



(21) 申请号 201910901637.0

C07K 1/34 (2006.01)

(22) 申请日 2019.09.23

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 107857811 A, 2018.03.30

申请公布号 CN 110590935 A

CN 109627322 A, 2019.04.16

(43) 申请公布日 2019.12.20

CN 103394076 A, 2013.11.20

(73) 专利权人 华兰生物工程重庆有限公司

CN 110041425 A, 2019.07.23

地址 408000 重庆市涪陵区鹤凤大道66号

CN 105037487 A, 2015.11.11

专利权人 华兰基因工程有限公司

CN 102161702 A, 2011.08.24

华兰生物工程股份有限公司

WO 2008088403 A2, 2008.07.24

(72) 发明人 刘余江 张海梦 张宝献 滕世超

US 5346992 A, 1994.09.13

张建瑾 李长明 肖炼峰 卿舟

井金荣等. 离子交换层析在人血白蛋白生产中的应用研究.《国际生物制品学杂志》.2016, 第39卷(第5期),

(74) 专利代理机构 重庆中之信知识产权代理事务所(普通合伙) 50213

张丹等. 人血白蛋白工艺中多聚体的形成趋势及初步分析.《中国输血杂志》.2016, (第09期),

专利代理师 邓锋

刘力等. 人血白蛋白分离工艺的历史沿革及发展.《中国输血杂志》.2008, (第04期),

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

审查员 张婷

权利要求书1页 说明书7页

(54) 发明名称

人血白蛋白去除多聚体工艺

(57) 摘要

本发明提供了一种人血白蛋白去除多聚体工艺,包括如下步骤:S1、组分分离;S2、人血白蛋白纯化工序;S3、巴氏灭活工序;S4、层析工序;S5、二次巴氏灭活工序;S6、无菌灌装工序。本发明的提供的人血蛋白制造工艺在巴氏灭活工艺后增加离子交换层析工艺和二次巴氏灭活等工艺步骤,用双巴氏灭活法代替传统的巴氏灭活法制备人血白蛋白,提升了制品质量,有效降低了制品中多聚体的含量;通过有效去除制品中多聚体和杂蛋白含量,进而提高人血白蛋白质量,降低产品使用过程中的不良反应的发生,可以提高人血白蛋白的市场竞争力,具备了良好的市场前景。

1. 人血白蛋白去除多聚体工艺,其特征在於,包括如下步骤:

S1、组分分离:将出库的血浆表面进行消毒清洗后破袋,然后在融浆罐中融合血浆,通过离心机分离冷沉淀后,将上清打入分离罐,之后使用人血白蛋白分离罐和压滤机进行分离得到组分I、组分II+组分III、组分IV以及组分V沉淀;

S2、人血白蛋白纯化工序:将组分V沉淀在人血白蛋白分离罐中进行溶解、精制以及过滤工序,然后使用超滤机对人血白蛋白进行超滤;

S3、一次巴氏灭活工序:在巴氏灭活罐中对上一步超滤后的人血白蛋白进行配制,然后在巴氏灭活罐中进行巴氏灭活处理;

S4、层析工序:使用层析系统进行离子交换层析;

S5、二次巴氏灭活工序:在巴氏灭活罐中对层析后的人血白蛋白进行巴氏灭活处理;

S6、无菌灌装工序:在灌装线上进行除菌灌装;

经过一次巴氏灭活工序后对制品超滤或稀释,以使人血白蛋白浓度、pH以及电导率达到层析上样的要求,其中,所述电导率为1.0或1.5ms/cm;所述pH为4.60;所述人血白蛋白浓度为100g/L。

2. 根据权利要求1所述的人血白蛋白去除多聚体工艺,其特征在於,层析前使用醋酸-醋酸钠缓冲液平衡层析柱。

3. 根据权利要求1或2所述的人血白蛋白去除多聚体工艺,其特征在於,层析时层析线性流速为1.0cm/min~2cm/min。

4. 根据权利要求2所述的人血白蛋白去除多聚体工艺,其特征在於,层析柱中所用凝胶为离子交换类填料。

5. 根据权利要求4所述的人血白蛋白去除多聚体工艺,其特征在於,所述离子交换类填料为强阴离子或弱阴离子交换类填料。

6. 根据权利要求1所述的人血白蛋白去除多聚体工艺,其特征在於,所述一次巴氏灭活工序,采用的灭活温度为60℃,时间为10h。

7. 根据权利要求1所述的人血白蛋白去除多聚体工艺,其特征在於,所述超滤包括采用10KD超滤膜包对制品进行4~10倍透析。

8. 根据权利要求1所述的人血白蛋白去除多聚体工艺,其特征在於,所述稀释是使用平衡液或注射用水对制品进行稀释。

人血白蛋白去除多聚体工艺

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制品和血液制品生产技术领域,具体涉及一种人血白蛋白去除多聚体工艺。

背景技术

[0002] 人血白蛋白是血浆中的主要成分,其主要功能是维持血液的正常渗透压和结合血液中的钙离子、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。纯化的人血白蛋白对因失血、创伤、烧伤等引起的休克,脑水肿及大脑损伤所致的脑压增高,防治低蛋白血症及肝硬化,肾病引起的水肿或腹水,具有较好的疗效。

[0003] 进行人血白蛋白工业生产时,必须在不同于人的体内环境的各种条件下进行处理,因此生成了人血清白蛋白的多聚体。这是由于尽管人血白蛋白具有极为稳定的化学性质,但在纯化制备、贮存过程中,受温度、剪切力、蛋白浓度和pH值等条件影响,以及本身血浆中某些成分的存在,仍然可导致蛋白分子发生聚合,形成二聚体、三聚体甚至多聚体。使用低温乙醇法生产人血白蛋白由于其固有特性,所分离的人血白蛋白制品纯度一般在96%,少量杂蛋白的存在难以避免,其中所含的某些微量蛋白成分,如糖蛋白、触珠蛋白、血红素结合蛋白等,在巴氏灭活的加热过程中具有促进蛋白多聚体或聚合体形成的能力。

[0004] 在临床应用人血清白蛋白时,尽管尚未见到报告这种多聚体对人体产生的坏影响,但是怀疑这种多聚体能够表现出新的抗原性。从医药的安全性角度出发,在医药用“人血清白蛋白”检验标准中规定了多聚体混入量的限度,因此在制造上,尽可能降低制剂中的多聚体含量是非常重要的课题。

[0005] 人血白蛋白现有生产工艺通过巴氏灭活以去除制品中的病毒,但巴氏灭活工艺会影响制品稳定性,增加制品中多聚体的含量,影响产品质量。伴随国内血液制品行业竞争的加剧,提高血液制品产品质量已成为企业提高效益的战略措施。同时由于社会医疗保障水平逐步提高,及人血白蛋白制品适应症的增加,人血白蛋白的市场需求大幅增加,缺口加大,因此提高白蛋白质量显得尤为重要。因此,当前需要一种更加科学合理的减少人血白蛋白中的多聚体含量的工艺。

发明内容

[0006] 本发明要解决的是当前人血白蛋白在经过巴氏灭活加热过程后出现了过多的多聚体的问题,针对现有技术中所存在的上述不足而提供一种人血白蛋白去除多聚体工艺。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用了如下的技术方案:

[0008] 人血白蛋白去除多聚体工艺,包括如下步骤:

[0009] S1、组分分离:将出库的血浆表面进行消毒清洗后破袋,然后在融浆罐中融合血浆,通过离心机分离冷沉淀后,将上清打入分离罐,之后使用人血白蛋白分离罐和压滤机进行分离得到组分I、组分II+组分III、组分IV以及组分V沉淀;

[0010] S2、人血白蛋白纯化工序：将组分V沉淀在人血白蛋白分离罐中进行溶解、精制以及过滤工序，后使用超滤机对人血白蛋白进行超滤；

[0011] S3、一次巴氏灭活工序：在巴氏灭活罐中对上一步超滤后的人血白蛋白进行配制，然后在巴氏灭活罐中进行巴氏灭活处理；

[0012] S4、层析工序：使用层析系统进行离子交换层析；

[0013] S5、二次巴氏灭活工序：在巴氏灭活罐中对层析后的人血白蛋白进行巴氏灭活处理；

[0014] S6、无菌灌装工序：在灌装线上进行除菌灌装，本发明中，除层析工序和二次巴氏灭活工序外，均采用传统的制备方式，即为现有技术。

[0015] 进一步地，层析前使用醋酸-醋酸钠缓冲液平衡层析柱，层析柱可采用预装柱、手动填充柱的规格。

[0016] 进一步地，层析时层析线性流速为1.0cm/min~2cm/min，这样可以确保层析时制品的保留时间在10~20min。

[0017] 进一步地，层析柱中所用凝胶为离子交换类填料。

[0018] 进一步地，所述离子交换类填料为强阴离子或弱阴离子交换类填料；弱阴离子交换树脂和强阴离子交换填料的区别在于：

[0019] 1)、工作交换容量区别，弱阴树脂的工作交换容量是强阴树脂的两倍以上；

[0020] 2)、弱阴树脂能交换强酸根阴离子（比如硫酸根离子，氯根离子），但很难交换弱酸根阴离子（比如硅酸根离子）；而强阴树脂都能去除；

[0021] 3)、弱阴树脂抗有机物污染能力明显高于强阴树脂，并且复苏能力也很不错。

[0022] 进一步地，所述一次巴氏灭活工序，采用的灭活温度为60℃，时间为10h；巴氏灭活是为了灭活蛋白制品中可能存在的潜在病毒，以保证制品的安全性。巴氏灭活也是人血白蛋白成品中多聚体产生的步骤，一次巴氏灭活是为了让白蛋白制剂中不稳定的蛋白及杂质形成多聚体，以利于层析去除。

[0023] 进一步地，经过一次巴氏灭活工序后可对制品超滤或稀释，以使人血白蛋白浓度、pH 以及电导率达到层析上样的要求。

[0024] 进一步地，所述超滤包括采用10KD超滤膜包对制品进行4~10倍透析，超滤透析是为了去除溶液中的离子、降低电导率、浓缩蛋白浓度。

[0025] 进一步地，所述稀释可以是使用平衡液或注射用水对制品进行稀释，稀释是为了调整制品参数，包括电导率、蛋白浓度；二次巴氏灭活工序，采用的灭活温度为60℃，时间为10h。其目的一是为了与第一步巴氏灭活一起形成双巴氏灭工艺，二是考察多聚体在二次灭活后变化情况，验证一次巴氏灭活与层析对多聚体的去除情况。

[0026] 相比于现有技术，本发明具有如下有益效果：

[0027] 本发明提供了一种人血白蛋白去除多聚体工艺，其制品在一次巴氏灭活工艺后增加了二次巴氏灭活工艺步骤，用双巴氏灭活法代替传统的巴氏灭活法制备人血白蛋白，降低了多聚体含量，有效提升了制品的质量；二次巴氏灭活不再产生多聚体，提高了产品的安全性；

[0028] 本发明还在一次巴氏灭活工艺和二次巴氏灭活工艺步骤中增加了离子交换层析工艺，将制品流过装有弱阴离子交换类填料的层析柱，利用简单的工艺有效去除制品中多

聚体和杂蛋白含量,进而提高人血白蛋白质量,降低产品使用过程中的不良反应的发生,可以提高人血白蛋白的市场竞争力,使得产品具备了更好的市场前景。

[0029] 本发明的其它优点、目标和特征将部分通过下面的说明体现,部分还将通过对本发明的研究和实践而为本领域的技术人员所理解。

具体实施方式

[0030] 为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与作用更加清楚及易于了解,下面结合具体实施方式对本发明作进一步阐述:

[0031] 人血白蛋白去除多聚体工艺,现有技术中,包括如下步骤:

[0032] S1、组分分离:将出库的血浆表面进行消毒清洗后破袋,然后在融浆罐中融合血浆,通过离心机分离冷沉淀后,将上清打入分离罐,具体为,通过离心机分离冷沉淀后,将上清打入分离罐,之后使用人血白蛋白分离罐和压滤机进行分离,之后使用人血白蛋白分离罐和压滤机进行分离得到组分I、组分II+组分III、组分IV以及组分V沉淀;S2、人血白蛋白纯化工序:将组分V沉淀在人血白蛋白分离罐中进行溶解、精制以及过滤工序,后使用超滤机对人血白蛋白进行超滤;S3、一次巴氏灭活工序:在巴氏灭活罐中对上一步超滤后的人血白蛋白进行配制,然后在巴氏灭活罐中进行巴氏灭活处理;S4、层析工序:使用层析系统进行离子交换层析;S5、二次巴氏灭活工序:在巴氏灭活罐中对上一工序的人血白蛋白原液进行巴氏灭活处理;S6、无菌灌装工序:在灌装线上进行除菌灌装。

[0033] 组分V沉淀经过精制、超滤脱醇后,得到人血白蛋白原液,人血白蛋白原液添加辛酸钠、氯化钠配制后通过60℃、10h巴氏灭活。巴氏灭活后的人血白蛋白多聚体含量显著增加,巴氏灭活后产生的多聚体可以通过强阴离子交换层析去除。

[0034] 进一步地,对PH的筛选步骤:

[0035] 人血白蛋白巴氏灭活后通过层析,能显著去除制品中的多聚体,并且对蛋白纯度的提高及PKA的降低都具有影响,因此为筛选出最优pH值,以蛋白浓度80g/L、电导率1.50ms/cm、保留时间20min、载量1000g/L上样,pH值分别调整为4.40、4.60、4.80。

[0036] 取成品人血白蛋白,规格5g/瓶(10%,50ml)。

[0037] 消毒液:0.5mol/L氢氧化钠溶液。

[0038] 平衡母液:醋酸-醋酸钠缓冲液,pH 4.60±0.02,按15ms/cm配制。

[0039] 平衡液:醋酸-醋酸钠缓冲液,pH 4.60±0.02,按1.50ms/cm的电导率稀释配制。

[0040] 洗脱液:1.0mol/L氯化钠溶液+1/10平衡母液。pH 4.60±0.02

[0041] CIP溶液:1.0mol/L氯化钠+0.5mol/L氢氧化钠+20%乙醇。

[0042] 封存液:0.15mol/L氯化钠+20%乙醇。

[0043] 缓冲液:1.0mol/L醋酸溶液、0.5mol/L氢氧化钠溶液,用于调整制品及溶液pH。

[0044] 使用的层析柱具体参见表1:

[0045] 表1层析柱信息

[0046]	凝胶名称	NanoGel-50DEAE 4.654ml
	层析柱规格	7.7×100mm
	耐压	≤0.5MPa
	凝胶体积	4.654ml

载量	1000g/L
每次层析蛋白量	4.654g

[0047] 表2层析上样流程

溶液名称	柱体积 (CV)	流速 (ml/min)	预计时间 (min)
0.5mol/L氢氧化钠溶液	3~5	0.5	30~50
平衡母液	3~5	0.5	30~50
平衡液	3~5	0.5	30~50
制品	按载量计算	0.23	/
平衡液	3~5	0.23	60~100
洗脱液	3~5	0.5	30~50
CIP液	3~5	0.5	30~50
封存液	3~5	0.5	30~50

[0049] 其制备的流程为:

[0050] S1、制品准备:取成品人血白蛋白若干瓶,撬瓶后倒出,使用0.22 μ m滤芯过滤,用1.0mol/L醋酸溶液调整制品pH值至4.80 \pm 0.02;S2、制品超滤:浓缩制品蛋白浓度至70 \pm 10g/L,等体积超滤透析6倍纯化水,超滤结束后取样检测蛋白的浓度、电导率、pH值、纯度以及多聚体含量,将检测后的人血白蛋白分为三份,分别调整制品蛋白浓度、电导率和pH值至以下情况:

[0051] ①、蛋白浓度在80 \pm 2g/L,电导率1.50 \pm 0.02ms/cm,pH值4.80 \pm 0.02;

[0052] ②、蛋白浓度在80 \pm 2g/L,电导率1.50 \pm 0.02ms/cm,pH值4.60 \pm 0.02;

[0053] ③、蛋白浓度在80 \pm 2g/L,电导率1.50 \pm 0.02ms/cm,pH值4.40 \pm 0.02;

[0054] S3、层析:按人血白蛋白浓度、载量计算层析上样体积,每一份样品上样两次,开始上样即开始收集流穿液,取样检测蛋白浓度、多聚体和纯度,洗脱液收集检测多聚体、蛋白浓度。

[0055] 进一步地,所述层析工序包括对电导率的筛选步骤:

[0056] S1、制品准备:取成品人血白蛋白6瓶,撬瓶后倒出,用0.22 μ m滤芯过滤,再用1.0mol/L醋酸溶液调整制品pH值至4.60 \pm 0.02;S2、制品超滤:浓缩制品人血白蛋白浓度至70 \pm 10g/L,体积为350ml-400ml,等体积超滤透析5倍纯化水,超滤结束后取样检测蛋白浓度、电导率、pH值、纯度以及多聚体,将检测后的人血白蛋白分为三份,分别调整制品蛋白浓度、电导率和pH值至以下情况:

[0057] ①、蛋白浓度在70 \pm 2g/L,电导率4.00 \pm 0.02ms/cm,pH值4.60 \pm 0.02;

[0058] ②、蛋白浓度在70 \pm 2g/L,电导率2.50 \pm 0.02ms/cm,pH值4.60 \pm 0.02;

[0059] ③、蛋白浓度在70 \pm 2g/L,电导率1.00 \pm 0.02ms/cm,pH值4.60 \pm 0.02;

[0060] S3、层析:按蛋白浓度、载量计算层析上样体积,每一份样品上样两次,开始上样即开始收集流穿液,取样检测蛋白浓度、多聚体以及纯度,洗脱液收集检测蛋白浓度,剩余洗脱液用取样袋留存,保存在-30 $^{\circ}$ C环境中;S4、分析结果:按蛋白回收率、纯度、多聚体分析实验结果。

[0061] 实施例一

[0062] 1、步骤一:取50ml/瓶、10g/瓶人血白蛋白成品2瓶,用1.0mol/L醋酸溶液调整制品

pH4.6,再用注射用水调整制品电导率5.0ms/cm、蛋白浓度30g/L,取样检测多聚体。

[0063] 步骤二:准备已装载离子交换凝胶的预装柱,用纯化水冲洗干净预装柱,再用pH4.60、电导率5.0ms/cm的醋酸钠缓冲液平衡层析柱。

[0064] 步骤三:将调整好的制品溶液按照载量400g/L(每升凝胶上样400克蛋白质的量)上样至层析柱,制品层析结束后,再用pH4.60、电导率5.0ms/cm的醋酸钠缓冲液冲洗层析柱,收集整个过程的流穿液,取样检测多聚体。

[0065] 步骤四:分别用1.0mol/L氯化钠、0.5mol/L氢氧化钠、纯化水冲洗层析柱并封存。

[0066] 2、结果

序号	多聚体含量 (%)		层析去除率
	层析前	层析后	
[0067] 1	2.0	0.65	67.5%
2	2.1	0.67	68.1%

[0068] 3、结论

[0069] 用离子交换层析在电导率5.0ms/cm也能达到去除一部分多聚体的效果。

[0070] 实施例二

[0071] 1、步骤

[0072] 步骤一:取50ml/瓶、10g/瓶人血白蛋白成品2瓶,用1.0mol/L醋酸溶液调整制品pH4.60,再用注射用水调整制品电导率1.5ms/cm、蛋白浓度100g/L,取样检测多聚体。

[0073] 步骤二:准备已装载离子交换凝胶的预装柱,用纯化水冲洗干净预装柱,再用pH4.60、电导率1.5ms/cm的醋酸钠缓冲液平衡层析柱。

[0074] 步骤三:将调整好的制品溶液按照载量400g/L(每升凝胶上样400克蛋白质的量)上样至层析柱,制品层析结束后,再用pH4.60、电导率1.5ms/cm的醋酸钠缓冲液冲洗层析柱,收集整个过程的流穿液,取样检测多聚体。

[0075] 步骤四:分别用1.0mol/L氯化钠、0.5mol/L氢氧化钠、纯化水冲洗层析柱并封存。

[0076] 2、结果

序号	多聚体含量 (%)		层析去除率
	层析前	层析后	
[0077] 1	2.0	0.05	97.5%
2	2.0	0.37	81.5%
3	1.7	0.05	97.1%
4	2.0	0.04	98.0%

[0078] 3、结论

[0079] 将电导降低至1.5ms/cm,蛋白浓度提高至100g/L,多聚体的去除率也非常高,适合大规模放大生产。

[0080] 实施例三

[0081] 1、步骤

[0082] 步骤一：取50ml/瓶、10g/瓶人血白蛋白成品6瓶，用0.22 μ m的滤膜对制品过滤，再用10KD膜包对制品等体积5~10倍超滤。

[0083] 步骤二，超滤结束后用1.0mol/L醋酸溶液调整制品pH4.60，再用注射用水调整制品电导率至1.0ms/cm、蛋白浓度100g/L，取样检测多聚体。

[0084] 步骤三：准备已装载离子交换凝胶的预装柱，用纯化水冲洗干净预装柱，再用pH4.60、电导率1.0ms/cm的醋酸钠缓冲液平衡层析柱。

[0085] 步骤四：将调整好的制品溶液按照载量1500g/L（每升凝胶上样400克蛋白质的量）上样至层析柱，制品层析结束后，再用pH4.60、电导率1.0ms/cm的醋酸钠缓冲液冲洗层析柱，收集整个过程的流穿液，取样检测多聚体。

[0086] 2、结果

序号	多聚体含量 (%)		层析去除率
	层析前	层析后	
1	2.0	0.06	97.0%
2	2.0	0.17	91.5%

[0088] 3、结论

[0089] 进一步降低电导率至1.0ms/cm，保持蛋白浓度不变，层析的载量可以达到1500g/L凝胶，进一步证明放大规模性生产的可能性。

[0090] 实施例四

[0091] 1、步骤

[0092] 步骤一：取50ml/瓶、10g/瓶人血白蛋白成品6瓶，用0.22 μ m的滤膜对制品过滤，再用10KD膜包对制品等体积5~10倍超滤。

[0093] 步骤二，超滤结束后用1.0mol/L醋酸溶液调整制品pH4.60，再用注射用水调整制品电导率至1.0ms/cm、蛋白浓度100g/L，取样检测多聚体。

[0094] 步骤三：准备已装载离子交换凝胶的预装柱，用纯化水冲洗干净预装柱，再用pH4.60、电导率1.0ms/cm的醋酸钠缓冲液平衡层析柱。

[0095] 步骤四：将调整好的制品溶液按照载量400g/L（每升凝胶上样400克蛋白质的量）上样至层析柱，制品层析结束后，再用pH4.60、电导率1.0ms/cm的醋酸钠缓冲液冲洗层析柱，收集整个过程的流穿液，取样检测多聚体。

[0096] 步骤五：层析后的制品流穿液再用10KD膜包对制品等体积5~10倍超滤，超滤结束后按照配制成蛋白含量100g/L的人血白蛋白制品，根据0.168mmol/g蛋白添加辛酸钠，105mmol/L添加氯化钠，调整制品pH至6.4~7.4。

[0097] 步骤六：配制好的制品分装至50ml模制瓶中，并放入60℃水浴锅中10h恒温灭活，灭活结束后取样检测多聚体。

[0098] 2、结果

序号	多聚体含量 (%)			层析去除率
	层析前	层析后	灭活后	
1	2.0	0.05	0.10	97.5%
2	2.0	0.17	0.20	91.5%

[0100] 3、结论

[0101] 在层析后,对制品进行处理,配制成成品人血白蛋白,并再次对人血白蛋白成品进行巴氏灭活,对比多聚体含量没有显著上升。

[0102] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。