



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101274956 B

(45) 授权公告日 2011. 10. 05

(21) 申请号 200810027373. 2

(22) 申请日 2008. 04. 11

(73) 专利权人 三九集团湛江开发区双林药业有限公司

地址 524005 广东省湛江市海滨三路 40 号

(72) 发明人 朱光祖 吕应年

(74) 专利代理机构 广州新诺专利商标事务有限公司 44100

代理人 刘菁菁

(51) Int. Cl.

C07K 1/18(2006. 01)

C07K 1/34(2006. 01)

C07K 1/14(2006. 01)

C07K 14/81(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1900107 A, 2007. 01. 24, 全文.

CN 101134776 A, 2008. 03. 05, 说明书第 5 页第 2-3 段.

朱威等. α 1- 抗胰蛋白酶制剂的制备

及其病毒灭活. 中国生物制品学杂志 14

2. 2001, 14(2), 97-101.

李炜. 人血浆 α 1- 抗胰蛋白酶的纯化和鉴定. 中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士)医药卫生科技辑 第 6 期. 2006, (第 6 期), 摘要, 第 11 页第 1-2 段, 最后一段, 第 12 页最后一段, 第 13 页第 1-3 段, 第 42 页第 1 段.

祝慈芳等. α 1- 抗胰蛋白酶的制备及其防治急性肺损伤的疗效. 中国生物制品学杂志 17 1. 2004, 17(1), 39-41.

审查员 王翔宇

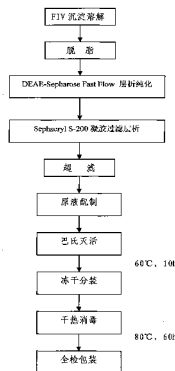
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

从人血浆组分 FIV 沉淀中分离纯化 α 1- 抗胰蛋白酶的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种人血浆组分 FIV 沉淀中分离纯化 α 1- 抗胰蛋白酶的方法, 其特征在于包括以下步骤: (A) 血浆沉淀预处理; (B) 阴离子凝胶层析; (C) 凝胶过滤层析; (D) 超滤脱盐浓缩; (E) 巴氏病毒灭活; (F) 冻干分装; (G) 干热消毒。本发明是以人血白蛋白生产过程中产生的弃料 FIV 组分沉淀为原料, 采用层析技术分离纯化一种蛋白酶抑制剂即 α 1- 抗胰蛋白酶 (α 1-antitrypsin, α 1-AT), 建立 α 1-AT 浓缩制剂的生产工艺。本方法制备的产品纯度好、收率高, 操作简单易行, 同时占用设备少、劳动强度小、能耗低, 以白蛋白生产的废弃物料作原料, 生产成本低。



1. 一种从人血浆组分 FIV 沉淀中分离纯化 α 1-抗胰蛋白酶的方法,其特征在于包括以下步骤:

(A) 血浆沉淀预处理:取 FIV 沉淀加溶解液稀释到蛋白含量 2%~5%, pH8.0~8.5, 离子强度 0.09-0.12, 温度控制在 2~8°C 搅拌过夜,按照 0.5%~15%的比例 (W/V) 加入硅酸盐助剂在 2-8°C 搅拌 1h, 固液分离,取上清液,按照 0.5%-15%的比例 (W/V) 再次加入硅酸盐助剂在 2-8°C 搅拌 3h, 固液分离,取上清液进样层析柱,其中溶解液为 8~18mM 的磷酸盐缓冲液或 30~35mM 的醋酸盐缓冲液;溶解液中添加的助剂为硅藻土或珍珠岩,添加量为每 100 毫升溶解液添加 0.5 克-15 克;

(B) 阴离子凝胶层析:取凝胶,室温放置达到温度平衡后装柱,以缓冲液洗脱平衡, pH6.0~6.5, 平衡量为柱体积的 8~12 倍,将上清液上样于平衡好的层析柱,用缓冲液洗脱, pH6.0~6.5, 温度控制在 2~8°C, 洗柱 8~10 倍柱体积,于紫外光 280nm 波长下自动监测,记录层析图谱,选择性地收集以含有 α 1-AT 即 α 1-抗胰蛋白酶为主要成分的组分,其中离子交换层析填料为 DEAF-SepharoseFast Flow 凝胶,洗脱液为 8~18mM 的磷酸盐缓冲液或 30~35mM 的醋酸盐缓冲液或 12~25mM 的柠檬酸盐缓冲液,流速控制在 2.0~4.5L/h;

(C) 凝胶过滤层析:取凝胶,室温放置达到温度平衡后装柱,以缓冲液平衡,将层析后收集的 α 1-AT 的组分调至 pH 7.0-7.5,上样于平衡好的 SephacrylS-200 柱,用相同的缓冲液洗脱,同时于紫外光 280nm 波长下自动监测,记录层析图谱,选择性地收集 α 1-AT 的组分,其中凝胶过滤层析填料为 SephacrylS-200 凝胶,洗脱液为 8~18mM 的磷酸盐缓冲液或 30~35mM 的醋酸盐缓冲液或 12~25mM 的柠檬酸盐缓冲液, pH7.0-7.5, 洗脱量为柱体积的 8-12 倍,流速控制在每小时 1.5~3.5 倍柱体积,洗脱温度控制在 2-8°C;

(D) 超滤脱盐浓缩;

(E) 巴氏病毒灭活:将浓缩蛋白液加无热原注射用水稀释,加入保护剂,于 $60 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 保温 8~12 小时,灭活血浆蛋白制品中的病毒,其中巴氏消毒的保护剂为甘氨酸和麦芽糖混合保护剂,甘氨酸含量控制在 45-55mM,麦芽糖含量控制在 25%-35%;

(F) 冻干分装:巴氏灭活的 α 1-AT 蛋白液经除菌过滤,转入冻干机真空冻干;

(G) 干热消毒:分装的冻干粉针放置于保温库中保温,灭活病毒,转入成品库全检包装,其中冻干制品的保温温度为 80°C ,保温时间为 60~72 小时。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述步骤 A 中的固液分离采用高速离心分离或板框加压过滤,分离温度控制在 4°C ,固液分离后上清液调节到 pH5.5-6.5。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述步骤 D 是将经层析纯化的 α 1-AT 溶液泵入超滤机,用无热原注射用水超滤脱盐,超滤膜截留分子量为 100KD。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:步骤 E 稀释到蛋白含量控制在 1.5%-2.5%, pH6.4-6.8。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:步骤 F 中所述除菌过滤采用的除菌膜孔径 0.22 μm ,真空冻干含水量控制在 3%以下。

从人血浆组分 FIV 沉淀中分离纯化 α 1-抗胰蛋白酶的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种 α 1-抗胰蛋白酶的制备方法,尤其是从人血浆组分沉淀中分离纯化 α 1-抗胰蛋白酶的方法。

背景技术

[0002] α 1-AT 主要是由肝细胞合成的一种糖蛋白,分子量 54KD,体内半衰期 6d。 α 1-AT 是人血浆中最丰富的一种丝氨酸蛋白酶抑制剂,能抑制多种丝氨酸内切肽酶,如抑制弹性蛋白酶、胰蛋白酶、纤溶酶、胶原酶、凝血酶和 Hageman 因子等的活性。 α 1-AT 是血液中最主要的抗胰蛋白酶,占血清胰蛋白酶抑制活性的 90%以上。 α 1-AT 具有较强的血管通透性,在肺组织中浓度高,而且对弹性蛋白酶活性更专一,它的主要生理功能是抑制肺部弹性蛋白酶的活性,保护肺部不受弹性蛋白酶的酶解损伤。

[0003] 人体血浆中 α 1-AT 缺乏直接相关的疾病主要是肺和肝脏疾病。如阻塞性肺气肿、新生儿或成人呼吸窘迫综合征、肺部囊性纤维化、儿童肝硬化和新生儿肝炎等,病情严重导致患儿夭折。

[0004] 对于 α 1-AT 缺乏症的治疗主要是进行替代治疗和基因治疗。但由于基因疗法目前尚处于实验阶段,具有一定的局限性,因此 α 1-AT 替代或补充治疗此类疾病是主要方法。我国目前尚无该产品的生产,市场需求主要依靠进口产品来满足。

[0005] 国内外都开展了 α 1-AT 的生产研究。Gadek 等应用两步沉淀过程制备临床应用的 α 1-AT 浓缩制剂, α 1-AT 仅占浓缩制剂蛋白总量的 5%。Glaser 等建立了独特的 α 1-AT 制备工艺,采用二硫苏糖醇处理结合硫酸铵沉淀,DEAE-纤维素层析,从 Cohn's 低温乙醇工艺的废弃组分 FIV-1 中提纯出纯度 70%的 α 1-AT 浓缩制剂。朱威等^[9]从 Cohn 组分 FIV 中提纯 α 1-AT。将 Cohn 组分 FIV 抽提液经沉淀,超滤,离子交换及凝胶过滤后,提纯 α 1-AT,用巴氏法灭活病毒,并考察其效果。用免疫单扩散、双向交叉免疫电泳、SDS-PAGE 及合成基质法检测 α 1-AT 蛋白活性,用区带扫描法测其纯度达 90%以上。

[0006] 上述工艺主要采用沉淀法或沉淀结合层析法纯化 α 1-AT,产品纯度在 70% -90% 左右,纯度较低;本发明采用两步层析法纯化,设备仪器少,操作简单易行,产品纯度高, α 1-AT 电泳纯度达到 98%。

发明内容

[0007] 本发明的目的是为了弥补现有技术的不足,提供一种新的从人血浆组分 FIV 沉淀中分离纯化 α 1-抗胰蛋白酶的方法,以降低生产成本及提高纯度。

[0008] 为了达到上述发明目的,本发明采用了以下技术方案:

[0009] 一种从人血浆组分 FIV 沉淀中分离纯化 α 1-抗胰蛋白酶的方法,其特征在于包括以下步骤:

[0010] (A) 血浆沉淀预处理:取 FIV 沉淀加溶解液稀释到蛋白含量 2%~5%, pH8.0~8.5,离子强度 0.09-0.12,温度控制在 2~8℃搅拌过夜,按照 0.5%~15%的比例 (W/V)

加入硅酸盐助剂在 2-8℃ 搅拌 1h, 固液分离, 取上清液, 按照 0.5% -15% 的比例 (W/V) 再次加入硅酸盐助剂在 2-8℃ 搅拌 3h, 固液分离, 取上清液进样层析柱;

[0011] (B) 阴离子凝胶层析: 取凝胶, 室温放置达到温度平衡后装柱, 以缓冲液洗脱平衡, pH6.0 ~ 6.5, 平衡量为柱体积的 8 ~ 12 倍, 将上清液上样于平衡好的层析柱, 用缓冲液洗脱, pH6.0 ~ 6.5, 温度控制在 2 ~ 8℃, 洗柱 8 ~ 10 倍柱体积, 于紫外光 280nm 波长下自动监测, 记录层析图谱, 选择性地收集以含有 $\alpha 1$ -AT 为主要成分的组分;

[0012] (C) 凝胶过滤层析: 取凝胶, 室温放置达到温度平衡后装柱, 以缓冲液平衡, 将层析后收集的 $\alpha 1$ -AT 的组分调至 pH 7.0-7.5, 上样于平衡好的 Sephacryl5-200 柱, 用相同的缓冲液洗脱, 同时于紫外光 280nm 波长下自动监测, 记录层析图谱, 选择性地收集 $\alpha 1$ -AT 的组分;

[0013] (D) 超滤脱盐浓缩;

[0014] (E) 巴氏病毒灭活: 将浓缩蛋白液加无热原注射用水稀释, 加入保护剂, 于 60±0.5℃ 保温 8 ~ 12 小时, 灭活血浆蛋白制品中的病毒;

[0015] (F) 冻干分装: 巴氏灭活的 $\alpha 1$ -AT 蛋白液经除菌过滤, 转入冻干机真空冻干;

[0016] (G) 干热消毒: 分装的冻干粉针放置于保温库中保温, 灭活病毒, 转入成品库全检包装。

[0017] 本发明是以人血白蛋白生产过程中产生的弃料 FIV 组分沉淀为原料, 采用层析技术分离纯化一种蛋白酶抑制剂即 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶 ($\alpha 1$ -antitrypsin, $\alpha 1$ -AT), 建立 $\alpha 1$ -AT 浓缩制剂的生产工艺。本方法制备的产品纯度好、收率高, 操作简单易行, 同时占用设备少、劳动强度小、能耗低, 以白蛋白生产的废弃物料作原料, 生产成本低。

附图说明

[0018] 图 1 为工艺流程图。

具体实施方式

[0019] 本发明提供的技术方案是 $\alpha 1$ -AT 浓缩制剂的生产工艺, 工艺步骤如下:

[0020] (A) FIV 沉淀预处理

[0021] 取 FIV 沉淀加 8 ~ 18mM 的磷酸或 30 ~ 35mM 的醋酸盐缓冲液稀释到蛋白含量 2% -5%, pH8.0-8.5, 离子强度 0.09-0.12, 温度控制 2-8℃ 搅拌过夜。按照 0.5% -15% 的比例 (W/V) 加入硅酸盐助剂, 2-8℃ 搅拌 1h, 固液分离, 分离温度控制在 4℃, 取上清液, 按照 0.5% -15% 的比例 (W/V) 加入硅酸盐助剂, 2-8℃ 搅拌 3h, 调节溶液 pH5.5-6.5, 固液分离, 温度控制在 4℃, 取上清液进样层析柱。

[0022] 硅酸盐助剂为硅藻土、珍珠岩, 添加剂的用量为每 100 毫升溶解液添加 0.5 克 -15 克。

[0023] (B) 离子交换层析

[0024] 取出 DEAF-Sepharose Fast Flow 凝胶, 室温放置达到温度平衡后装柱, 以 8 ~ 18mM 的磷酸盐缓冲液、30 ~ 35mM 的醋酸盐缓冲液或 12 ~ 25mM 的柠檬酸盐缓冲液洗脱平衡, pH6.0-6.5, 平衡量为柱体积的 8-12 倍。将上清液上样于平衡好的层析柱, 用 8 ~ 18mM 的磷酸盐缓冲液、30 ~ 35mM 的醋酸盐缓冲液或 12 ~ 25mM 的柠檬酸盐缓冲液洗脱,

pH6.0~6.5,流速控制在每小时 2.0~4.5 倍柱体积,温度控制在 2~8℃,洗柱 8~10 倍柱体积。于紫外光 280nm 波长下自动监测,记录层析图谱,选择性地收集以含有 a1-AT 为主要成分的组分。

[0025] (C) 凝胶过滤层析

[0026] 取 Sephacryl S-200 凝胶,室温放置达到温度平衡后装柱,以 8~18mM 的磷酸盐缓冲液、30~35mM 的醋酸盐缓冲液或 12~25mM 的柠檬酸盐缓冲液平衡,pH7.0~7.5,平衡量为柱体积的 8~12 倍。将层析后收集的 a 1-AT 的组分调至 pH 7.0~7.5,上样于平衡好的 SephacrylS-200 柱,用相同的缓冲液洗脱,洗脱量为柱体积的 8~12 倍,流速控制在每小时 1.5~3.5 倍柱体积,洗脱温度控制在 2~8℃。同时于紫外光 280nm 波长下自动监测,记录层析图谱,选择性地收集 a 1-AT 的组分。

[0027] (D) 超滤脱盐浓缩

[0028] 经层析纯化的 a 1-AT 溶液泵入超滤机,用无热原注射用水超滤脱盐,超滤膜截留分子量为 100KD。

[0029] (E) 巴氏消毒

[0030] 将浓缩蛋白液加无热原注射用水稀释到蛋白含量 1.5%~2.5%,pH6.4~6.8,加入甘氨酸和麦芽糖作为巴氏消毒的混合保护剂,甘氨酸含量控制在 45~55mM,麦芽糖含量控制在 25%~35%于 60±0.5℃保温 10 小时,灭活血浆蛋白制品中的病毒。

[0031] (F) 冻干分装

[0032] 巴氏灭活的 a 1-AT 蛋白液过 0.22 μm 微孔滤膜除菌过滤,转入冻干机真空冻干,含水量控制在 3%以下,冻干粉按 500mg 蛋白 / 瓶分装,转入待检品库。

[0033] (G) 干热消毒

[0034] 分装的冻干粉针放置于 80℃保温库中,保温 60~72 小时灭活病毒,转入成品库全检包装。

[0035] 实施例 1:

[0036] (1)FIV 沉淀预处理

[0037] 称取 Cohn 法组分沉淀 FIV 3kg,加入 15mM, pH8.0 的磷酸氢二钠一磷酸二氢钠缓冲溶液 50L,于 2~8℃搅拌过夜,加入 3kg 硅藻土,在 2~8℃搅拌 1 小时,高速离心分离,温度控制在 4℃,滤液中加入珍珠岩 1.5kg,2~8℃搅拌 3h,以 1M HCl 调溶液 pH6.2,高速离心分离,温度控制在 4℃,取上清液为层析上柱液。

[0038] (2)DEAE-Sephacryl Fast Flow 阴离子交换层析

[0039] 取出 DEAF-Sephacryl Fast Flow 凝胶,室温放置以达到温度平衡,取 6L 凝胶装柱,以 15mM, pH6.0 的磷酸钠缓冲液平衡洗柱,平衡液用量 8 倍柱体积。将上柱液 10L 上样于平衡好的 DEAF-Sephacryl Fast Flow 柱 (9.5×110cm),用 pH6.0,15mM 的磷酸钠缓冲液洗柱,洗柱液用量 8 倍柱体积,流速 2.2L/h,以 pH6.0,20mM 的柠檬酸一柠檬酸钠缓冲液洗脱,流速 3.2L/h,洗脱温度控制在 2~8℃。同时于紫外光 280nm 波长下自动监测,记录层析图谱,选择性收集含有 a 1-AT 为主要成分的组分。

[0040] (3)Sephacryl S-200 凝胶过滤层析

[0041] 取 Sephacryl S-200 凝胶 5L,于室温放置 2h 达到温度平衡后装柱,以 15mM, pH7.0 的磷酸钠缓冲液平衡洗柱,平衡液用量 10 倍柱体积,以 1M NaOH 溶液将层析后收集的 a

1-AT 组分调至 pH7.2, 上样于平衡好的 SephacrylS-200 柱 (7.5×90cm), 用相同的缓冲液以 1.8L/h 的流速洗脱, 洗脱温度控制在 2-8℃。同时于紫外光 280nm 波长下自动监测, 记录层析图谱, 选择性地收集 a 1-AT 的组分。

[0042] (4) 超滤脱盐浓缩

[0043] 经层析纯化的 a 1-AT 溶液泵入超滤机, 用无热原注射用水 550L 超滤脱盐, 超滤膜截留分子量为 100KD, 浓缩到蛋白含量 12%。

[0044] (5) 巴氏消毒

[0045] 从超滤器中泵出蛋白浓缩液, 加无热原注射用水稀释到蛋白含量 2%, 加入 55mM 甘氨酸和 25% 麦芽糖作为巴氏消毒的保护剂。蛋白溶液于 60±0.5℃ 保温 10 小时, 灭活血浆蛋白制品中的病毒。

[0046] (6) 冻干分装

[0047] 巴氏灭活的 a 1-AT 蛋白液真空冻干, 含水量控制在 3% 以下, 冻干粉按照 500mg 蛋白 / 瓶无菌分装, 转入待检品库。

[0048] (7) 干热消毒 / 全检包装

[0049] 冻干品置 80℃ 保温库放置 60 小时灭活制品病毒, 转入成品库全检包装。成品检测结果如下表 1:

[0050] 表 1

[0051]

检测项目	方法	测定值	结论
蛋白含量	凯氏定氮法	2.08%	合格
纯度	电泳法	98.8%	合格
纯度	HPLC 法	96.4%	合格
分子量	SDS-PAGE 电泳	54.8KD	合格
等电点	等电聚焦电泳	PI4.58	合格
鉴别试验	免疫双扩散法	产品与抗人血清形成沉淀线, 与阴性对照品不产生沉淀线	合格
活性	胰蛋白酶抑制法	720±30IU/mg	合格

[0052] 实施例 2

[0053] (1) FIV 沉淀预处理

[0054] 称取 Cohn 法组分沉淀 FIV 3kg, 加入 50L 30mM 的醋酸钠缓冲溶液, 于 2~8℃ 搅拌过夜, 加入 3kg 硅藻土, 在 2~8℃ 搅拌 1 小时, 进样板框滤器加压过滤, 温度控制在 4℃, 滤液中加入珍珠岩 1.5kg, 2-8℃ 搅拌 3h, 以 1M HCl 调溶液 pH6.2, 进样板框滤器加压过滤, 温度控制在 4℃, 取上清液为层析上柱液。

[0055] (2) DEAE-Sephacryl Fast Flow 阴离子交换层析

[0056] 取出 DEAE-Sephacryl Fast Flow 凝胶, 室温放置以达到温度平衡, 取 6L 凝胶装柱, 以 30mM, pH6.0 的醋酸钠缓冲溶液平衡洗柱, 平衡液用量 12 倍柱体积。将上柱液 10L 上样于平衡好的 DEAE-Sephacryl Fast Flow 柱 (9.5×110cm), 用 30mM, pH6.0 的醋酸钠缓冲溶液洗柱, 洗柱液用量 10 倍柱体积, 流速 2.0L/h, 以 pH6.0, 20mM 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液洗脱, 流速 4.5L/h, 洗脱温度控制在 2-8℃。同时于紫外光 280nm 波长下自动监测, 记录层析图谱, 选择性收集含有 a₁-AT 为主要成分的组分。

[0057] (3) Sephacryl S-200 凝胶过滤层析

[0058] 取 Sephacryl S-200 凝胶 5L, 于室温放置 2h 达到温度平衡后装柱, 以 30mM, pH7.2 的醋酸钠缓冲溶液平衡洗柱, 平衡液用量 10 倍柱体积, 以 1MNaOH 溶液将层析后收集的 a₁-AT 组分调至 pH7.2, 上样于平衡好的 Sephacryl S-200 柱 (7.5×90cm), 用相同的缓冲液以 1.5L/h 的流速洗脱, 洗脱温度控制在 2-8℃。同时于紫外光 280nm 波长下自动监测, 记录层析图谱, 选择性地收集 a₁-AT 的组分。

[0059] (4) 超滤脱盐浓缩

[0060] 经层析纯化的 a₁-AT 溶液泵入超滤机, 用无热原注射用水 550L 超滤脱盐, 超滤膜截留分子量为 100KD, 浓缩到蛋白含量 12%。

[0061] (5) 巴氏消毒

[0062] 从超滤器中泵出蛋白浓缩液, 加无热原注射用水稀释到蛋白含量 2%, 加入 55mM 甘氨酸和 32% 麦芽糖作为巴氏消毒的保护剂。蛋白溶液于 60±0.5℃ 保温 10 小时, 灭活血浆蛋白制品中的病毒。

[0063] (6) 冻干分装

[0064] 巴氏灭活的 a₁-AT 蛋白液真空冻干, 含水量控制在 3% 以下, 冻干粉按照 500mg 蛋白 / 瓶无菌分装, 转入待检品库。

[0065] (7) 干热消毒 / 全检包装

[0066] 冻干品置 80℃ 保温库放置 72 小时灭活制品病毒, 转入成品库全检包装。

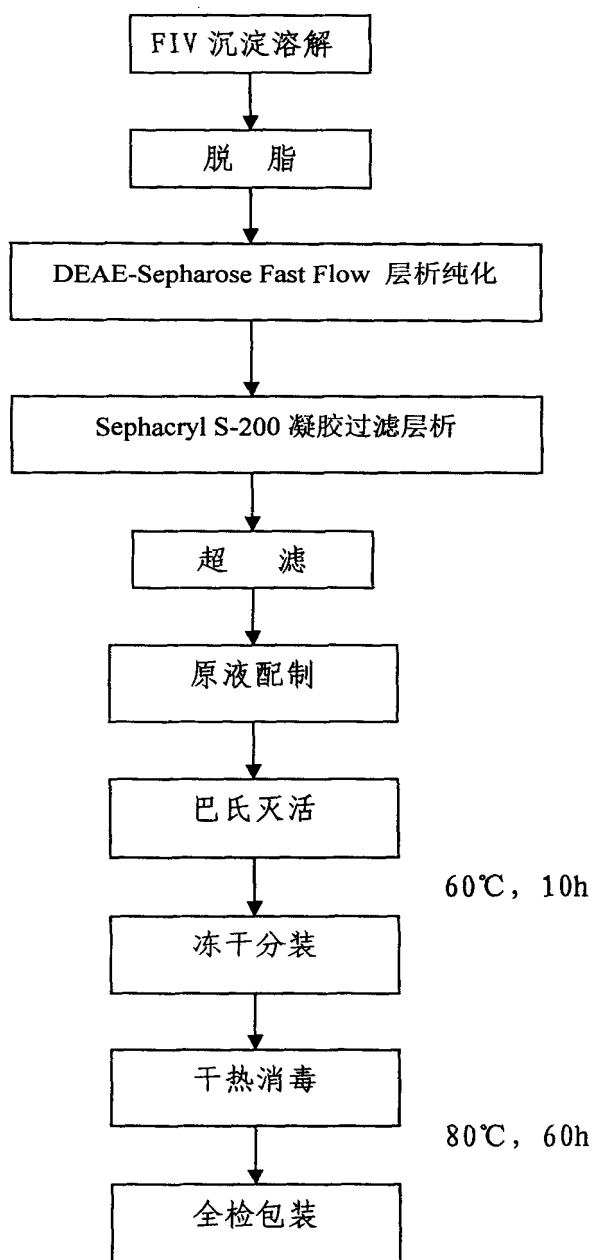


图 1