

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/00

B01J 20/26



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99112880. X

[43] 授权公告日 2003 年 2 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1100568C

[22] 申请日 1999.4.26 [21] 申请号 99112880. X

[71] 专利权人 中国科学院大连化学物理研究所

地址 116023 辽宁省大连市中山路 457 号

[72] 发明人 贾凌云 杨 利 邹汉法 张玉奎

[56] 参考文献

CN1003665A 1986.10.01 B01J20/26

CN1142984A 1997.02.19 B01J20/26

US4508833 1985.04.02 G01N31/08

US4689225 1987.08.25 A61K39/12

US5814320 1998.09.29 A61K39/00

审查员 刘克宽

[74] 专利代理机构 沈阳科苑专利代理有限责任公司

代理人 张 晨

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 用于从血浆中去除致病抗体及其复合物的蛋白免疫吸附介质的合成方法

[57] 摘要

一种用于从血浆中去除致病抗体及其复合物的蛋白免疫吸附介质的合成方法，合成过程依下述步骤进行：(1)用环氧氯丙烷活化 Sepharose CL-4B 琼脂糖凝胶，反应温度 40~80℃，时间 1~4 小时，环氧氯丙烷充分过量；(2)用环氧 Sepharose CL-4B 琼脂糖凝胶与 Protein A 直接反应合成免疫吸附介质，反应温度为 24~26℃，反应时间 16~20 小时，Protein A 充分过量，pH 值控制在 9~10 范围内；用甘氨酸乙酯盐酸盐或乙醇氨封闭未反应活性基团；放入保存液中。本发明可以取代溴化氰活化工艺，无毒、无害，且偶联 Protein A 效果好。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于从血浆中去除致病抗体及其复合物的蛋白免疫吸附介质的合成方法,其特征在于合成过程依下述步骤进行:

(1) 用环氧氯丙烷活化Sephacrose CL-4B琼脂糖凝胶,反应温度40~80℃,时间1~4小时,环氧氯丙烷充分过量;

(2) 用环氧Sephacrose CL-4B琼脂糖凝胶与Protein A直接反应合成免疫吸附介质,反应温度为24~26℃,反应时间16~20小时,Protein A充分过量,pH值控制在9~10范围内;

用甘氨酸乙酯盐酸盐或乙醇氨封闭未反应活性基团;
放入保存液中。

2. 一种用于从血浆中去除致病抗体及其复合物的蛋白免疫吸附介质的合成方法,其特征在于合成过程如下:

(1) 用环氧氯丙烷活化Sephacrose CL-4B琼脂糖凝胶,反应温度40~80℃,时间1~4小时,环氧氯丙烷充分过量;

(2) 用氨基或双氨基试剂对带有活性环氧基团的Sephacrose CL-4B进行开环反应,双氨基试剂选自乙二胺、丁二胺、己二胺之一种,反应温度为50~80℃,反应时间1~4小时,氨水或双氨基试剂充分过量;

(3) 用双醛基试剂与带有活性氨基的Sephacrose CL-4B反应得到醛基Sephacrose CL-4B,双醛基试剂选自戊二醛、对苯二甲醛之一种,反应温度为30~40℃,双醛基试剂充分过量,pH值控制在7.0~9.0;

(4) 用醛基Sephacrose CL-4B琼脂糖凝胶与Protein A直接反应合成免疫吸附介质,反应温度在24~26℃,反应时间16~20小时,Protein A充分过量,pH值控制在7.0~8.5范围内;

用甘氨酸乙酯盐酸盐或乙醇氨封闭未反应活性基团;
用硼氢化钠或氰基硼氢化钠还原反应中产生的双键;
放入保存液中。

用于从血浆中去除致病抗体及其复合物的蛋白免疫吸附介质的合成方法

本发明涉及一种Protein A免疫吸附介质的合成方法。具体的说是以Sephacrose CL-4B琼脂糖凝胶为基质,采用环氧氯丙烷活化的方法,用氨基作为开环试剂,醛基作为偶联基团与基因重组Protein A进行共价连接。这种合成方法无毒无害,Protein A与基质结合的可靠性高,对致病抗体及其复合物的吸附效果好。

免疫吸附疗法是近年来兴起的一种治疗疑难病症的新方法,其目的是通过在体外建立的人体血液循环支路使血液通过免疫吸附柱吸附除去患者血液中的致病物质,净化人体内环境,达到治疗疾病的目的。免疫吸附柱中含有的免疫吸附剂可与血液中的致病物质特异结合,而对血液中的其它成分则无损害。由于免疫吸附疗法是直接从血液中去去除致病物质,对于急危病人和恶性病症如癌症、艾滋病、自身免疫性疾病、内毒素休克等疗效显著,副作用小。国外应用免疫吸附的方法已成功地治疗了几千个病例,达到了抢救危重病人,延长病人生命的目的。免疫吸附治疗的关键是免疫吸附柱的研制,具体的说就是免疫吸附剂的选择及其与固载基质的偶联,免疫吸附剂与固载的固相基质形成的免疫吸附介质必须符合如下要求,才能进行人体治疗:

- (1) 吸附介质应具有较高的选择性,非特异吸附要小;
- (2) 吸附介质的血液相容性要好,即无毒、不溶解、不激活补体和凝血系统、不致敏;
- (3) 稳定性好,便于储存和消毒。

Protein A是某些金黄色葡萄球菌细胞壁上的一种蛋白质,其分子量为42000,其氨基末端有4个高度类同的Fc结合区,可与人血浆中的IgG及其免疫复合物的Fc段特异结合,Protein A与IgG及其免疫复合物结合后又可被pH 2.3~2.5的酸性溶液解离。人类的很多疾病都是由抗体和免疫复合物引起,如系统性红斑狼疮、血小板减少性紫癜、重症肌无力等,这些都是无法治愈的疑难病症,利用Protein A与抗体和免疫复合物特异结合的特性从血液中去掉这些致病物质,将明显地缓解病情。国外在这方面进行了大量的动物及临床实验,取得了很好的疗效。现在临

床上使用的商品化的Protein A免疫吸附柱(瑞典GABRO公司)采用的基质是Sephacrose CL-4B琼脂糖凝胶,与Protein A的偶联方式为溴化氰活化偶联,这种活化方法的缺点在于溴化氰是剧毒物质,合成过程对人体和环境危害较大,另一个缺点是有些实验证实,用溴化氰方法偶联的蛋白基团容易脱落(Tesser等,1974),因而这一合成工艺不甚理想。

本发明的目的在于提供一种用于从血浆中去除致病抗体及其复合物的蛋白免疫吸附介质的合成方法,该方法可以取代溴化氰活化工艺,无毒、无害,且偶联Protein A效果好。

本发明提供了一种用于从血浆中去除致病抗体及其复合物的蛋白免疫吸附介质的合成方法,其特征在于合成过程依下述步骤进行:

(1)用环氧氯丙烷活化Sephacrose CL-4B琼脂糖凝胶,反应温度40~80℃,时间1~4小时,环氧氯丙烷充分过量;

(2)用环氧Sephacrose CL-4B琼脂糖凝胶与Protein A直接反应合成免疫吸附介质,反应温度为24~26℃,反应时间16~20小时,Protein A充分过量,pH值控制在9~10范围内;

用甘氨酸乙酯盐酸盐或乙醇氨封闭未反应活性基团;
放入保存液中。

本发明还提供了另一种用于从血浆中去除致病抗体及其复合物的蛋白免疫吸附介质的合成方法,其特征在于合成过程如下:

(1)用环氧氯丙烷活化Sephacrose CL-4B琼脂糖凝胶,反应温度40~80℃,时间1~4小时,环氧氯丙烷充分过量;

(2)用氨基或双氨基试剂对带有活性环氧基团的Sephacrose CL-4B进行开环反应,双氨基试剂选自乙二胺、丁二胺、己二胺之一种,反应温度为50~80℃,反应时间1~4小时,氨水或双氨基试剂充分过量;

(3)用双醛基试剂与带有活性氨基的Sephacrose CL-4B反应得到醛基Sephacrose CL-4B,双醛基试剂选自戊二醛、对苯二甲醛之一种,反应温度为30~40℃,双醛基试剂充分过量,pH值控制在7.0~9.0;

(4)用醛基Sephacrose CL-4B琼脂糖凝胶与Protein A直接反应合成免疫吸附介质,反应温度在24~26℃,反应时间16~20小时,Protein A充分过量,pH值控制在7.0~8.5范围内;

用甘氨酸乙酯盐酸盐或乙醇氨封闭未反应活性基团；
用硼氢化钠或氰基硼氢化钠还原反应中产生的双键；
放入保存液中。

本发明中采用0.2 mol/l pH=2.3甘氨酸-HCl缓冲液作为洗脱液,用0.1 mol/l pH=7.4的磷酸缓冲液作平衡液,用含0.02~0.1%迭代钠的0.1 mol/l pH=7.4的磷酸缓冲液作保存液。

本发明提供的上述两种方法中第二种更为优越。

本发明中采用的基质为Sepharose CL-4B琼脂糖凝胶,采用的Protein A为基因重组产品,纯度达98%以上。实验证明Sepharose CL-4B琼脂糖凝胶是一种优良的免疫吸附基质,满足血液净化对免疫吸附介质的要求,基因重组Protein A比从金黄色葡萄球菌中提纯的Protein A纯度高、毒性小、价格低。实验过程中活性基团与介质间的键合均为共价连接,将Protein A泄漏降到最低。下面通过实施例详述本发明。

实施例1 带有活性环氧基团的Sepharose CL-4B琼脂糖凝胶的合成

在装有搅拌器、温度计及冷凝器的100 ml三口烧瓶中,加Sepharose CL-4B 10 ml,1 mol/l NaOH溶液10.5 ml,加热升温至40℃,加入环氧氯丙烷10 ml,在40℃恒温反应2小时,反应过程中要搅拌均匀。停止反应,降至室温后,用大量的水洗去未反应的环氧氯丙烷和氢氧化钠,滤干备用。

实施例2 带有氨基活性基团的Sepharose CL-4B琼脂糖凝胶的合成

在装有搅拌器、温度计及冷凝器的100 ml三口烧瓶中,加带有活性环氧基团的Sepharose CL-4B 10 ml,加入己二胺5 ml,加去离子水20 ml,50℃恒温反应2小时,反应停止后,用大量的水洗至中性,滤干备用。

实施例3 带有醛基活性基团的Sepharose CL-4B琼脂糖凝胶的合成

在装有搅拌器、温度计及冷凝器的100 ml三口烧瓶中,加带有活性氨基的Sepharose CL-4B 10 ml,加入戊二醛4 ml,用硼酸盐或磷酸盐作缓冲液,pH值控制在9.0范围内,加入缓冲液20 ml,30℃恒温反应2小时,反应停止后,用大量的水洗去所用的戊二醛,滤干备用。

实施例4 由环氧Sepharose CL-4B琼脂糖凝胶与Protein A直接反应合成免疫吸附介质

在装有搅拌器、温度计及冷凝器的100 ml三口烧瓶中,加环氧Sepharose CL-

4B 10 ml, 0.5 mol/l的 NaHCO_3 - Na_2CO_3 缓冲溶液20ml, pH=10, 将60 mg Protein A加入其中, 在25℃恒温反应20小时, 停止反应, 回收未反应的Protein A, 用甘氨酸乙酯盐酸盐或乙醇氨封闭未反应活性基团, 用水冲洗干净未反应组分, 保存在50 mmol/l pH=7.0的磷酸缓冲液中, 加入0.02~0.1%的迭代钠作防腐剂。用紫外法吸光度检测Protein A的键合量为2.0 mg/ml, 结合IgG量15 mg/ml。

实施例5 醛基Sephrose CL-4B琼脂糖凝胶与Protein A直接反应合成免疫吸附介质

在装有搅拌器、温度计及冷凝器的100 ml三口烧瓶中, 加醛基Sephrose CL-4B 10 ml, 加入0.1 mol/l的磷酸或硼酸缓冲液20 ml, pH值控制在7.0~8.5范围内, 加入60 mg Protein A, 在25℃恒温反应20小时, 停止反应, 回收未反应的Protein A, 用甘氨酸乙酯盐酸盐或乙醇氨封闭未反应活性基团, 用硼氢化钠或氰基硼氢化钠还原反应中产生的双键, 用水冲洗干净未反应组分, 保存在0.1 mol/l pH=7.4的磷酸缓冲液中, 加入0.02~0.1%的迭代钠作防腐剂。用紫外法检测Protein A的键合量为4.0 mg/ml, 结合IgG量25 mg/ml。

实施例6 Protein A免疫吸附柱的离体实验

按上述合成方法合成Protein A免疫吸附介质60 ml, 其中Protein A的键合量为168 mg, 装于 $\Phi 40 \times 50$ 的柱中, 用生理盐水充分冲洗柱子, 将体重25 Kg的狗麻醉, 从狗的股动脉中抽取肝素化血液600 ml, 分离出血浆300 ml, 以30 ml/min的速度过柱后与血球混合一同注入狗的股静脉中。用生理盐水冲出柱中血浆直到在280 nm的吸收值为零, 用0.2 mol/l pH=2.3甘氨酸-HCl缓冲液洗脱柱中吸附的抗体及其免疫复合物, 由于是健康的狗, 免疫复合物很少, 吸附物主要为抗体, 检测洗脱下的抗体量为1.08 g, 用0.1 mol/l pH=7.4的磷酸缓冲液平衡柱子, 加入0.02~0.1%的迭代钠作防腐剂备用。在实验过程中及实验后, 狗的生理状态未发生改变。

实施例7 Protein A免疫吸附柱在体外建立血液循环支路进行连续实验

按上述合成方法合成Protein A免疫吸附介质120 ml, 等量装入两根 $\Phi 40 \times 50$ 的柱中, 其中每根柱子Protein A的键合量均为168 mg。用生理盐水充分冲洗柱子, 将体重13 Kg的狗麻醉, 实验前将动脉端、静脉端的切换管路连接好, 充分熏蒸达到无菌要求, 接好免疫吸附柱, 用生理盐水大量冲洗, 置换出里面的叠代钠, 管路、柱子全部肝素化。狗全身麻醉后, 颈动脉插管测血压、脉搏、血流等, 血从狗的后腿股动脉引出, 经膜分离器将血液分成血球、血浆两部分, 血浆流过柱1系统, 柱2

系统关闭,过柱血浆与血球在混合器中混合,输入狗体内,运行10~15分钟以后,关闭柱1系统入口,开起柱2系统,将柱1系统中的血浆用约50 ml生理盐水顶出,进入混合器。关闭柱1系统出口,柱1系统进行洗脱、平衡过程,先通过250 ml的洗脱液洗去吸附的蛋白,再用约150 ml的平衡缓冲液平衡柱子,用约150 ml的生理盐水冲洗掉平衡缓冲液,再生过程完毕。开起柱1系统入口,同时关闭柱2系统入口,重复以上操作。每个柱各切换3次,其间共取血样4次进行各种指标的检测。两个血泵流速,A泵:80 ml/min,B泵:40 ml/min。指标检测结果表明,经过1小时的实验,从狗的血浆中共去除6.5克抗体,狗的生理指标、生化指标、血常规等未发生变化,麻醉苏醒后,生理活动恢复正常。同一条狗进行两次实验,获得了类似的结果。

以上结果证实,Protein A免疫吸附柱具有较好的安全性和可靠性。