

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3702474号

(P3702474)

(45) 発行日 平成17年10月5日(2005.10.5)

(24) 登録日 平成17年7月29日(2005.7.29)

(51) Int. Cl.⁷

A 6 1 K 38/00

F I

A 6 1 K 37/02

請求項の数 5 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平6-119977	(73) 特許権者	000006725 三菱ウェルファーマ株式会社 大阪府大阪市中央区平野町2丁目6番9号
(22) 出願日	平成6年6月1日(1994.6.1)	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(65) 公開番号	特開平7-330626	(72) 発明者	高橋 剛 大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株式会社ミドリ十字中央研究所内
(43) 公開日	平成7年12月19日(1995.12.19)	(72) 発明者	池ヶ谷 和男 大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株式会社ミドリ十字中央研究所内
審査請求日	平成13年5月9日(2001.5.9)	(72) 発明者	望月 忍 大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株式会社ミドリ十字中央研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血清アルブミン製剤の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

血清アルブミン含有水溶液を pH 3 ~ 6 の条件下で陰イオン交換体処理して非吸着画分を回収した後、当該非吸着画分を pH 4 ~ 8 の条件下で陽イオン交換体処理して非吸着画分を回収し、次いで加熱処理する工程からなる血清アルブミン製剤の製造方法であって、陽イオン交換体が陽イオン交換基を有するポリアクリルアミド系担体であることを特徴とする血清アルブミン製剤の製造方法。

【請求項2】

陽イオン交換体処理を pH 4 . 5 ~ 6 . 5 の条件下で行う請求項1記載の方法。

【請求項3】

ポリアクリルアミド系担体がポリ(N - トリス[ヒドロキシメチル]メチルメタクリルアミド)である請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

血清アルブミン含有水溶液を陰イオン交換体処理した後、陽イオン交換体処理し、次いで加熱処理する工程からなる血清アルブミン製剤の製造方法であって、陽イオン交換体がカルボキシメチル基を有するポリアクリルアミド系担体であることを特徴とする血清アルブミンの製造方法。

【請求項5】

ポリアクリルアミド系担体がポリ(N - トリス[ヒドロキシメチル]メチルメタクリルアミド)である請求項4記載の方法。

10

20

【発明の詳細な説明】**【0001】****【産業上の利用分野】**

本発明は血清アルブミン製剤の製造方法に関する。

【0002】**【従来技術】**

血清アルブミンは血漿中に最も多く含まれている蛋白質で、血液中で浸透圧の維持、栄養物質や代謝物質と結合してその運搬などの機能を果たしている。上記血清アルブミンを含有する製剤は、アルブミンの喪失及びアルブミン合成低下による低アルブミン血症、出血性ショックなどの治療に用いられている。アルブミン製剤は、そこに混入してくる懸念のあるウイルスを不活化するために、通常、アルブミン含有水溶液の状態での加熱処理が汎用されている。

10

【0003】

このような方法により製造される市販のアルブミン製剤をゲル濾過分析法で分析すると、該製剤中にはアルブミンの凝集体が存在することが知られている。この凝集体（通常、ポリマーと称されるので、以下、ポリマーという）は上記の加熱処理前には殆ど存在しないことから、加熱処理により熱に不安定な夾雑蛋白質の作用でアルブミンが凝集化したものと考えられる。市販のアルブミン製剤は安全に広く使用されていることから、このポリマーが特に人体に害を及ぼすとは考えられていないが、加熱変性物であることより、製剤中にできるだけ含有しないことが好ましい。

20

【0004】

また、アルブミン中にはトランスフェリンなどのようにアルブミンと物理化学的性質のよく似た夾雑蛋白質が含まれており、分画法等の慣用の手段では効率的に分離することが困難であり、アルブミン製剤中に夾雑蛋白質が残存するという問題がある。

【0005】

これまでに、血清アルブミン製剤を調製する際にイオン交換体を用いた各種の精製方法が確立されている。すなわち、陰イオン交換体処理をpH 4.5～4.9の条件下で行った後、陽イオン交換体をpH 5.2～6.5で行う工程からなる方法（特開昭52-47915号公報）、親水性の陰イオン交換体による処理、疎水性の陰イオン交換体による処理及び親水性の陽イオン交換体による処理の3段階法からなる方法（特開昭60-23320号公報）、血清アルブミン含有水溶液を陰イオン交換体処理した後、陽イオン交換体処理し、次いで加熱処理する工程からなる方法（特開平4-234326号公報）等が報告されている。

30

【0006】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の目的は、さらに精製手段を改良することにより、アルブミンを高度に精製し、かつトランスフェリン等の夾雑蛋白質含量をさらに低減させ得ると共に加熱処理してもポリマーが実質的に検出されない血清アルブミン製剤の製造方法を提供することにある。

【0007】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは種々検討を重ねた結果、陽イオン交換体処理工程でポリアクリルアミド系担体の陽イオン交換体を使用することにより、上記課題が解決されることを見出し本発明を完成するに至った。

40

【0008】

本発明は、血清アルブミン含有水溶液を陰イオン交換体処理した後、陽イオン交換体処理し、次いで加熱処理する工程からなる血清アルブミン製剤の製造方法であって、陽イオン交換体が陽イオン交換基を有するポリアクリルアミド系担体であることを特徴とする血清アルブミン製剤の製造方法である。

【0009】

本発明の製造方法の出発原料である血清アルブミンの由来には特に制限がなく、具体的に

50

は哺乳動物、例えば、ヒト、ウシ、ウサギ等に由来するものが挙げられ、特にヒト由来のものが使用される。血清アルブミン製剤を調製するための出発原料としては、例えば、コーンの冷アルコール分画によって得られた第V画分等が例示される。

【0010】

本発明の方法において、血清アルブミン製剤は、上記の血清アルブミンを適当な精製水に溶解した血清アルブミン含有水溶液を陰イオン交換体処理した後、陽イオン交換体処理し、次いで加熱処理することにより得られる。上記の工程において、血清アルブミン含有水溶液中のアルブミン含量としては、通常、0.1～30% (W/V、特に明示のない限り以下同様)程度、好ましくは約1～10%に調整される。

【0011】

本発明の方法においては、まず、アルブミン含有水溶液を陰イオン交換体処理に付して精製する。この陰イオン交換体処理により、ハプトグロビン、 γ_1 -酸性糖蛋白質などのアルブミンより等電点の低い夾雑蛋白質が除去され精製される。陰イオン交換体としては、陰イオン交換基を有する不溶性担体であればいずれも使用することができる。陰イオン交換基の例としては、ジエチルアミノエチル基(通称はDEAE)、四級アンモニウム基、例えば、ジエチル[2-ヒドロキシプロピル]アミノエチル基(通称はQAE)、 $(CH_3)_3N^+CH_2-$ (通称はQ)、四級メチルアンモニウム基(QMA)等が挙げられる。不溶性担体の例としては、デキストラン(商品名、セファデックス、ファルマシア社製)、アガロース(商品名、セファロース、ファルマシア社製)、ビニル系親水性ポリマー(商品名、トヨパール、東ソー社製)、セルロース(商品名、セルロファイン、生化学工業社製)、多孔性シリカゲル(商品名、セファロシル、SEPRACOR社製)等が挙げられる。より具体的には、この分野で慣用の陰イオン交換体、例えば、DEAE-セファロース、Q-セファロース(商品名、いずれもファルマシア社製)、DEAE-トヨパール、QAE-トヨパール(商品名、いずれも東ソー社製)、A200セルロファイン(商品名、生化学工業社製)、QMA-セファロシル(商品名、SEPRACOR社製)、陰イオン交換樹脂等が例示され、夾雑蛋白質除去効率の点からしてQ-セファロース、QAE-トヨパール、QMA-セファロシル等の強塩基性陰イオン交換体を用いるのが好ましい。

【0012】

上記の陰イオン交換体を用いる処理は、アルブミン含有水溶液を陰イオン交換体と接触させることにより行われ、陰イオン交換体の使用量はアルブミン含有水溶液中の夾雑蛋白質含量、陰イオン交換体の交換能等により適宜調整されるが、アルブミン1g当たり、陰イオン交換体0.1～5ml、通常3ml程度使用される。本方法はカラム法、バッチ法のいずれの方法にて行ってもよいが、夾雑蛋白質の除去効率の面からカラム法にて行うのが好ましい。

【0013】

カラム法にて行う場合、前記のアルブミン含有水溶液をpH3～6程度、好ましくはpH4.5～5.5、より好ましくはpH5.1～5.4、塩濃度としては0.001～0.2Mの塩化ナトリウム程度、好ましくは0.001～0.05Mに調整し、緩衝液〔例えば、0.02M酢酸ナトリウム(pH5.1)〕で平衡化した陰イオン交換体カラムを通過させ、次いで同緩衝液で展開して非吸着分を回収することにより行われる。上記の操作はアルブミンの変性を抑制するため、低温(通常、10以下)にて行うのが好ましい。また、バッチ法にて行う場合、上記条件に調整したアルブミン含有水溶液に、陰イオン交換体を添加して接触させ、10以下にて、30分～2時間程度混和した後、遠心分離等の手段により陰イオン交換体と分離し、上清を回収することにより行われる。

【0014】

上記の陰イオン交換体処理により精製されたアルブミン含有水溶液は、必要に応じて、pH調整、濃度調整等がされた後、陽イオン交換体処理に付してさらに精製する。この陽イオン交換体処理により、アルブミンよりも高pHに等電点のあるトランスフェリンなどの夾雑蛋白質が除去されて精製される。陽イオン交換体としては、陽イオン交換基を有する

10

20

30

40

50

ポリアクリルアミド系担体であればいずれも使用することができる。陽イオン交換基としては、スルホ基、例えば、スルホプロピル基（通称はSP）、カルボキシ基、例えば、カルボキシメチル基（通称はCM）等が挙げられる。ポリアクリルアミド系担体は（メタ）アクリルアミドの重合体からなる不溶性担体であり、例えば、ポリ（N-トリス〔ヒドロキシメチル〕メチルメタクリルアミド）（商品名、トリスアクリル、SEPRACOR社製）等が挙げられる。夾雑蛋白質の除去効率の点から、スルホプロピル型のポリアクリルアミド（商品名、SP-トリスアクリル、SEPRACOR社製）、カルボキシメチル型のポリアクリルアミド（商品名、CM-トリスアクリル、SEPRACOR社製）等の陽イオン交換体を用いるのが好ましい。

【0015】

上記の陽イオン交換体を用いる処理は、前記陰イオン交換体処理により精製されたアルブミン含有水溶液を陽イオン交換体と接触させることにより行われる。

陽イオン交換体の使用量はアルブミン含有水溶液中の夾雑蛋白質含量、陽イオン交換体の交換能等により適宜調整されるが、アルブミン1g当たり、陽イオン交換体0.1~5ml、通常2ml程度使用される。本方法はカラム法、バッチ法のいずれの方法にて行ってもよいが、夾雑蛋白質の除去効率の面からカラム法にて行うのが好ましい。

【0016】

カラム法にて行う場合、前記のアルブミン含有水溶液をpH4~8程度、好ましくはpH4.5~6.5、より好ましくはpH5.5~6.0、塩濃度としては0.001~0.2Mの塩化ナトリウム程度、好ましくは0.001~0.05Mに調整し、緩衝液〔例えば、0.02M酢酸ナトリウム（pH5.5）〕で平衡化した陽イオン交換体カラムを通過させ、次いで同緩衝液で展開して非吸着分を回収することにより行われる。上記の操作はアルブミンの変性を抑制するため、低温（通常、10以下）にて行うのが好ましい。また、バッチ法にて行う場合、上記条件に調整したアルブミン含有水溶液に、陽イオン交換体を添加して接触させ、10以下にて、30分~2時間程度混和した後、遠心分離等の手段により陽イオン交換体と分離し、上清を回収することにより行われる。

【0017】

かかる陰イオン交換体及び陽イオン交換体処理により精製されたアルブミン含有水溶液は夾雑蛋白質含量が著しく低く、トランスフェリン、ハプトグロビン及び γ_1 -酸性糖蛋白質含量は検出限界未満であり、実質的にこれらの夾雑蛋白質を含まないものである。

【0018】

上記の陰イオン交換体処理及び陽イオン交換体処理により夾雑蛋白質含量が低減されたアルブミン含有水溶液は適当な濃度に調整し、例えば、バイアルに充填するなど所望の製剤形態に製剤化された後、加熱処理されて血清アルブミン製剤が得られる。上記の加熱処理は血清アルブミン製剤中に混入するおそれのあるウイルスを不活化するもので、アルブミン濃度5~30%程度、通常5又は20~25%程度に調整した水溶液として行われ、加熱温度としては、夾雑ウイルスを不活化するのに十分な温度及び時間行えばよく、例えば、50~70、好ましくは約60で、5~20時間、好ましくは約10時間行われる。なお、上記の加熱処理に際しては、必要に応じてアルブミンの安定化剤、例えばN-アセチルトリプトファンナトリウム、カプリル酸ナトリウム等を単独で又は混合して添加してもよい。これらアルブミンの安定化剤は、製剤中に含有されるアルブミン1g当たり20~60mg、好ましくは40mg程度使用される。

【0019】

かくして得られた血清アルブミン製剤は、ポリマーが実質的に含まれておらず（例えば、ゲル濾過分析法により測定した場合、アルブミンに対するポリマー含量が0.5重量%未満）、またトランスフェリンも実質的に含まれていない（例えば、一元免疫拡散法により測定した場合、アルブミンに対するトランスフェリン含量が0.0056重量%未満）。なお、本発明の方法で得られた血清アルブミン製剤は、従来の血清アルブミン製剤と同様な用量、用法にて使用される。

【0020】

【実施例】

以下、本発明をより詳細に説明するため、実施例を挙げるが、本発明はこれらの実施例によってなんら限定されるものではない。

【0021】

実施例 1

(a) 血清アルブミン含有水溶液の調製

コーンの冷アルコール分画によって得られた第V画分ペースト(500g)を冷無菌蒸留水2.0リットルに溶解し、酢酸を用いてpHを4.6に調整した後、約1時間攪拌した。次いで、約-2℃にて濾過(フィルター:0.45μm)し、さらに冷無菌蒸留水2.0リットルを加え、1N水酸化ナトリウムでpH5.1に調整し、血清アルブミン含有水溶液を得た。

10

(b) 陰イオン交換体処理

QAE-トヨパール(500ml)をカラム(直径8cm×長さ15cm)に充填し、0.5M塩化ナトリウムで十分に洗浄した後、0.02M酢酸ナトリウム(pH5.1)で平衡化し、陰イオン交換体カラムを調製した。このカラムに上記(a)の血清アルブミン含有水溶液を通し、さらに冷0.02M酢酸ナトリウム(pH5.1、2リットル)で洗浄した。通過液と洗浄液とを合わせ、1N水酸化ナトリウムにてpHを5.5に調整した。

【0022】

(c) 陽イオン交換体処理

CM-トリスアクリル(100ml)をカラムに充填し、0.5M塩化ナトリウムで十分に洗浄した後、0.02M酢酸ナトリウム(pH5.5)で平衡化し、陽イオン交換体カラムを調製した。このカラムに上記(b)で得られた血清アルブミン含有水溶液を通し、さらに0.02M酢酸ナトリウム(pH5.5、0.5リットル)で洗浄した。通過液と洗浄液とを合わせた後、ペリコンにて透析・濃縮し、 $A_{280} = 163$ (アルブミン濃度:28%)となるように調製した。

20

【0023】

(d) 加熱処理

上記(c)で得られた血清アルブミン含有水溶液に、該水溶液10ml当たり1.2mlの安定化剤溶液(100ml中、N-アセチルトリプトファンナトリウム5.01g及びカプリル酸ナトリウム3.10g含有)を添加し、1N水酸化ナトリウムにてpHを6.85に調整してアルブミン濃度を25%とし、除菌濾過した。所定量をバイアルに分注し、60℃にて10時間加熱処理して血清アルブミン製剤を得た。

30

【0024】

比較例

実施例1において、(c)の陽イオン交換体処理工程をCM-トリスアクリルの代わりにSP-トヨパールを用いて行う以外は、実施例1と実質的に同様にして血清アルブミン製剤を調製した。

【0025】

(i) 血清アルブミン製剤中のポリマー含量の測定

実施例1及び比較例で得られた製剤中のポリマー含量をゲル濾過分析法により測定した。なお、ゲル濾過分析は下記の条件にて行った。

40

(a) サンプル: 血清アルブミン製剤を、下記の緩衝液で50倍に希釈し、濾過(フィルター:0.45μm)した溶液を20μl注入した。

(b) カラム: TSKgel G3000SW(東ソー社製)を充填したカラム(直径7.8mm×長さ30cm)を使用した。

(c) 緩衝液: 0.1M KH_2PO_4 / 0.3M NaCl (pH6.9)

(d) 流速: 1ml/分

(e) 検出波長: = 280nm

(f) 装置: ウォーターズHPLCシステム

50

測定の結果を表1に示す。本発明の方法により製造した血清アルブミン製剤は、従来法による比較例の製剤と比べて二量体含量及びポリマー含量がさらに低減されている。実施例製剤においてはポリマー含量が0.5重量%未満であり、ポリマー含量は極めて少なく、実質的に含まれていないことが明らかである。

【0026】

(ii)血清アルブミン製剤中の夾雑蛋白質の測定

実施例1及び比較例で得られた製剤中の α_1 -酸性糖蛋白質(α_1 -AG)、ハプトグロビン(Hp)及びトランスフェリン(Tf)含量の測定を行った。その結果を表1に示す。なお、夾雑蛋白質の測定は、一元免疫拡散法(Mancini法:Mancini G.ら、Immunochemistry,第2巻、第3号、第235-254頁、1965年)により行った。この際、用いた抗 α_1 -酸性糖蛋白質血清、抗ハプトグロビン血清及び抗トランスフェリン血清は、ウサギを免疫動物として常法により調製したものである。これらの抗血清より作製した一元免疫拡散用ゲルを用い、それぞれに対応する夾雑蛋白質に対する沈降輪面積の標準曲線を作成した。この標準曲線によると、検出限界は、 α_1 -AGで0.4mg/dl、Hpで1.6mg/dl、Tfで1.4mg/dlである。下記表1に示されるように、本発明の方法で製造した血清アルブミン製剤は α_1 -AG、Hp及びTfがいずれも検出限界未満であり、夾雑蛋白質含量は極めて少なく、実質的に含まれていないことが判明した。なお、上記のようにTfの検出限界は1.4mg/dlであり、また実施例製剤のアルブミン含量は25%であることから、実施例製剤中のTf含量はアルブミンに対して0.0056重量%未満であることが明らかになった。

【0027】

【表1】

		実施例1	比較例
アルブミン	単量体	98.7 重量%	98.5 重量%
	二量体	0.9 重量%	1.0 重量%
	ポリマー	0.4 重量%	0.5 重量%
夾雑蛋白質 アルブミン25% 濃度に対して	α_1 -AG	検出限界[0.4mg/dl] 未満	検出限界[0.4mg/dl] 未満
	Hp	検出限界[1.6mg/dl] 未満	5.2 mg/dl
	Tf	検出限界[1.4mg/dl] 未満	1.5 mg/dl

【0028】

実施例2

実施例1において、(c)の陽イオン交換体処理工程をCM-トリスアクリルの代わりにSP-トリスアクリルを用いて行う以外は、実施例1と同様にして、血清アルブミン製剤を調製した。得られた血清アルブミン製剤について、実施例1と同様な方法でポリマー含量及び夾雑蛋白質含量を測定した。その結果、ポリマーのピークは検出されず実質的に含まれていないことが示され、またHp、 α_1 -AG及びTf含量も検出限界未満であり、実質的に含まれていないことが判明した。

【0029】

10

20

30

40

50

実施例 3

実施例 1 において、(b) の陰イオン交換体処理工程を Q A E - トヨパールの代わりに Q M A - セファロシルを用いて行う以外は、実施例 1 と同様にして、血清アルブミン製剤を調製した。

【 0 0 3 0 】

参考例 1

上記実施例 1、実施例 2 及び比較例に示される血清アルブミン製剤の調製において、アルブミン回収率及び陽イオン交換体処理工程におけるトランスフェリン (T f) 吸着量は表 2 に示される通りであった。なお、アルブミン回収率は 2 8 0 n m の吸光度により測定した。ポリアクリルアミド系担体の陽イオン交換体を用いる本発明の方法は、アルブミン回

10

【 0 0 3 1 】

【表 2】

陽イオン交換体	アルブミン回収率(%)	T f 吸着量 ($\mu\text{g/ml}$ イオン交換体容量)
SP-トヨパール (比較例)	8 0	6 6
CM-トリスアクリル (実施例 1)	9 5	1 0 0 以上
SP-トリスアクリル (実施例 2)	8 7	1 0 0 以上

20

【 0 0 3 2 】

参考例 2

上記実施例 1、実施例 3 及び比較例で得られた血清アルブミン製剤について、ポリマー含量、アルブミン回収率、着色度、及びアルミニウム含量を測定した。

30

結果を表 3 に示す。表 3 に示すように、本発明の方法によれば、ポリマー含量がさらに低減され、着色度の低い高度に精製された血清アルブミン製剤が得られる。本発明の製造方法はアルブミン回収率が高く、精製効率に優れる。

【 0 0 3 3 】

【表 3】

	実施例 1	実施例 3	比較例
ポリマー含量 (重量%)	0. 3 3	0. 0 3	0. 5 6
アルブミン回収率 (%)	9 5	9 4	—
着色度 (A_{405} /アルブミン濃度%)	0. 0 2 6	0. 0 1 9	0. 0 3 3
アルミニウム含量 (ppb)	5 0 未満	—	—

40

【 0 0 3 4 】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、陽イオン交換体処理工程においてポリアクリルアミド系担体の陽

50

イオン交換体を使用することにより、従来法と比べてトランスフェリン等の夾雑蛋白質含量がさらに低減されると共に、夾雑蛋白質に起因するポリマーの生成が抑制され、高度に精製された血清アルブミン製剤が提供される。本発明の方法で製造された血清アルブミン製剤は、加熱処理によりウイルスが不活化されていると共にポリマー含量及び夾雑蛋白質含量が極めて少なく、安全性、安定性等に優れた製剤である。

フロントページの続き

(72)発明者 西槇 秀雄

大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株式会社ミドリ十字中央研究所内

審査官 八原 由美子

(56)参考文献 特開昭60-023320(JP,A)

特開平03-017023(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

A61K 38/00

CA(STN)