



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102190722 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 26

(21) 申请号 201010124935. 2

CN 1127299 A, 1996. 07. 24, 说明书全文.

(22) 申请日 2010. 03. 16

孟凡红. 重组人血清白蛋白在汉逊酵母中的表达与纯化. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库(工程技术 I 辑)》. 2007, B016-111.

(73) 专利权人 上海欣瑞特生物医药技术有限公司

孟凡红. 重组人血清白蛋白在汉逊酵母中的表达与纯化. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库(工程技术 I 辑)》. 2007, B016-111.

地址 201203 上海市张江高科技园区牛顿路
200 号 8 号楼 A 座 -02 座

(72) 发明人 项炜 朱威 陈忠

审查员 郭婷婷

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 陈静

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 1/22(2006. 01)

C07K 1/20(2006. 01)

C07K 1/18(2006. 01)

C07K 1/16(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1406245 A, 2003. 03. 26, 说明书第 4 页第 4 段.

CN 1364643 A, 2002. 08. 21, 说明书第 4 页最后一段, 第 14 页第 4 段, 第 15 页第 4 段, 第 16 页倒数第二段.

权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

一种纯化重组人血白蛋白的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种纯化重组人血白蛋白(rHSA)的方法。该方法包括将发酵液不经处理,直接用扩张床阴离子柱一步层析达到固液分离、浓缩和初步纯化的三个层析纯化作用。再经过加热、疏水层析、阳离子交换、超滤、螯合、沉淀等步骤获得超高纯度的重组人血白蛋白。

1. 一种纯化重组人血清白蛋白的方法,其特征在于,所述方法包括:

(a) 将含有重组人血清白蛋白的发酵液上样到含有吸附剂的流化床,使得吸附剂选择性吸附所述重组人血清白蛋白;其中,所述的吸附剂是 Streamline 阴离子交换树脂;上样前,将所述的含有吸附剂的流化床调节 pH7.0-8.0;上样后,将吸附了所述重组人血清白蛋白的含有吸附剂的流化床调节 pH7.0-8.0;所述的 Streamline 阴离子交换树脂选自: Streamline Q, Streamline Q XL, 或 Streamline DEAE; 以及

(b) 回收被吸附的重组人血清白蛋白;

步骤 (b) 中,还包括:依次采用以下方法进一步纯化:(1) 疏水层析;(2) 脱色;(3) 葡聚糖凝胶过滤;(4) 阴离子交换树脂层析;步骤 (1) 中,疏水层析的配基选自:苯基,脂肪族或杂环;

步骤 (2) 中包括:(i) 采用硼酸或硼酸盐和二价金属离子处理经疏水层析的样液,然后加热至 $60 \pm 20^{\circ}\text{C}$, 过滤收获滤过液;和 (ii) 将滤过液进行大孔树脂脱色,得到经脱色的样液;且在 (i) 和 (ii) 之间,还包括步骤:对滤过液进行超滤;其中二价金属离子选自: Ca^{2+} 或 Mg^{2+} ;硼酸或硼酸盐的浓度为 $1 \sim 500\text{mM}$;二价金属离子的浓度在 $1 \sim 500\text{mM}$ 之间;所述的大孔树脂是含有氨基和羟基的共聚高分子多孔树脂。

一种纯化重组人血白蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域；更具体地，本发明涉及一种纯化重组人血白蛋白（rHSA）的方法。

背景技术

[0002] 人血清白蛋白是血浆中的主要蛋白成分，由 585 个氨基酸组成，分子量为 66kD。人血清白蛋白在血液中主要作用是维持正常渗透压，与钙离子、脂肪酸、氨基酸、胆红素和各种药物相结合，并起到转运载体的作用。临床上人血清白蛋白常用于外科手术、出血性休克、烫伤、肾病综合征导致的白蛋白缺乏症、肿瘤肝腹水等疾病的治疗。

[0003] 一直以来，人血清白蛋白是从人血液中纯化得到的。由于血源匮乏和病毒（肝炎、AIDS）污染等原因，基因重组人血清白蛋白在近十年中得到了国内外大型制药公司的重视。近年来，采用基因重组的方法，在酵母菌（USP5, 330, 901、JP11-509525、JP6-100592）、大肠杆菌（Lawn, R. M. Construction of DNA sequences and their use for microbial production of proteins, in particular human serum albumin “European Patent Appl.” (1983) 73, p646）、转基因牛奶（W09602573A1 SEPARATION OF HUMAN SERUM ALBUMIN）中表达和纯化出人血清白蛋白。

[0004] 然而，人血清白蛋白的临床治疗中的给药剂量较大，一般情况下为 5 ~ 10g/ 剂量之间，所以与微量给药的常规重组药物相比，杂质产生的副作用成为十分严重问题。因此，对于基因重组白蛋白比目前市场上的人血清白蛋白和其他基因重组药品的制剂的纯度要高度多。到目前为止仅有日本三菱制药株式会社的毕赤酵母发酵的 rHSA 在 2008 年上市，商品名：**MEDWAY®**。解决 rhSA 的主要难点，就是建立超高纯度（纯度高于 99%）和良好的经济性（成本不高于血液纯化的白蛋白）rHSA 的制备方法。

[0005] 野田宗宏等人在专利 CN1127299A 和 CN1364643A 中描述了酵母发酵后利用加热发酵液、稀释、调酸、扩张床阳离子（STREAMLINE SP-GE Healthcare 公司专为扩张床设计的商品化树脂）层析、加热、疏水层析、螯合吸附、阴离子交换、硼酸钙沉淀等步骤得到高纯度 rHSA 的方法。该方法中，第一步加热的目的是灭活蛋白酶，否则阳离子交换树脂需要的酸性条件将激活蛋白酶的活性，从而在纯化过程中降解 rHSA。该方法稀释的目的是降低离子强度以达到 Streamline SP 能够吸附的效果。但是，该方法的缺点是加热灭活使得过程延长；调酸激活蛋白酶活性导致 rHSA 降解风险；大体积稀释使得纯化的溶液体积增加，从而需要扩大纯化设备的规模，纯化过程延长。这样将导致 rHSA 产品的收率减少，成本增加，产品的品质有可能下降，产品染菌的风险增加等等问题。

[0006] 柴田伸一等人在中国专利 CN1934128A 中公开了一种在 2 价阳离子存在下通过加热处理制备人血清白蛋白的方法，野内俊伸等人在中国专利 CN1406246A 中公开了包括加热处理步骤的人血清白蛋白的制造方法。

[0007] 然而，上述方法均存在处理条件复杂，固液分离效率不高，获得的产物纯度不高等缺点。因此，目前还需要进一步开发更理想的纯化重组人血清白蛋白的方法，以满足生产所

需和临床所需。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种纯化重组人血白蛋白 (rHSA) 的方法。

[0009] 在本发明的第一方面,提供一种纯化重组人血清白蛋白的方法,所述方法包括:

[0010] (a) 将含有重组人血清白蛋白的发酵液上样到含有吸附剂的流化床,使得吸附剂选择性吸附所述重组人血清白蛋白;其中,所述的吸附剂是阴离子交换树脂;以及

[0011] (b) 回收被吸附的重组人血清白蛋白。

[0012] 在一个优选例中,在进入含有吸附剂的流化床前,所述的含有重组人血清白蛋白的发酵液不经过加热处理。

[0013] 在另一优选例中,上样前,将所述的含有吸附剂的流化床调节 pH7.0-8.0;较佳地,用缓冲液平衡至 pH7.0-8.0;或

[0014] 上样后,将吸附了所述重组人血清白蛋白的含有吸附剂的流化床调节 pH7.0-8.0;较佳地,用 pH7.0-8.0 的缓冲液清洗。

[0015] 在另一优选例中,上样前,所述的含有吸附剂的流化床调节 pH7.0-7.5;或上样后,吸附了所述重组人血清白蛋白的含有吸附剂的流化床调节 pH7.0-7.5。

[0016] 在另一优选例中,所述的阴离子交换树脂是 Streamline 阴离子交换树脂。

[0017] 在另一优选例中,所述的 Streamline 阴离子交换树脂选自:Streamline Q, Streamline Q XL,或 Streamline DEAE。

[0018] 在另一优选例中,步骤 (b) 中,还包括:依次采用以下方法进一步纯化:(1) 疏水层析;(2) 脱色;(3) 葡聚糖凝胶过滤;(4) 阴离子交换树脂层析。

[0019] 在另一优选例中,步骤 (2) 中包括:

[0020] (i) 采用硼酸或硼酸盐和二价金属离子处理经疏水层析的样液,然后加热至 $60 \pm 20^\circ\text{C}$;较佳地 $60 \pm 10^\circ\text{C}$;更佳地 $60 \pm 5^\circ\text{C}$ 。较佳地,加热 2 ± 1 小时,过滤收获滤过液;

[0021] (ii) 将滤过液进行大孔树脂脱色,得到经脱色的样液。

[0022] 在另一优选例中,在 (i) 和 (ii) 之间,还包括步骤:对滤过液进行超滤。

[0023] 在另一优选例中,二价金属离子选自: Ca^{2+} 或 Mg^{2+} ;或

[0024] 硼酸或硼酸盐的浓度为 $1 \sim 500\text{mM}$;较佳地为 $10 \sim 200\text{mM}$;更佳地为 $50 \pm 20\text{mM}$;最佳地为 $50 \pm 10\text{mM}$;或

[0025] 二价金属离子的浓度在 $1 \sim 500\text{mM}$ 之间;较佳地为 $10 \sim 80\text{mM}$;更佳地为 $30 \pm 20\text{mM}$;最佳地为 $30 \pm 10\text{mM}$ 。

[0026] 在另一优选例中,所述的大孔树脂是含有氨基和羟基的共聚高分子多孔树脂。

[0027] 在另一优选例中,疏水层析的配基选自:苯基,脂肪族或杂环。

[0028] 在另一优选例中,疏水层析的纯化方式为流穿。

[0029] 在另一优选例中,所述的葡聚糖凝胶过滤采用 Superdex 系列或 Sephadex G 系列。更佳地,所述的葡聚糖凝胶 Sephadex G75。

[0030] 在另一优选例中,阴离子交换树脂层析的树脂包括:DEAE、QAE、Q 配基。

[0031] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

[0032] 图 1、扩张床 Streamline Q XL 处理后 rHSA 的样品峰。

[0033] 图 2、Phenyl Sepharose(H Sub) 疏水层析后 rHSA 的样品峰。

[0034] 图 3、大孔脱色树脂 XSC700 处理后 rHSA 的样品峰。

[0035] 图 4、DEAE Sepharose FF 阴离子层析处理后 rHSA 的样品峰。

具体实施方式

[0036] 本发明人经过广泛的研究,开发出一种将发酵液不经加热处理,直接用含有吸附剂(阴离子树脂)的流化床进行固液分离,再经过多个纯化步骤获得超高纯度的重组人血清白蛋白的方法。

[0037] 如本文所用,所述的重组人血清白蛋白(rHSA)是指通过重组技术产生的人血清白蛋白。即将编码人血清白蛋白的 DNA 导入到合适的宿主细胞中,在适于表达的条件下培养该细胞,从而产生重组人血清白蛋白。所述的宿主细胞选自:细菌(如大肠杆菌和枯草杆菌),酵母(如啤酒酵母、巴斯德毕赤酵母和克鲁维氏等),植物细胞,动物细胞。优选的微生物是巴斯德毕赤酵母。较佳地,所述的重组人血清白蛋白被分泌到胞外。

[0038] 本发明提供一种纯化重组人血清白蛋白的方法,所述方法包括:(a)将含有重组人血清白蛋白的发酵液上样到含有吸附剂的流化床,使得吸附剂选择性吸附所述重组人血清白蛋白;其中,所述的吸附剂是阴离子交换树脂;以及(b)回收被吸附的重组人血清白蛋白。

[0039] 本发明人发现,在固液分离前进行加热处理,会导致杂质凝集,不利于后续的分离,且去除凝集物的步骤也很复杂,直接影响到提取率以及纯化效果。此外,在固液分离前进行酶抑制剂处理,会导致成本大大提高(酶抑制剂价格高昂),以及引入外部污染物的结果。而本发明的方法不同于现有技术中常规的纯化方法,在进入含有吸附剂的流化床前,所述的含有重组人血清白蛋白的发酵液不经过加热处理,也不经过酶抑制剂处理。

[0040] 所述的含有吸附剂的流化床中,吸附剂是阴离子交换树脂,较佳地是 Streamline 阴离子树脂。其在碱性条件下对 rHSA 有很好的吸附和分离性能,不需要对弱碱性的发酵液进行调酸,因而不会激活蛋白酶造成对目标蛋白的降解,同时也避免了酸性条件下 rHSA 的聚合反应。采用碱性条件还可以节省以后纯化过程中的解聚步骤。因此,上样前,将所述的含有吸附剂的流化床调节 pH7.0-8.0;较佳地,用缓冲液平衡至 pH7.0-8.0;更佳地调节 pH7.0-7.5;或上样后,将吸附了所述重组人血清白蛋白的含有吸附剂的流化床调节 pH7.0-8.0;较佳地,用 pH7.0-8.0 的缓冲液清洗;更佳地调节 pH7.0-7.5。

[0041] 所述的 Streamline 阴离子交换树脂选自:Streamline Q, Streamline Q XL,或 Streamline DEAE。更佳地,所述的 Streamline 阴离子树脂优选 Streamline XL 阴离子树脂(GE Healthcare 公司),该树脂的蛋白载量提高的将近 5~10 倍,在较宽的 pH 范围内和高离子强度下都有很好的吸附性能。

[0042] 固液分离之后,还可以对获得的重组人血清白蛋白进行进一步的纯化,可以采用本领域技术人员熟知的多种蛋白纯化方法进行。

[0043] 本发明人对固液分离之后的蛋白纯化也进行了深入的研究和优化,找到了较佳的

纯化方法。因此,作为本发明的优选方式,固液分离后,还包括:依次采用以下方法进一步纯化:(1) 疏水层析;(2) 脱色;(3) 葡聚糖凝胶过滤;(4) 阴离子交换树脂层析。按照上述的纯化次序进行重组人血清白蛋白的进一步纯化,纯化效果非常理想,且得率高。

[0044] 本发明对于疏水层析的方法没有特别的限制。较佳地,疏水层析的配基选自:苯基,脂肪族或杂环。较佳地,疏水层析的纯化方式为流穿。例如,可采用 Phenyl Sepharose (H Sub) 柱 (GE 公司) 进行。

[0045] 脱色也可采用本领域技术人员熟知的方法,只要该方法能够有效去除发酵液中的各种色素和含有颜色的物质。然而,本发明人发现,在硼酸或硼酸盐的存在下,二价的金属离子在加热后有更好的去除色素结合白蛋白的能力。因此,作为本发明的优选方式,脱色方法包括:(i) 采用硼酸或硼酸盐和二价金属离子处理经疏水层析的样液,然后加热至 $60 \pm 20^\circ\text{C}$, 较佳地 $60 \pm 10^\circ\text{C}$;更佳地 $60 \pm 5^\circ\text{C}$;较佳地加热 2 ± 1 小时,过滤收获滤过液;(ii) 将滤过液进行大孔树脂脱色,得到经脱色的样液。采用所述优选的脱色方法,A350/A280 值低,脱色效果更为理想。

[0046] 作为本发明的更为优选的方式,在 (i) 和 (ii) 之间,还包括步骤:对滤过液进行超滤。

[0047] 作为本发明的更为优选的方式,所述的二价金属离子选自: Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 。

[0048] 作为本发明的更为优选的方式,硼酸或硼酸盐的浓度为 $1 \sim 500\text{mM}$;较佳地为 $10 \sim 200\text{mM}$;更佳地为 $50 \pm 20\text{mM}$;最佳地为 $50 \pm 10\text{mM}$;或二价金属离子的浓度在 $1 \sim 500\text{mM}$ 之间;较佳地为 $10 \sim 80\text{mM}$;更佳地为 $30 \pm 20\text{mM}$;最佳地为 $30 \pm 10\text{mM}$ 。本发明中硼酸盐包括:原硼酸、偏硼酸、四硼酸或它们生成的盐及其水合物,比如四水硼酸钠和六水硼酸钠等。

[0049] 作为本发明的更为优选的方式,所述的大孔树脂是含有氨基和羟基的共聚高分子多孔树脂。

[0050] 在脱色步骤的加热过程中,还可加入辛酸钠作为保护剂;或可加入乙酰半胱氨酸、半胱氨酸等还原剂,放置 rHSA 聚合;也允许加入盐酸胍、氨基盐酸胍等裂解剂,解聚已经聚合的 rHSA。所述的硼酸或硼酸盐与二价金属离子加热处理步骤在 rHSA 纯化流程中允许在不同的阶段进行。

[0051] 葡聚糖凝胶过滤也可采用本领域技术人员熟知的技术。作为本发明的优选方式,所述的葡聚糖凝胶过滤采用 Superdex 系列或 Sephadex G 系列。更佳地,所述的葡聚糖凝胶 Sephadex G75。

[0052] 阴离子交换树脂层析也可采用本领域技术人员熟知的技术。作为本发明的优选方式,阴离子交换树脂层析的树脂包括:DEAE、QAE、Q 配基。

[0053] 在收获 rHSA 后,可以采用本技术领域熟知的技术进行蛋白纯度的分析,所述的方法包括但不限于:HPLC,柱子 G3000SW_{XL} (7.8mm IDx30cm, Tosoh 公司), UV 280nm。

[0054] 色度的分析可以采用紫外分光光度计。将重组人血白蛋白用超纯水稀释,使其在 280nm 的吸光度值在 $0.3 \sim 0.7$ 之间。以超纯水为空白,测量 280nm 吸光度值。将重组人血白蛋白用超纯水稀释,使其在 350nm 吸光度值在 $0.3 \sim 0.7$ 之间。以超纯水为空白,在 330-520nm 范围内扫描。选取 350nm 吸光度值。研究 $A_{350}/A_{280} = (350\text{nm 的吸光度值} \times \text{稀释倍数}) / (280\text{nm 的吸光度值} \times \text{稀释倍数})$ 。

[0055] 可以采用本技术领域熟知的技术进行蛋白浓度的分析,例如可采用 BCA 检测试剂

盒 (BCA Protein Assay Kit, Thermo)。

[0056] 本发明的主要优点在于：

[0057] (1) 本发明提供了一种在较短时间和较少的工艺流程将 rHSA 提纯到一个超高纯度水平的简单方法。固液分离前, 发酵液不需要加热, 在上柱前不稀释或同步少量稀释即可快速进行 Streamline 阴离子树脂的固液分离、浓缩和初步纯化。本发明克服了现有技术中必须加热灭活蛋白酶才能进行固液分离的技术缺陷。

[0058] (2) 本发明还对固液分离之后的进一步纯化步骤也进行了优化, 找到了较佳的纯化次序。

[0059] (3) 本发明还优化了脱色方法, 使得蛋白脱色效果非常理想。

[0060] 下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件如 Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室指南 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明, 否则百分比和份数按重量计算。

[0061] 除非另行定义, 文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外, 任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0062] 实施例 1、重组菌的构建和表达

[0063] GS115 毕赤酵母菌株 (来自 ATCC), 由 pPIC9K (购自 Invitrogen) 多克隆位点插入全长的 HSA cDNA 片段 (参见 GenBank 登录号: AF190168)。将 Sal I 酶线性化的 rHSA 表达质粒用电穿孔法转化 GS115 菌株, 涂 MD 平板, 取菌落接种在含 200 微升 YPD 培养基的 96 孔板中, 30°C 培养 2 天, 取 10 微升转接于含 190 微升 YPD 的 96 孔新板中, 过夜培养。同上稀释一次后, 取 1 微升菌液分别点样于 G418 浓度为 0.5 ~ 8mg/ml 的 YPD 平板。挑抗性克隆于 BMGY 培养基中 30°C 振荡培养至 D_{600} 为 2 ~ 6 时, 离心收菌体并悬于 1/5 ~ 1/10 的 BMMY 培养基中继续培养, 每天补甲醇进行诱导表达。将培养上清进行 SDS-PAGE 筛选出高表达菌株。(参见《军事医学科学院院刊》2001 年 9 月第 25 卷第三期第 202 ~ 204 页)。

[0064] 将一管筛选出扩增制备后冻存的重组 rHSA 毕赤酵母菌株在 30°C 水浴融解后, 无菌转移到含有 200mL YPD 培养基的三角摇瓶。密封摇瓶并放置到 30°C 的摇床中, 摇动震荡培养 24 小时。到时时, 将种子培养无菌转移到含 5LYPD 培养基的 10L 发酵罐中。通气、搅拌开始发酵 30°C, 24 小时。然后将培养液无菌转移到 1.2m³ 的发酵罐中, 先期加入含甘油的 YPD 培养基培养 48 小时, 待甘油消耗完毕后, 加入含甲醇的 YPM 培养基和 SM 培养基诱导产生 rHSA, 培养 250 小时, 得到含 rHSA 8.5g/L 的培养液。

[0065] 实施例 2、固液分离

[0066] 重组的含 rHSA 基因的巴斯德毕赤酵母菌, 通过高密度发酵, 得到表达量为 8.5g(rHSA)/L 的培养液。取 20L 该培养液, 用蒸馏水稀释 20% (24L) 左右 (稀释的目的是增加流动性), 直接进样到 Streamline Q XL 柱 (Direct95/1.7 柱, 95mm×170cm, 凝胶体积 2500mL, GE 公司), 400cm/h 流速, 该柱预先用 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 平衡, 在进样完成后用同样的 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 清洗。然后用 20mM 磷酸钠缓冲液 +1.0M NaCl 溶液洗脱, 流速 200cm/h, 收集含 rHSA 的样品峰 (6.2L)。见图 1。

[0067] 实施例 3、疏水纯化

[0068] 将实施例 2 中得到的初步纯化的 rHSA 直接进样到 PhenylSepharose(H Sub) 柱 (500mm×25cm, GE 公司), 该柱预先用 50mM 磷酸-150mM 氯化钠缓冲液 (pH 6.9) 平衡, 上样完成后, 用相同的平衡液洗涤, 当含 rHSA 流穿液出现后, 开始收集样品 (12.7L)。见图 2。

[0069] 实施例 4、硼酸钠 + 氯化钙 加热沉淀脱色纯化

[0070] 将实施例 3 中得到的含 rHSA 的溶液, 加入终浓度到 10mM 辛酸钠, 50mM 硼酸钠, 用 20% (w/v) 氢氧化钠调节 pH 到 9.5, 放置 4 小时。然后加入氯化钙至终浓度 30mM, 用 20% 氢氧化钠调节 pH 到 9.5, 60°C 加热 2 小时。用压滤得到澄清的溶液 (13.5L)。

[0071] 实施例 5、超滤

[0072] 将实施例 4 中得到含 rHSA 的溶液, 用截流分子量 10kDa 的超滤膜超滤, 浓缩, 然后对蒸馏水除盐超滤, 得到 2.1L 的溶液。

[0073] 实施例 6、脱色

[0074] 用大孔脱色树脂 XSC700 (西安电力树脂厂) 柱 (300mm×300mm) 脱色, 该脱色柱预先用 pH 3 的醋酸溶液平衡, 将实施例 5 得到的含 rHSA 的溶液 (用 50% (v/v) 醋酸调 pH 到 4.5) 泵入, 并循环 16 小时。循环完成后, 用蒸馏水洗脱吸附的 rHSA 蛋白, 得到 3.9L 的脱色 rHSA 溶液。见图 3。

[0075] 实施例 7、除内毒素、核酸、小分子物质和除盐

[0076] 将实施例 6 中得到的含 rHSA 溶液 (用 2M 的 NaOH 调 pH 到 6.9), 泵入 Sephadex G75 (200mm×300mm, GE 公司) 柱中, 蒸馏水洗脱, 得到 7.8L 的 rHSA 溶液。

[0077] 实施例 8、阴离子纯化

[0078] 将实施例 7 中得到的含 rHSA 的溶液, 载入到预先用 100mM 磷酸盐缓冲液 pH7.2 平衡好的 DEAE Sepharose FF XK 50/20 柱 (GE 公司), 载入完成后用平衡液洗涤, 然后用 100mM 磷酸盐 +0.5M NaCl (0 → 100%) 梯度洗脱, 得到 17.2L 的 rHSA 溶液。见图 4。

[0079] 采用文献 (Wataru Ohtani, *Toyoo Ohda, Akinori Sumi, Kaoru Kobayashi, and Takao Ohmura. Analysis of Pichia pastoris Components in Recombinant Human Serum Albumin by Immunological Assays and by HPLC with Pulsed Amperometric Detection, Anal. Chem. 1998, 70, 425-429) 方法测得毕赤酵母宿主的含量 < 1ng/ml (250mg/ml)。

[0080] 获得的 rHSA 的纯度达到大于 99.999999%

[0081] 实施例 9、固液分离 2

[0082] 重组的含 rHSA 基因的巴斯德毕赤酵母菌 (GS115), 通过高密度发酵, 得到表达量为 9.2g(rHSA)/L 的培养液。取 20L 该培养液, 直接进样到 Streamline QXL 柱 (Direct95/1.7 柱, 95mm×170cm, 凝胶体积 2500mL), 400cm/h 流速, 该柱预先用 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 平衡, 在进样完成后用同样的 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 清洗。然后用 20mM 磷酸钠缓冲液 +1.0M NaCl 溶液洗脱, 流速 200cm/h, 收集含 rHSA 的样品峰 (8.8L)。

[0083] 实施例 10、硼酸盐与氯化钙的脱色试验

[0084] 将实施例 9 中得到的含 rHSA 的溶液 8.8L, 分成四份。

[0085] 第一份加入终浓度到 10mM 辛酸钠, 50mM 硼酸钠, 用 20% (w/v) 氢氧化钠调节 pH

到 9.5, 放置 4 小时。然后加入氯化钙至终浓度 30mM, 用 20% 氢氧化钠调节 pH 到 9.5, 60°C 加热 2 小时。过滤得到澄清的溶液。

[0086] 第二份加入终浓度到 10mM 辛酸钠, 50mM 硼酸钠, 用 20% 氢氧化钠调节 pH 到 9.5, 放置 4 小时。然后加入氯化钙至终浓度 30mM, 用 20% 氢氧化钠调节 pH 到 9.5, 常温放置 2 小时。过滤得到澄清的溶液。

[0087] 第三份加入终浓度到 10mM 辛酸钠, 50mM 硼酸钠, 用 20% 氢氧化钠调节 pH 到 9.5, 放置 4 小时, 然后再 60°C 加热 2 小时。过滤得到澄清的溶液。

[0088] 第四份加入氯化钙至终浓度 30mM, 用 20% 氢氧化钠调节 pH 到 9.5, 60°C 加热 2 小时。过滤得到澄清的溶液。

[0089] 计算上述处理后的溶液的 A350/A280 值, 值越低表示脱色效果越好。具体的不同纯化结果见表 1。

[0090] 表 1 不同条件下的纯化结果

[0091]

	辛酸钠 (10mM)	硼酸钠 (50mM)	氯化钙 (30mM)	加热 (60°C)	A350/A280
处理前					0.172
第一份	+	+	+	+	0.021
第二份	+	+	+	-	0.038
第三份	+	+	-	-	0.079
第四份	-	-	+	+	0.075

[0092] (注 :+ 表示含有, - 表示没有)

[0093] 实施例 11、固液分离对比例

[0094] 重组的含 rHSA 基因的巴斯德毕赤酵母菌 (GS115), 通过高密度发酵, 得到表达量为 8.5g (rHSA)/L 的培养液。取 20L 该培养液, 56°C 加热 30 分钟, 将蛋白酶灭活。再用蒸馏水稀释 4 倍左右, HAC 调 pH 到 4.5, 进样到 Streamline SP (阳离子树脂) 柱 (Direct95/1.7 柱, 95mm×170cm, 凝胶体积 2500mL, GE 公司), 300cm/h 流速, 该柱预先用磷酸缓冲液 (pH 4.5) 平衡, 在进样完成后用同样的 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 4.5) 清洗。然后用 50mM 磷酸钠缓冲液 +150mM NaCl 溶液 (pH 9.0) 洗脱, 流速 200cm/h, 收集含 rHSA 的样品峰 (5.8L)。后面按照实施例 2 至 7 的步骤进行处理, 得到 12.3L 的 rHSA 溶液, 该实施例方法的总收率较低, 为 32.2%。

[0095] 采用文献 (Wataru Ohtani, Toyoo Ohda, Akinori Sumi, Kaoru Kobayashi, and Takao Ohmura. Analysis of Pichia pastoris Components in Recombinant Human Serum Albumin by Immunological Assays and by HPLC with Pulsed Amperometric Detection, Anal. Chem. 1998, 70, 425-429) 方法测得毕赤酵母宿主的含量 4.3ng/ml (250mg/ml), 可见其宿主蛋白的去除率较低。

[0096] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

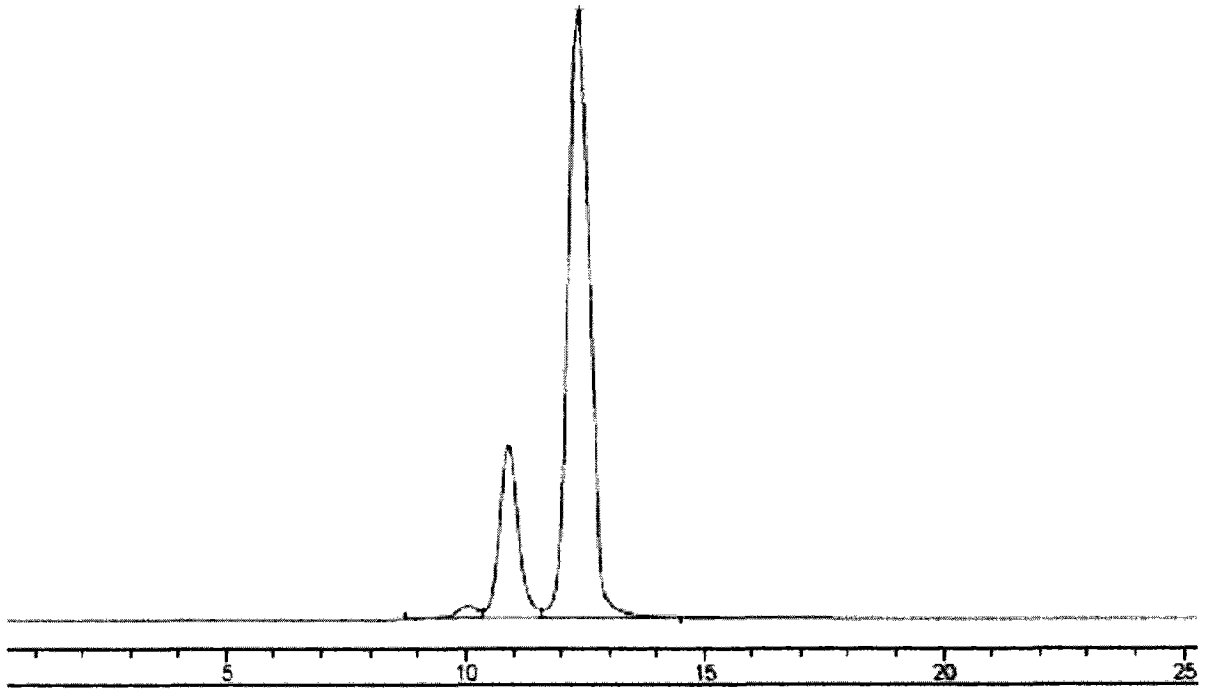


图 1

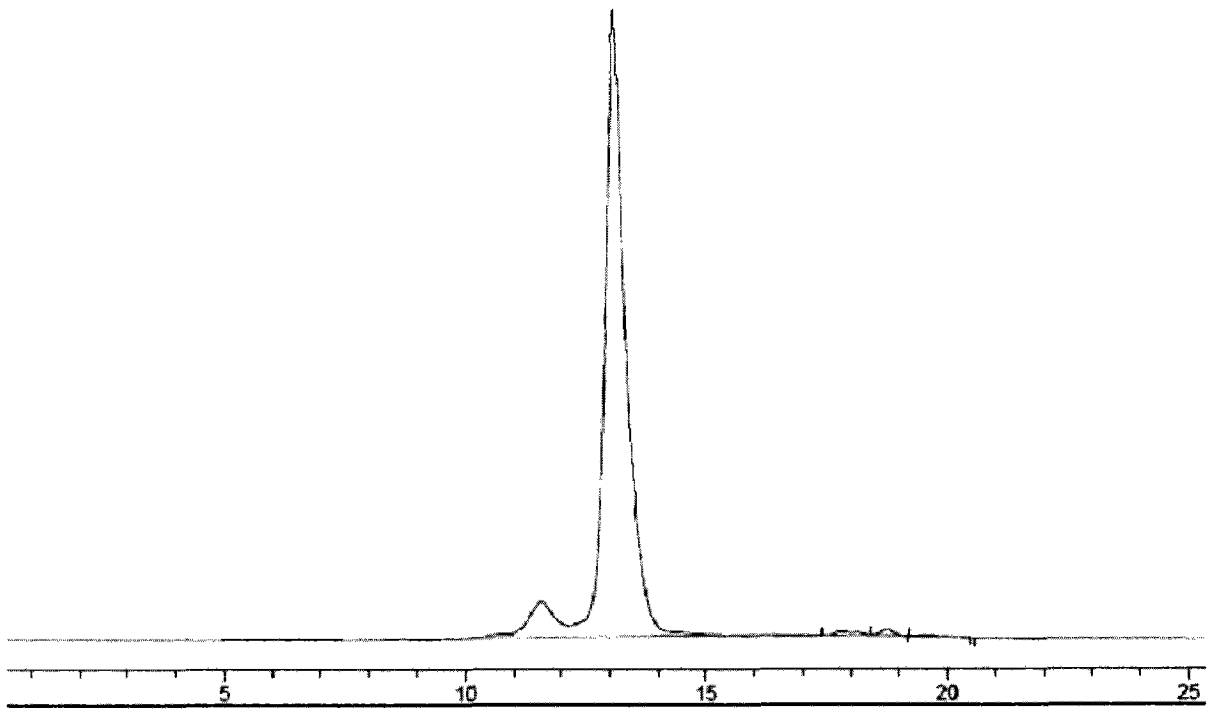


图 2

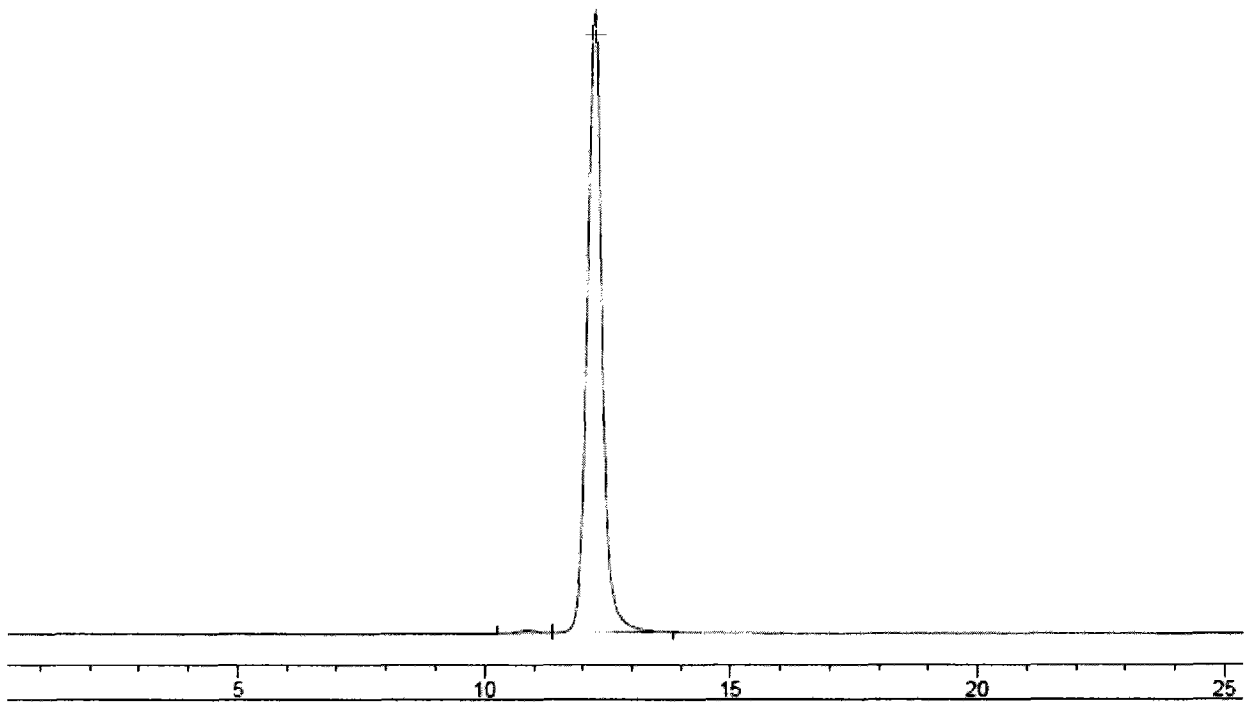


图 3

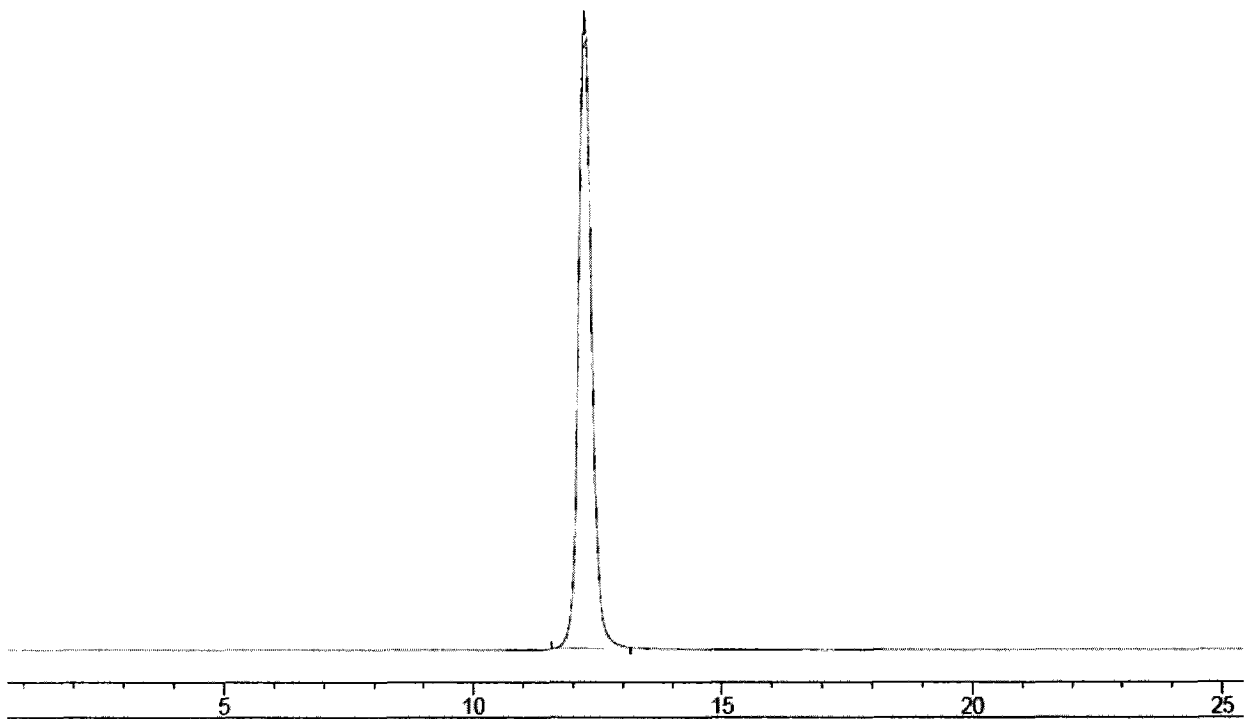


图 4