

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410031057.4

[51] Int. Cl.

*A61K 38/55 (2006.01)*

*A61P 11/00 (2006.01)*

*C12Q 1/37 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2007年5月9日

[11] 授权公告号 CN 1314447C

[22] 申请日 2004.4.12

[21] 申请号 200410031057.4

[73] 专利权人 爱华生物科技(香港)有限公司

地址 香港新界沙田大埔公路十二咪生物科技路二号香港生物科技研究院三楼

[72] 发明人 黄炳镠 谢亦武 司徒子杰

[56] 参考文献

CN1125231A 1996.6.26

CN1120439A 1996.4.17

US4939176A 1990.7.3

US4379087A 1983.4.5

CN1053445A 1991.7.31

US4683294A 1987.7.28

Purification of  $\alpha 1$  Proteinase Inhibitor from Human Plasma Fraction IV - 1 by Ion Exchange Chromatography Sharon. X. Chen et al, Vox Sanguinis, Vol. 74 1998

Purification of  $\alpha 1$  Proteinase Inhibitor from Human Plasma Fraction IV - 1 by Ion Exchange Chromatography Sharon. X. Chen et al, Vox Sanguinis, Vol. 74 1998

审查员 陈红霞

[74] 专利代理机构 北京邦信阳专利商标代理有限公司

代理人 黄泽雄

权利要求书 1 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

一种具有抑制蛋白酶作用的药物的制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种具有抑制蛋白酶作用的药物的制备方法,该方法包括步骤:将含有 $\alpha 1$ -蛋白酶抑制物的水溶液经病毒灭活处理;离子交换树脂吸附、洗脱。本发明的制备方法有效地实现高收率,保证产品的高纯度和高活性,同时简化工艺,降低成本。

1、一种制备具有抑制蛋白酶作用的药物的方法，其特征在于，将含有 $\alpha$ 1-蛋白酶抑制物的水溶液经病毒灭活处理后，经离子交换树脂吸附、洗脱，纯化 $\alpha$ 1-蛋白酶抑制物，其中离子交换树脂吸附、洗脱为：

通过一次阴离子交换树脂吸附 $\alpha$ 1-蛋白酶抑制物，并从阴离子交换树脂上有选择性地洗脱有活性的 $\alpha$ 1-蛋白酶抑制物，然后经过一次阳离子交换树脂；

或通过一次阳离子交换树脂过滤，然后通过一次阴离子交换树脂吸附，并从阴离子交换树脂上有选择性地洗脱有活性的 $\alpha$ 1-蛋白酶抑制物。

2、根据权利要求1所述的制备方法，其中含有 $\alpha$ 1-蛋白酶抑制物的水溶液为：人的血浆或血浆组分、含有基因重组 $\alpha$ 1-蛋白酶抑制物的微生物或细胞培养液、含有 $\alpha$ 1-蛋白酶抑制物转基因的动物体液包括乳汁和血浆以及常规工业化血浆蛋白纯化过程中的 Cohn 氏组分 IV 或 IV-1。

3、根据权利要求1所述的制备方法，其特征在于病毒灭活处理含有 $\alpha$ 1-蛋白酶抑制物的水溶液是通过用具有病毒灭活作用的化学试剂进行孵放来完成的。

4、根据权利要求3所述的制备方法，其特征在于该方法中具有病毒灭活作用的化学试剂是辛酸或辛酸盐。

5、根据权利要求3所述的药物的制备方法，其特征在于该方法中具有病毒灭活作用的化学试剂是有机溶剂和去污剂，其中有机溶剂是磷酸三丁酯，去污剂是 Triton X-100 或吐温 80。

## 一种具有抑制蛋白酶作用的药物的制备方法

### 【技术领域】

本发明属于蛋白提纯领域，具体涉及一种具有抑制蛋白酶作用的药物的制备方法。

### 【背景技术】

$\alpha$ 1-蛋白酶抑制物（又名 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶， $\alpha$ 1-Antitrypsin，简称 $\alpha$ 1-PI）是分子量约为 53,000 道尔顿的糖蛋白，每升血浆平均含有 1.5 克。该蛋白在机体中主要是抑制弹性蛋白酶和其它丝氨酸蛋白酶的分解作用。当机体中有活性的 $\alpha$ 1-PI 浓度显著低于丝氨酸蛋白酶的浓度时，正如发生在具有 $\alpha$ 1-PI 遗传缺陷的人群中，肺组织就会遭到丝氨酸蛋白酶的破坏而引起慢性病变，如肺气肿。这种肺气肿的病人可应用 $\alpha$ 1-PI 作长期的替代治疗，然而市场上的 $\alpha$ 1-PI 产品供不应求，因此，开发能工业化生产高质量 $\alpha$ 1-PI 的工艺才能满足市场的需求。

以往有多种已发表的可用于工业化生产具有抑制蛋白酶作用的药物的方法。Glaser 等人（*Anal. Biochem.* 1982, 124: 364-371）应用硫酸铵沉淀法从人血浆的 Cohn 氏组分 IV-1 中一步得到纯度约为 70% 的 $\alpha$ 1-PI，然后再经阴离子交换层析法（DEAE-cellulose）精制，但收率偏低，只有 40%左右。

Coan 等人（美国专利 US 4,379,087；*Vox Sang.* 1985, 48: 333-342）使用聚乙二醇沉淀法和阴离子交换层析法从人血浆的 Cohn 氏组分 IV-1 中纯化 $\alpha$ 1-PI，收率约为 50%，纯度只有 60%左右。此方法是美国拜尔公司（Bayer Corporation）1988 年批准上市的 $\alpha$ 1-PI 产品 Prolastin<sup>®</sup>的原型，该制剂中有活性的 $\alpha$ 1-PI 仅占总蛋白的 $\geq 35\%$ （见其产品说明书，14-7601-001 (Rev. Jan. 2002)）。

Burnouf 等人 (Vox Sang. 1987, 52: 291-297) 采用阴离子交换 (DEAE Sepharose CL6B FF) 和凝胶过滤 (Sephacryl S-200) 层析法从人血浆上清 A (相当于 Cohn 氏组分 II+III) 中分离得到纯度 80-90% 的  $\alpha$ 1-PI, 收率为 65-75%。

上述这些提纯  $\alpha$ 1-PI 的方法都未能在取得高收率的同时, 保证产品的高纯度和高活性。而且, 上述方法工艺比较繁, 成本比较高。实际操作上, 分子大小及等电点都与  $\alpha$ 1-PI 接近的蛋白, 如血浆中含量最多的白蛋白, 令分离高纯度  $\alpha$ 1-PI 的工作相当困难; 而将没有活性的  $\alpha$ 1-PI 与有活性的  $\alpha$ 1-PI 分开则是更大的挑战。对离子交换层析条件的多番尝试之后, 本发明将简单的两步层析法整合成为可用作治疗药物之高纯度和高活性的  $\alpha$ 1-PI 的制备方法。

现有的  $\alpha$ 1-PI 检测技术通常应用特异性的抗体来定量测定  $\alpha$ 1-PI, 包括放射性免疫扩散法, 火箭免疫电泳法和 ELISA 法。可是, 现有的应用特异抗体的技术无法将有活性的  $\alpha$ 1-PI 与无活性的  $\alpha$ 1-PI 区分开来, 而且现有的这些技术成本相对比较高。

## 【发明内容】

### [要解决的技术问题]

为了实现高收率, 保证产品的高纯度和高活性, 同时简化工艺及降低成本, 本发明提供一种具有抑制蛋白酶作用的药物的制备方法; 同时针对现有检测技术操作繁琐、检测灵敏度低的情况, 本发明提供一种简单易行、检测灵敏度高的具有抑制蛋白酶作用的药物的检测方法。

### [技术方案]

为了实现高收率, 保证产品的高纯度和高活性, 同时简化工艺及降低成本, 本发明提供一种具有抑制蛋白酶作用的药物的制备方法, 该方法含有如下步骤: 病毒灭活处理含有  $\alpha$ 1-PI 的水溶液, 离子交换

树脂吸附、洗脱。

将含有 $\alpha 1$ -PI 的水溶液经病毒灭活处理，首先通过阴离子交换树脂吸附 $\alpha 1$ -PI，并从阴离子交换树脂上有选择性地洗脱有活性的 $\alpha 1$ -PI；然后经过阳离子交换树脂，得到具有抑制蛋白酶作用的药物。含有 $\alpha 1$ -PI 的水溶液包括：人的血浆或血浆组分、含有基因重组 $\alpha 1$ -PI 的微生物或细胞培养液以及含有 $\alpha 1$ -PI 转基因的动物体液包括乳汁和血浆。正常的人血浆，每升含有 0.83-4.0 克的 $\alpha 1$ -PI，其中相当大部分在血浆蛋白的工业化生产过程中富集于某些血浆组分。Wright 等人的研究发现，在转基因绵羊的乳汁中， $\alpha 1$ -PI 的含量可高达每升 60 克（*Biotechnology*, 1991, 9: 830-834）。在微生物如大肠杆菌（Casolaro et al, 1987, *J. Appl. Physiol.*, 63: 2015-2023）和酵母（Hubbard et al, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 680-684）中，应用基因重组技术可产生大量的 $\alpha 1$ -PI。优选的含有 $\alpha 1$ -PI 的材料是人血浆的 Cohn 氏组分 IV，因其是应用低温乙醇沉淀法（Cohn 氏法）的常规工业化血浆蛋白纯化过程中的废弃物。为了增加 $\alpha 1$ -PI 制品的安全性，在阴离子交换层析法处理以前，溶解的 Cohn 氏组分 IV 可经由一种或多种方法联合去除/灭活病毒。病毒去除/灭活方法包括：巴斯德（巴氏）消毒法，干热法，低 pH 孵育法，有机溶剂/去污剂（S/D）处理法，辛酸或辛酸盐处理法，超滤病毒去除法，纳米过滤法，等等。

人血浆中的 $\alpha 1$ -PI 有超过 100 种不同的分子变体（variants），含量高的几个变异体的等电点在 4.3-4.6 之间。当溶液的 pH 高于其等电点时， $\alpha 1$ -PI 带负电，能结合到阴离子交换树脂上。溶液的 pH 比其等电点高的越多， $\alpha 1$ -PI 与阴离子交换树脂的结合力越大。溶液中的阴离子与 $\alpha 1$ -PI 竞争阴离子交换树脂上的结合位点，因此，低的离子强度有利于 $\alpha 1$ -PI 被吸附到阴离子交换层析柱。调节经病毒去除/灭活处理过的含有 $\alpha 1$ -PI 的水溶液的 pH 至 $\geq 4.8$ ，且 $\leq 12.0$ ，并调节其离子强度至 $\geq 0.1$  mS/cm，且 $\leq 10.0$  mS/cm，使其流过阴离子交换层析柱。可用

的阴离子交换树脂包括强阴离子交换树脂和弱阴离子交换树脂，例如，安玛西亚(Amersham)公司的 Q Sepharose Fast Flow 和 DEAE Sepharose Fast Flow。目标蛋白 $\alpha 1$ -PI 结合到阴离子交换树脂上，部分杂蛋白不被吸附而得以除去。增加层析柱洗液的盐浓度或调节洗液的 pH，进一步洗脱部分杂蛋白，继续增加洗液的盐浓度或调节洗液的 pH 就把吸附的 $\alpha 1$ -PI 有选择性的洗脱下来。含 $\alpha 1$ -PI 的阴离子交换层析柱洗脱液随后用阳离子交换层析法精制。调节经透析处理的含 $\alpha 1$ -PI 的阴离子交换层析柱洗脱液的 pH 至 $\geq 4.8$ ，且 $\leq 13.0$ ，并调节其离子强度至 $\geq 0.1$  mS/cm，且 $\leq 10.0$  mS/cm，使其流过的阳离子交换层析柱。可用的阳离子交换树脂包括强阳离子交换树脂和弱阳离子交换树脂，例如，安玛西亚公司的 SP Sepharose Fast Flow 和 CM Sepharose Fast Flow。目标蛋白 $\alpha 1$ -PI 流过的阳离子交换树脂，剩余的绝大部分杂蛋白被吸附而得以除去。收集阳离子交换层析柱流出液，通过超滤或透析处理，经配方后除菌过滤，然后装瓶冻干及密封保存，作为纯化的具有抑制蛋白酶作用的药物。

同一构思的上述方法可以进行如下的改变：具有抑制蛋白酶作用之药物的制备方法，其特征在于：将含有 $\alpha 1$ -PI 的水溶液经病毒灭活处理后，首先使 $\alpha 1$ -PI 流过的阳离子交换树脂，随后被阴离子交换树脂所吸附，并令有活性的 $\alpha 1$ -PI 从阴离子交换树脂上有选择性地洗脱下来，得到具有抑制蛋白酶作用的药物。上述两种方法效果基本相同。

含有 $\alpha 1$ -PI 的水溶液的病毒灭活处理通过加入具有病毒灭活作用的化学试剂进行孵发来完成的。具有病毒灭活作用的化学试剂加入到含有 $\alpha 1$ -PI 的水溶液，在摄氏 0 度与摄氏 50 度之间孵放一个小时以上。病毒灭活处理前可加入相应稳定剂。

具有病毒灭活作用的化学试剂是有机溶剂和去污剂 (S/D)。其中所用的去污剂是非离子化的。具有病毒灭活作用的化学试剂还包括：辛酸以及辛酸盐，等等。病毒灭活处理过程中常用的稳定剂是 2% -

50%的蔗糖和 0.001 M - 0.50 M 的柠檬酸钠。

最常用的有机溶剂是磷酸三丁酯，最常用的去污剂是 Triton X-100。另外，吐温 80 (Tween 80) 也是常用的去污剂。所加入的磷酸三丁酯的终浓度在 0.01%与 10.0%之间，同时加入的 Triton X-100 的终浓度在 0.01%与 10.0%之间。

具有抑制蛋白酶作用的药物的检测方法是应用丝氨酸蛋白酶与  $\alpha 1$ -PI 反应而引起相应波长的光吸收变化，从而定量测定  $\alpha 1$ -PI 的活性。丝氨酸蛋白酶与底物反应引起相应波长的光吸收变化， $\alpha 1$ -PI 通过抑制丝氨酸蛋白酶而改变该波长的光吸收变化，具体方法包括如下步骤：1) 利用丝氨酸蛋白酶与  $\alpha 1$ -蛋白酶抑制物反应；2) 测定引起相应波长的光吸收变化；3) 依据光吸收变化测得定量的  $\alpha 1$ -蛋白酶抑制物的活性。

所加入的丝氨酸蛋白酶的终浓度在 0.1 ppm 与 100 ppm 之间，同时加入五倍于该酶重量的相应底物。量度一定时间内该波长的光吸收改变就可定量测定  $\alpha 1$ -PI 的活性。应用丝氨酸蛋白酶检测  $\alpha 1$ -PI 活性的方法称为，丝氨酸蛋白酶抑制力测定法。每个单位的丝氨酸蛋白酶抑制力定义为，与对照相比，在一分钟内，改变相应波长的光吸收 1 个单位的活性。

最常用的丝氨酸蛋白酶是胰蛋白酶或弹性蛋白酶。其它可用的丝氨酸蛋白酶包括：糜蛋白酶，凝血酶，纤维蛋白溶酶以及胶原酶，等等。高纯度的胰蛋白酶比较容易得到，因而最常用于  $\alpha 1$ -PI 的活性测定。应用胰蛋白酶检测  $\alpha 1$ -PI 活性的方法称为，胰蛋白酶抑制力测定法。在没有抑制物时，胰蛋白酶每分钟的降解产物会增加相应波长的光吸收。每个单位的胰蛋白酶抑制力定义为，与对照相比，在一分钟内，减少相应波长的光吸收 1 个单位的活性。胰蛋白酶的常用底物是苯甲酰精氨酸乙酯，胰蛋白酶抑制力测定的常用光波长是 253 nm。

## [有益效果]

本发明提供的制备方法有效地实现高收率，保证产品的高纯度和高活性，同时简化工艺，降低成本；检测方法简单易行、灵敏度高。

应用本发明提供的方法与用阴离子交换（DEAE Sepharose CL6B FF）和凝胶过滤（Sephacryl S-200）提纯 $\alpha$ 1-PI，最后用常规的ELISA方法检测，结果表明本发明提供的方法有效地实现高收率，保证了产品的高纯度和高活性。

现有的 $\alpha$ 1-PI检测技术通常应用特异性的抗体来定量测定 $\alpha$ 1-PI，包括放射性免疫扩散法，火箭免疫电泳法和ELISA法。可是，现有的应用特异抗体的技术无法将有活性的 $\alpha$ 1-PI与无活性的 $\alpha$ 1-PI区分开来，而且现有的这些技术成本相对比较高。本发明提供的检测方法应用简单的丝氨酸蛋白酶与相应底物的反应定量测定有活性的具有抑制蛋白酶作用的药物，排除了无活性的 $\alpha$ 1-PI，提高了精确度；同时操作步骤简单，成本相应降低了。

## 【具体实施方式】

本发明共设计如下反应条件：

表 1、反应条件

	阴离子交换树脂						阳离子交换树脂					
pH	5.0	6.5	8.0	9.5	11.0	12.0	4.8	5.4	7.0	9.6	11.0	12.6
离子强度 (mS/cm)	0.5	2.5	4.5	6.5	8.5	10.0	0.5	1.5	3.0	6.0	8.0	10.0

下面的实施例应该是对本发明的进一步说明，而不是将本发明限定为所列举的实施例。



## 实施例 1

Cohn 氏组分 IV 加二十倍重量的纯化水溶解后，加入 37%蔗糖和 0.38 M 柠檬酸钠作为病毒灭活处理的稳定剂。随后加入终浓度为 0.3% 的磷酸三丁酯和终浓度为 1.0% 的 Triton X-100 在 30 °C 下解放 4 个小时。经病毒灭活后，调节 pH 至 6.5 后，用水将离子强度降至 2.5 mS/cm，加到 pH 6.5 预平衡的 DEAE Sepharose Fast Flow 层析柱上。应用 20 mM 磷酸二氢钠和 100 mM 氯化钠溶液有选择性地洗脱目标蛋白  $\alpha$ 1-PI。加大氯化钠的浓度可把强力吸附的杂蛋白，包括铜蓝蛋白，从该离子交换层析柱洗脱下来。DEAE Sepharose Fast Flow 树脂经 0.5 M 氢氧化钠消毒后可重复使用。

含  $\alpha$ 1-PI 的洗脱液通过 10 kD 的超滤膜包 (Pall Corporation) 除去盐分。先用水将离子强度降至 2.5 mS/cm，再用 5 mM 柠檬酸钠 (pH 5.4) 进行溶液交换。经处理的含  $\alpha$ 1-PI 的溶液加到 pH 5.4 预平衡的 CM Sepharose Fast Flow 层析柱上，有活性的  $\alpha$ 1-PI 流过该离子交换树脂而得以纯化。本实施例从 4.18 克组分 IV 中纯化出 45.3 毫克，纯度 95.8% 的  $\alpha$ 1-PI。有活性  $\alpha$ 1-PI 的收率高达 63.4%。

本实施例应用胰蛋白酶定量测定  $\alpha$ 1-PI 的活性。在没有抑制物时，33.3 ppm 的胰蛋白酶每分钟降解 166.7 ppm 的苯甲酰精氨酸乙酯所产生的产物会增加 253 nm 的光吸收 0.1-0.2 个单位。每个单位的胰蛋白酶抑制力定义为，与对照相比，在一分钟内，减少 253 nm 的光吸收 1 个单位的活性。表 2 为本例的实验数据。

表 2、 $\alpha$ 1-PI 活性

	总蛋白 (mg)	$\alpha$ 1-PI 活性 (收率)
组分 IV	1695.2	612.0 U (100 %)
DEAE 层析	108.6	432.6 U (70.7 %)
CM 层析	45.3	388.1 U (63.4 %)

## 实施例 2

溶解的 Cohn 氏组分 IV，用 1 M 盐酸调节 pH 至 5.4，用水调节离子强度至 1.5 mS/cm，然后加到 5 mM 柠檬酸钠 (pH 5.4) 预平衡的 CM Sepharose Fast Flow 层析柱上。收集该离子交换树脂的流出液，调节 pH 至 6.5 后，调节离子强度至 2.5 mS/cm，加到 20 mM 磷酸二氢钠溶液 (pH 6.5) 预平衡的 DEAE Sepharose Fast Flow 层析柱上。应用 20 mM 磷酸二氢钠和 100 mM 氯化钠溶液有选择性地洗脱有活性的  $\alpha$ 1-PI。本实施例从 5.34 克组分 IV 中纯化出 58.9 毫克，纯度 92.5% 的  $\alpha$ 1-PI。有活性  $\alpha$ 1-PI 的收率高达 81.2%。表 3 为本例的实验数据。

表 3、 $\alpha$ 1-PI 活性

	总蛋白 (mg)	$\alpha$ 1-PI 活性 (收率)
组分 IV	1191.2	448.7 U (100 %)
CM 层析	255.3	408.8 U (91.1 %)
DEAE 层析	58.9	364.5 U (81.2 %)

其余的与实施例 1 相同。