

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 1/30 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01805646.6

[45] 授权公告日 2007 年 5 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 1313493C

[22] 申请日 2001.10.24 [21] 申请号 01805646.6

[30] 优先权

[32] 2000.10.24 [33] JP [31] 324030/00

[86] 国际申请 PCT/JP2001/009336 2001.10.24

[87] 国际公布 WO2002/034787 日 2002.5.2

[85] 进入国家阶段日期 2002.8.26

[73] 专利权人 财团法人化学及血清疗法研究所
地址 日本熊本县

[72] 发明人 野内俊伸 沟上宽 田嶋义高
宫津嘉信 坂口正浩 屋宜和成

[56] 参考文献

JP-50-71897A 1975.6.14

JP-3-17023A 1991.1.25

EP-570916A2 1993.11.24

审查员 葛永奇

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹雯 孟凡宏

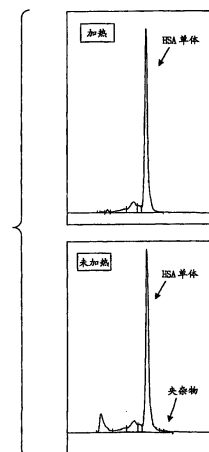
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称

包括加热处理步骤的人血清白蛋白的制造方法

[57] 摘要

以将含有夹杂物的人血清白蛋白溶液在该夹杂物的等电点附近的 pH 进行包括加热处理步骤为特征的人血清白蛋白的制造方法。



1. 重组人血清白蛋白的制造方法，其特征在于包括将含有夹杂物的重组人血清白蛋白溶液在夹杂物的等电点附近的 pH4.0~6.5，温度为 50~70℃的条件下进行加热处理以去除来自酵母细胞的夹杂物的步骤，所述夹杂物是来源于酵母细胞的蛋白。

2. 权利要求 1 记载的方法，其中加热处理进行 0.5~5 小时。

3. 权利要求 2 记载的方法，其中在 pH5.0~6.0，温度为 55~60℃的条件下进行加热处理。

4. 权利要求 2 记载的方法，其中在 pH5.5~6.0，温度为 55~60℃的条件下进行加热处理，时间为 1 小时。

包括加热处理步骤的人血清白蛋白的制造方法

技术领域

本发明是关于人血清白蛋白的制造方法。具体指的是关于在由基因重组技术得到的重组型的人血清白蛋白（以下称之为“rHSA”）的制造步骤中，包括在来自宿主的夹杂物（主要是蛋白质）的等电点附近，进行加热处理步骤的 rHSA 的制造方法。

背景技术

人血清白蛋白（以下称为“HSA”）是血浆中的主要成分，由 585 个氨基酸的单链多肽组成，分子量约 66000Dr (Minghetti, P.P. et al (1986) Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within 11-22 of chromosome 4. J. Biol. Chem. 261, 6747-6757)。已知 HSA 的主要功能是维持血液的正常渗透压和结合血液中出现钙离子、脂肪酸、胆红素、色氨酸以及药物等各种物质，并在这些物质的转运中起到了载体的作用。纯化的 HSA 用于治疗例如：外科手术、出血性休克以及烫伤和肾性综合症等由于白蛋白的损失导致的低白蛋白血症。

最初，根据低温乙醇分级法或者以这种方法为基准的方法，从人血浆得到 HSA 组分（HSA 组分分级为 V）后，进一步利用各种纯化方法进行 HSA 的制备。并且，近年来，作为不依赖人血浆为原料的方法，应用基因重组技术开发了在酵母和大肠杆菌、枯草杆菌中生产人血清白蛋白的技术。

参考在酵母中 (1) Production of Recombinant Human Serum Albumin from *Saccharomyces cerevisiae*; Quirk, R. et. al, Biotechnology and Applied Biochemistry 11, 273-287 (1989)、(2) Secretory Expression of the Human Serum Albumin Gene in the Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*; Ken. Okabayashi et.al, J. Biochemistry, 110, 103-110 (1991)、(3) Yeast Systems for the Commercial Production of Heterologous proteins; Richard G. Buckholz and Martin A. G. Gleeson, Bio/Technology 9, 1067-1072 (1991)、在大肠杆菌 (4) Construction of DNA sequences and their

use for microbial production of proteins, in particular human serum albumin; Lawn, R.M., European Patent Appl. 73,646(1983)、(5) Synthesis and Purification of mature human serum albumin from E. coli; Latta, L. et. al. Biotechnology 5,1309-1314(1987)、在枯草杆菌(6) Secretion of human serum albumin from Bacillus subtilis; Saunders, C.W. et. al, J. Bacteriol. 169, 2917-2925 (1987)。

人血清白蛋白的纯化方法一般使用蛋白质化学中常规使用的纯化方法,例如:使用盐析法、超滤法、等电点沉淀法、电泳法、离子交换层析法、凝胶过滤层析法、亲和层析方法等。实际上,在纯化人血清白蛋白时,由于其中混有来自生物组织、细胞、血液等的多种夹杂物,所以采用上述方法的复杂组合进行纯化。例如:特开平 5-317079 中记载了将产生人血清白蛋白的重组酵母的培养上清通过超滤、加热处理、酸处理,再次超滤后供给阳离子交换体、疏水性层析、阴离子交换体、盐析的各种处理构成的这种人血清白蛋白的制造方法。

该制造方法采取在还原剂存在的情况下,进行加热处理抑制着色。另外,有几份报告报道了包括加热处理步骤的人血清白蛋白的制造方法。确认了基于加热处理的种种效果。

例如:特公平 6-71434 以及特开平 8-116985 中记载了,在乙酰基色氨酸或有机羧酸存在的情况下,将通过基因操作制备的人血清白蛋白的培养上清于 50℃~70℃加热 1~5 小时使蛋白水解酶失活的报道。

此外,在特开平 7-126182 中还记载了将重组人白蛋白制剂通过在 50~70℃加热 30 分钟以上使污染的微生物失活的报道。

发明内容

不过,在上述组合有加热步骤的重组白蛋白制造步骤中,没有任何一项报道了去除污染蛋白质的方法。因此,本发明的目的是提供有效的去除人血清白蛋白中存在的夹杂物的方法。

此外,本发明的另外目的是提供安全性高的作为药品的人血清白蛋白。

本发明者等人就以上目的进行了刻苦研究,最终将生产重组人血清白蛋白酵母的培养物进行稀释,通过阳离子交换、碱性处理将白蛋

白多聚体单体化，并且，进行超滤后，将得到的含 rHSA 溶液在其宿主来源污染蛋白质的等电点附近的 pH 进行加热处理，发现能够有效的去除宿主来源的污染蛋白质，本发明是基于此发现完成的。

本发明提供的是以包括将含有夹杂物的人血清白蛋白溶液在这种夹杂物等电点附近的 pH 进行加热处理步骤为特征的人血清白蛋白的制造方法。本发明还包括提供根据这种方法得到的不含有污染蛋白质的高纯度的 rHSA。下面，就本发明进行详细说明。

附图的简单说明

图 1 所示的是凝胶过滤 HPLC 分析结果的谱图。

实施本发明的最佳方式

本发明的方法是在人血清白蛋白的制造步骤中，将混有宿主来源的污染蛋白质的人血清白蛋白溶液在宿主来源的污染蛋白质的等电点附近的 pH 进行加热处理为特征的方法。通过实施这种方法，能够容易的去除来自酵母的夹杂物，制造高纯度的人血清白蛋白。

作为供给本发明加热处理的对象，如例所示：混有通过基因重组技术得到的 rHSA 产生宿主来源的污染蛋白质的 rHSA 溶液。所用的宿主没有特殊的限制，例如使用：酵母、大肠杆菌、枯草杆菌以及动物细胞等，优选酵母，例如使用糖酵母属和毕赤氏酵母属，最好使用啤酒糖酵母 AH22 株或者它的变异株。本发明的方法，不限于用于产生 rHSA 的重组体宿主，对于含有血浆来源的蛋白夹杂物的情况也同样适用。

本发明的加热处理能够用于 rHSA（或者血浆来源的人血清白蛋白）制造步骤的任何阶段。例如：本发明的方法有望用于生产人血清白蛋白的重组酵母的培养液上清或者酵母的破碎液、将上述上清或者破碎液进行适当的前处理后的含有 rHSA 溶液、以及经离子交换体、吸附层析、凝胶过滤、盐析等处理的进一步纯化步骤。本发明的方法优选用于将 rHSA 产生酵母的培养上清用纯水稀释 2~3 倍后，阳离子交换体、碱性处理以及超滤后。

所说的阳离子交换体处理按照常规的方法进行。所用的阳离子交换体如例所示有：磺基琼脂糖、磺基纤维素、磺丙基琼脂糖、磺丙基右旋糖酐、磺丙基聚乙烯、羧甲基琼脂糖、羧甲基右旋糖酐以及羧甲基纤维素。其中任何一种都可以用作载体。例如：可以采用如下方法，

向用含有 50mM 的氯化钠的 50mM 醋酸缓冲液 (pH4.5) 平衡的阳离子交换柱上添加调整至同一 pH 的人血清白蛋白溶液, 洗涤后, 用含有 300mM 氯化钠的 50mM 磷酸缓冲液 (pH9.0) 进行洗脱, 得到 HAS 组分。

之后, 开始将培养或者制造步骤中生成的人血清白蛋白的多聚体进行达到单体化的碱性处理。多聚体进行单体化时, 采用 pH8~11, 优选采用 pH8.5~9.5 范围的碱性水溶液。

进行碱性处理的温度, 不限定为室温, 只要是 HSA 以及 rHSA 不发生变性的温度即可。例如: 可以采用 0~65℃ 的范围进行处理, 优选在室温 (25℃) 下放置的方法。

人血清白蛋白的多聚体进行单体化, 将含有多聚体的水溶液和碱性溶液混合后, 放置 15 分钟以上。优选放置 3 个小时以上, 放置时间上限没有特殊限定。

用于使碱性处理液的 pH 碱性化的化学物质没有特殊的限定。例如: 碱性有机化合物、碱性无机化合物, 具体指的是: 氨、氨盐、碱性金属的氢氧化物 (例如: 氢氧化钠、氢氧化钾)、硼酸盐、磷酸盐、醋酸盐、草酸盐、柠檬酸盐、三羟氨基甲烷以及由上述 2 种以上的混合物组成的组中选用的物质。

所加入的化学物质, 在使人血清白蛋白不能够发生变性的范围内使用。

进行碱性处理时, 向碱性处理液中添加具有 SH 基化合物, 用来抑制 HSA 分子内以及/或者 HSA 分子间、进一步 HSA 和夹杂物 (主要认为是蛋白质) 之间的错误交联, 进而有效的实现单体化。

在这一处理中所用的含 SH 基化合物, 只要是含有 SH 基官能团的化合物即可, 没有特殊的限制。较好的是含有 SH 基的低分子量的化合物。具体指的是半胱氨酸、巯乙胺、胱胺和蛋氨酸等。优选采用半胱氨酸。

含有 SH 基化合物的添加量, 针对 1~100mg/mL 的 rHSA 浓度, 添加 SH 基化合物 0.1~50mM 为较好, 0.2~15mM 更好, 0.5~5mM 最好。

然后, 用超滤膜 (分级分子量 1 万) 浓缩含有 HSA 溶液, 调整 pH 到夹杂物的等电点附近, 进行加热处理。

优选在 50℃~70℃, 尤其优选 55℃~60℃, 最优选 60℃ 进行加热处理。加热时间优选 30 分钟~5 小时, 尤其优选 1 小时。

加热处理时的 pH 优选在夹杂物的等电点附近。例如：当用啤酒糖酵母 AH22 株或其变异株作为人血清白蛋白产生宿主时，优选 pH4~7，尤其优选 pH5~6，最优选 pH5.5。

此外，加热处理时的人血清白蛋白浓度，只要是能够溶解这种人血清白蛋白的浓度即可，没有特殊的限制，优选 10~250mg/ml，尤其优选 80~120mg/ml。

加热处理步骤后的人血清白蛋白的纯度可以通过凝胶过滤 HPLC 分析进行测定。所用的柱子，例如可以使用 TSKgel G300 SW (Tosoh 公司制备) 柱子，用 0.1M KH_2PO_4 /0.3M NaCl 缓冲液洗脱，在 280nm 测定吸光度，用通过相同的方法得到的未加热处理的人血清白蛋白溶液作为对照。

此外，用和本发明同样的方法处理人血清白蛋白非产生酵母培养液，将粗提物免疫兔子，用得到的抗血清，通过酶免疫测定法 (EIA) 测定纯化的 rHSA 溶液中存在的酵母由来成分。

实施例

调制例 1: 制备含有多聚体的人血清白蛋白溶液

根据特表平 11-509525 所述的方法，用酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 生产 rHSA。将含有 rHSA 的培养液用纯水进行 2 倍稀释后，用醋酸水溶液调节 pH 为 4.5。用含有 50mM 氯化钠的 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH4.5) 加样到平衡化的 STREAMLINE SP 柱子 (Amersham Pharmacia Biotech 公司制造) (柱径 60cmx16cm) 上。然后，用和平衡柱子时所用的缓冲液相同的缓冲液进行洗涤，之后，用含有 300mM 氯化钠的 50mM 的磷酸钠缓冲液 (pH9.0) 进行洗脱，得到含有 rHSA 的组分。

调制例 2: 含有半胱氨酸白蛋白溶液的碱性处理

向得到的含有 rHSA 组分 (10ml) 中添加 1mM 半胱氨酸，添加 5% (W/V) 四硼酸二钾溶液 (15ml) 至终浓度 3% (pH 约 9.0)，于室温放置 5 小时。之后，向该溶液中添加醋酸水溶液，调节至 pH7.0，终止碱性处理。

实施例: 加热处理

之后，用分级分子量 1 万的超滤膜 (Zartrius 公司制) 将 rHSA 水溶液浓缩至 rHSA 浓度为约 100mg/ml，同时以含有 5mM 辛酸钠的 50mM

的磷酸缓冲液 (pH5.5) 进行交换。将此 rHSA 溶液在 60℃ 加热处理 1 小时。接着, 冷却到室温, 通过离心除去生成的沉淀, 并回收上清。

试验例 1: 凝胶过滤 HPLC 分析

将前述上清 0.2ml 加到预先用 0.1M KH_2PO_4 /0.3M NaCl 缓冲液平衡好的 TSKgel G300 SW (Tosoh 公司制备) 柱子 (直径 0.75cm x30cm) 上。用相同的缓冲液洗脱, 将洗脱液在 280nm 波长处进行测定。以根据同样的方法得到非加热处理的人血清白蛋白溶液作为对照。其结果如图 1 所示。

试验例 2: 酵母由来成分的分析

用和本发明同样的方法处理人血清白蛋白非产生酵母培养液, 将粗提物免疫兔子, 用得到的抗血清, 按照常规方法进行 ELISA 测定体系的构建, 测定本发明得到 HSA 溶液中存在的酵母由来成分。其结果如表 1 所示。

表 1

| 试料 | 每 1g rHSA 的蛋白质质量 (μg) | 清除率 |
|-------|------------------------------------|-----|
| 加热处理前 | 1140 | |
| 加热处理后 | 194 | 5.9 |

产业上利用的可能性

根据本发明, 通过将混有来自宿主的污染蛋白质的含有人血清白蛋白溶液在这种夹杂物的等电点附近 pH 进行加热处理, 能够简单并且有效的除去这种污染蛋白质。

此外, 根据本发明, 能够提供降低在人体用药是导致过敏反应等的副作用的可能的原因的来自宿主物质的含量的、高纯度的人血清白蛋白。通过将本发明与其他的纯化方法相组合, 能够制造纯度更高的人血清白蛋白。

