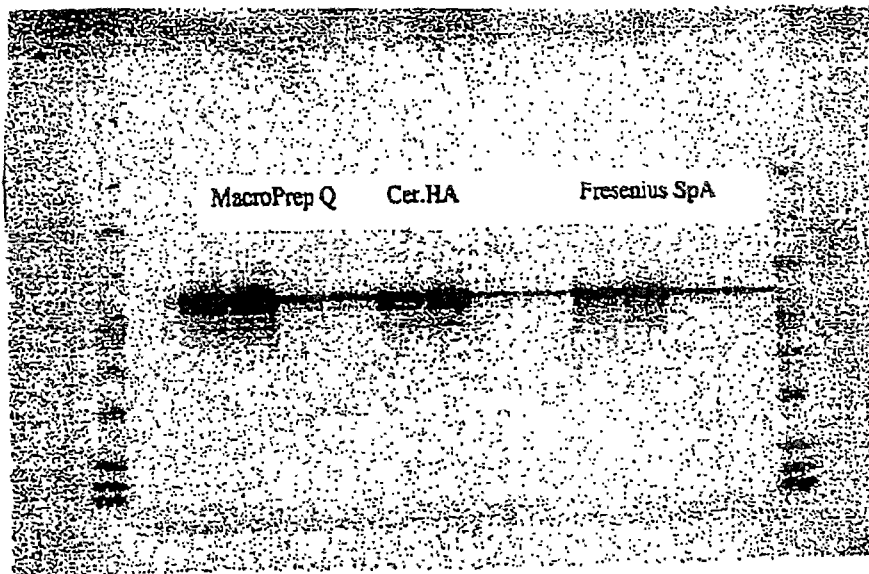


图 3

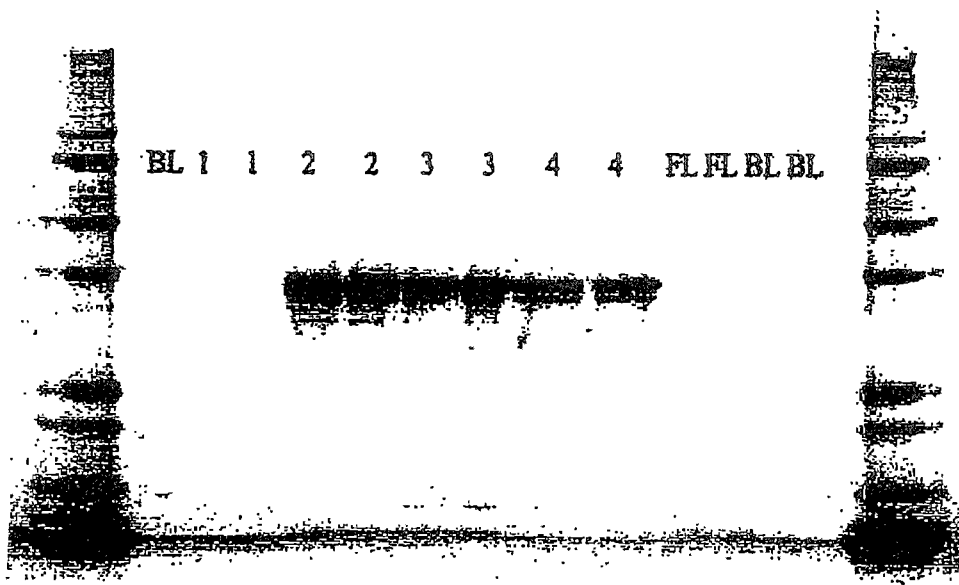


图 4

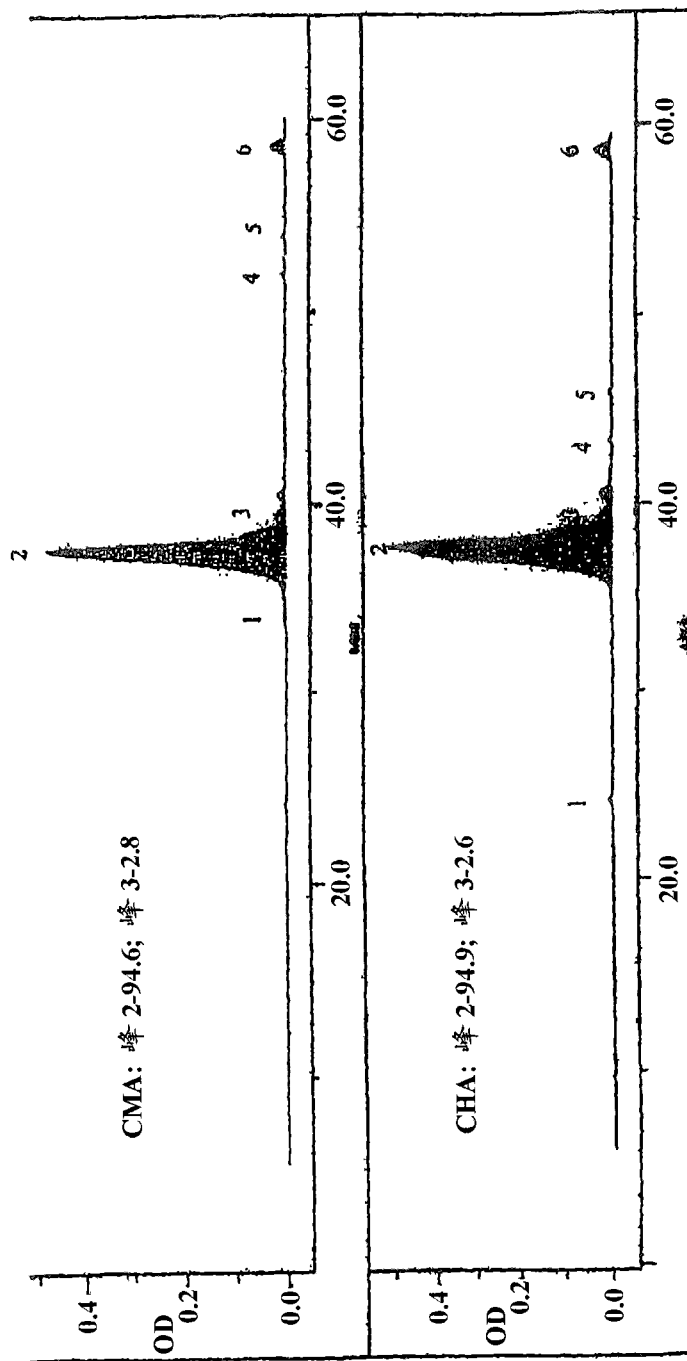


图 5