



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116199768 A

(43) 申请公布日 2023.06.02

(21) 申请号 202310171719.0

A61P 3/02 (2006.01)

(22) 申请日 2023.02.27

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01)

(71) 申请人 武汉禾元生物科技股份有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开  
发区神墩五路268号

(72) 发明人 杨代常 占全 欧吉权 余文卉  
秦志杰

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理  
有限公司 11006

专利代理师 黄韧敏

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

A61K 38/38 (2006.01)

权利要求书2页 说明书13页 附图1页

(54) 发明名称

高纯度植物源重组人血清白蛋白的制备方法  
及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种高纯度的重组人血清白蛋白的制备方法及其在作为药物和蛋白药物辅料中的应用,本发明制备的重组人血清白蛋白,在临床上的安全性和有效性获得保证,可替代血浆来源的人血清白蛋白,在临床上、药物辅料上的应用,可有效地保护生物大分子的生物活性。

1. 一种制备高纯度重组人血白蛋白的方法,包括下述步骤:

1) 制备植物源重组人血白蛋白粗提取物;

2) 将重组人血清白蛋白粗提取物经阳离子交换层析A,在缓冲液中加入异丙醇以去除内毒素,得到初级产物I;

所述缓冲液包括洗杂缓冲液、平衡缓冲液I和平衡缓冲液II;其中洗杂缓冲液含体积比为10-20%的无水异丙醇,平衡缓冲液I含体积比为0-10%的无水异丙醇,平衡缓冲液II含体积比为5-15%的无水异丙醇;

所述阳离子交换层析的阳离子/疏水复合填料为Capto-MMC或Bestarose Diamond MMC;

3) 将初级产物I经阴离子交换层析B,得到中级产物II;

所述阴离子交换层析B的复合填料为大孔径高流速的基质的填料UniMMA-50S;所述层析工艺中,UniMMA-50S的条件参数为:

上样液pH8.0,电导1~5mS/cm;

洗杂液pH 8.0,电导9~9.5mS/cm,

洗脱液pH 8.0,电导40~47mS/cm;

4) 将中级产物II经疏水层析C,得到高纯度的重组人血白蛋白目标物;

所述疏水层析的填料为硬质基质的疏水填料UniHR Phenyl 80L LS,UniHR Phenyl 60L或UniHR Phenyl 30L。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤3)中,UniMMA-50S的洗脱液的电导为42mS/cm。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤4)中所述的层析填料为UniHR Phenyl 30L。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中步骤4)中所述层析的洗脱中电导为80~92mS/cm。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中步骤4)中所述层析的洗脱中电导为84mS/cm。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤3)的层析缓冲液包括:

平衡液:10~20mM PB,pH 7.9~8.1,电导1~3mS/cm;

再平衡液:同平衡液;

洗杂液:10~20mM PB,150~170mM NaCl,pH 7.9~8.1,电导9~9.5mS/cm;

洗脱液:10~20mM PB,420~460mM NaCl,pH 7.9~8.1,电导41~43mS/cm;

步骤3)的层析缓冲液包括:10~20mM PB,500~600mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,2g/L辛酸钠,pH 6.5~6.6。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的方法制备的高纯度重组人血白蛋白。

8. 根据权利要求7所述的高纯度重组人血白蛋白,其特征在于所述重组人血白蛋白具有下述特征:

产品的纯度>99.9999%;

宿主的蛋白残留<1μg/g蛋白;

宿主DNA残留<0.5ng/g蛋白;和

产品内毒素残留<0.0083EU/mg。

9. 一种药物组合物,含有权利要求7所述的高纯度重组人血白蛋白。

10. 权利要求7所述的高纯度重组人血白蛋白在制备治疗低白蛋白血症的药物中的用途。

11. 权利要求7所述的高纯度重组人血白蛋白作为蛋白药物的冻干保护剂和/或赋型剂的用途。

## 高纯度植物源重组人血清白蛋白的制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及制备植物源重组人血清白蛋白的方法。

### 背景技术

[0002] 人血清白蛋白(Human Serum Albumin,HSA),又称人血白蛋白,人血白蛋白是血液或血浆中一种主要蛋白成分,占血液的45-55%,占血浆中70-80%。人血清白蛋白由585个氨基酸构成,为分子量约66kD非糖基化蛋白,由肝脏合成,在人体内半衰期约为18-21天,体内的合成速率约为828mg/kg/day,成年人血液内的HSA浓度为45g/L左右。HSA在人体主要作用机制为增加血容量和维持血浆胶体渗透压。正常人体内的血清白蛋白浓度维持在一定范围内,当低于正常水平临界值(30g/L)时,会导致低白蛋白血症,将引起各种疾病,包括肝硬化腹水、严重脓毒症、恶性腹水、透析内低血压等疾病关联的低白蛋白血症等,在临床上,人血清白蛋白被广泛应用于失血创伤、烧伤引起的休克、脑水肿及损伤引起的颅压升高、肝硬化及肾病引起的水肿或腹水、低蛋白血症的防治、新生儿高胆红素血症、用于心肺分流术、烧伤的辅助治疗、血液透析的辅助治疗和成人呼吸窘迫综合征的治疗。

[0003] 1943年,美国物理化学家Cohn发明了低温乙醇法分离人血清白蛋白,可从1升血浆获得了29.9克白蛋白,该方法沿用至今。在临床上的应用,始于二战期间,用于抢救战争创伤和烧伤的美军伤员。由于从血浆制备,不能大量满足临床的需求,同时还存在传播人源病毒等微生物的风险。利用现代基因工程技术替代血浆提取人血清白蛋白已迫在眉睫。但人血清白蛋白因在临床使用剂量大(单次注射10g-50g/剂量),对重组人血清白蛋白技术的安全性要求极高,即宿主蛋白低于1ppm,内毒素达到或低于0.0083EU/mg。重组人血清白蛋白取代血浆提取不仅要求高产量和高纯度,而且要求工艺简单、规模化容易(容易形成几百吨产能)、低成本(生产成本需低于15元/克)和绿色环保。因此,重组人血清白蛋白技术挑战了重组蛋白纯度的极限、挑战了重组蛋白药物的安全性极限和挑战了重组蛋白生产规模的极限;在经济上挑战了重组蛋白生产成本的极限,是重组蛋白药物研发的世纪难题。

[0004] 国际上自1981年以来试图采用基因工程技术来生产重组人血清白蛋白替代血浆提取,先后在在细菌、酵母、动物和植物等宿主中进行了大量的探索和尝试,技术上一直没有获得突破。原核表达系统由于具有清楚的遗传背景、较快生长速度、继续扩大培养潜力和高表达等优势,最初被认为是最有效的表达平台。由于翻译后加工修饰机制的缺乏,导致大部分重组人血清白蛋白表达后在胞内聚集形成包涵体,或者由于信号肽不正常切割导致降解,产量极为有限。尽管通过共表达折叠酶和分子伴侣技术提高了重组白蛋白在大肠杆菌胞内的可溶性水平,但目前整体仍停留在实验室研究阶段。

[0005] 动物细胞可以产生和人体细胞相同生化结构和修饰的蛋白,被广泛应用于单克隆抗体和疫苗等生物技术药物的生产。考虑临床和市场对人血清白蛋白的巨大需求,动物血液是最理想的表达平台,但分离纯化重组血浆蛋白质对下游生产极具挑战和困难。动物乳腺细胞是除血液系统外另一类重要的动物重组白蛋白表达系统。早期,采用转基因小鼠方式实现了人血清白蛋白的表达,并通过优化启动子等方式将rHSA的表达量提升至11.9g/L

乳汁,然而小鼠产奶的总量限制了该技术的进一步应用。此外,转基因山羊和奶牛中都成功进行了rHSA的表达,纯化困难和过高的成本导致未能应用于临床。

[0006] 在酵母中表达重组人血清白蛋白同样容易出现胞内蛋白聚集,改用分泌型酵母的表达策略可有效避免该现象,酿酒、多形汉逊、乳酸克鲁维和毕赤等多种酵母株系被用来探索是否可用于工业化生产重组人血清白蛋白。为了提高重组白蛋白的表达水平达到克级,针对载体的启动子、信号肽以及基因内含子序列进行研究;并对培养工艺进行优化,采用循环/反复补料分批培养等方式结合,提高蛋白分泌效率。最终英国诺维信公司在酿酒酵母中实现了3g/L水平重组人血清白蛋白表达,成功应用于药用辅料。日本三菱田边制药通过毕赤酵母表达系统生产的重组HSA可达10g/L水平,在1997年公布了其临床结果,于2007年作为注射剂获得PMDA批准上市,已于2009年撤市。

[0007] 植物细胞具有类似动物细胞的翻译后修饰机制,且具备高产、低成本,不受人类病原污染的特点。因此,采用植物作为人血清白蛋白的表达宿主非常有前景。烟草和土豆最早被用来表达重组人血清白蛋白,但产量偏低。利用水稻悬浮细胞和烟草BY-2细胞生产重组人血清白蛋白也被报道过,产量和成本仍是需要克服的因素。谷物种子是蛋白质合成和存储的天然器官,2011年何洋等人报道采用水稻胚乳特异性启动子、内膜定向存储和密码子优化等技术后重组人血清白蛋白在水稻种子达到可溶性总蛋白的10.58%,超过商业化最低产量要求的20倍;所表达的重组人血清白蛋白一、二级结构级高级结构与血浆来源的人血清白蛋白完全等同。

[0008] 由于人血白蛋白具有结合小分子的3个结合位点,在血液里可逆性结合小分子的特性。因此在重组人血白蛋白纯化过程中,重组人血白蛋白可以非特异性地结合内毒素等小分子,将内毒素含量降低到可以中国药典和美国药典的人血白蛋白项下的内毒素标准极为困难(Chen et al.Human serum albumin from recombinant DNA technology: Challenges and strategies.BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-GENERAL SUBJECTS, 2013,1830(12):5515-5525)。

[0009] 除此之外,安全性是药物成药性的关键,重组人血白蛋白在临床上的安全性更是具有挑战性。首先,由于人血白蛋白在临床上使用剂量高达10-50克,较单克隆抗体药物剂量(0.2-0.5g)高50-100倍,因而控制较低的残留宿主蛋白(Hostcellprotein,HCP)含量具有极大地挑战性。其次,重组人血白蛋白在临床上的安全性的另一个挑战性是宿主蛋白(HostCellProtein,HCP)残留杂质含量,生物大分子具有极其复杂的结构,与化药主要不同点是免疫原性,因而残留HCP含量重组人血白蛋白的安全性重要指标。根据ICH对重组蛋白药物HCP含量控制在1-100ppm之间,主要依据蛋白药物的使用剂量,剂量越高,要求HCP含量越低,根据重组人血白蛋白在临床上10-50克的使用剂量则重组人血清白蛋白的宿主蛋白残留杂质要低于10ppm,同时,残留宿主蛋白要求没有免疫原性。然而高纯度重组人血白蛋白可以通过增加纯化步骤来去除HCP,达到ICH的蛋白药物的纯度要求,但增加纯化步骤不仅降低回收率,同时也增加了成本,而药物成本的增加,加上人血白蛋白高剂量,使得重组人血白蛋白不具有可及性。因此,重组人血白蛋白纯度要提高达到安全性阈值的纯度,同时降低生产成本是重组人血清白蛋白的又一个巨大挑战。研发一种低内毒素和HCP含量,且高回收率的重组人血白蛋白的工艺,满足临床级别重组人血白蛋白的要求具有重要意义。

[0010] CN103880947B公开了一种分离纯化高纯度重组人血清白蛋白的层析方法,该方法

主要是采用第二步层析的引入异丙醇洗杂步骤,相比之前的制备方法,大大降低了内毒素含量。US8,609,416,US10,618,951和US11492389 B1专利的内毒素水平只能控制在低于1EU/mg,而中国药典和美国药典的人血白蛋白项下内毒素含量要低于0.0083EU/mg,一旦高于这个水平,静脉注射就会产生发热反应,存在严重的安全问题,而内毒素越低安全性越高;如何将内毒素控制在中国药典和美国药典的人血白蛋白项下的水平或更低水平,极具挑战性。

## 发明内容

[0011] 本发明的目的是提供一种制备高纯度的重组人血清白蛋白的方法。

[0012] 本发明的另一个目的是提供由该方法制备的重组人血清白蛋白。

[0013] 本发明的再一个目的是提供所述的重组人血清白蛋白的用途。

[0014] 根据本发明的一个方面,制备高纯度的重组人血清白蛋白的方法,包括下述步骤:

[0015] 1) 制备植物源重组人血白蛋白粗提取物;

[0016] 2) 将重组人血清白蛋白粗提取物经阳离子交换层析A,在缓冲液中加入异丙醇以去除内毒素,得到初级产物I;

[0017] 所述缓冲液包括洗杂缓冲液、平衡缓冲液I和平衡缓冲液II;其中洗杂缓冲液含体积比为10-20%的无水异丙醇,平衡缓冲液I含体积比为0-10%的无水异丙醇,平衡缓冲液II含体积比为5-15%的无水异丙醇。

[0018] 所述阳离子交换层析的复合填料为Capto-MMC或Bestarose Diamond MMC;

[0019] 3) 将初级产物I经阴离子交换层析B,得到中级产物II;

[0020] 所述阴离子交换层析B的复合填料为大孔径高流速的基质的填料UniMMA-50S;所述层析工艺中,UniMMA-50S的条件参数为:

[0021] 上样pH8.0,电导1-5mS/cm;

[0022] 洗杂pH 8.0,电导9~9.5mS/cm,

[0023] 洗脱pH 8.0,电导40~47mS/cm;

[0024] 4) 将中级产物II经疏水层析C,得到高纯度的重组人血白蛋白目标物;

[0025] 所述疏水层析的填料为硬质基质的疏水填料UniHR Phenyl 80L LS,UniHR Phenyl 60L或UniHR Phenyl 30L,优选的是UniHR Phenyl 30L。

[0026] 本发明所述的方法中,其中步骤3)中,UniMMA-50S的洗脱液的电导为40~47mS/cm,优选为42mS/cm。

[0027] 本发明所述的方法中,其中步骤4)中所述层析的洗脱中电导为80~92mS/cm,优选为84mS/cm。

[0028] 在本发明的一个具体实施方案中,所述高纯度的重组人血白蛋白通过下述步骤制备:

[0029] 1a) 制备植物源重组人血白蛋白粗提取物;

[0030] 2a) 将重组人血清白蛋白粗提取物经阳离子交换层析A,在缓冲液中加入异丙醇以去除内毒素,得到初级产物I;加入纯化水和保护剂调节pH为8.0,电导为5.4mS/cm,除菌过滤;

[0031] 3a) 将初级产物I经阴离子交换层析B,得到中级产物II;将UniMMA-50S填料装填于

直径45cm的层析柱中,装柱高度为48.8cm,以400~600L/h的流速进行层析,层析所用缓冲液依次为:

[0032] 平衡液:10~20mM PB,pH 7.9~8.1,Cond 1~3mS/cm;

[0033] 再平衡液:同平衡液;

[0034] 洗杂液:10~20mM PB,150~170mM NaCl,pH 7.9~8.1,Cond 9~9.5mS/cm;

[0035] 洗脱液:10~20mM PB,420~460mM NaCl,pH 7.9~8.1,Cond 41~43mS/cm;

[0036] 4a)将中级产物II经疏水层析C,得到高纯度的重组人血白蛋白目标物;

[0037] 向步骤3a)的中级产物II的层析洗脱收集液中加入硫酸铵调配母液,调节pH为6.6,电导为84.34mS/cm,除菌过滤后准备上UniHR Phenyl 30L层析。

[0038] 将UniHR Phenyl 30L填料装填于直径30cm的层析柱中,装柱高度为44.2cm,以70~80L/h的流速进行层析,层析平衡缓冲液为10~20mM PB,500~600mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,2g/L辛酸钠,pH 6.5~6.6。

[0039] 根据本发明的另一方面,由本发明的方法制备的高纯度重组人血白蛋白,其具有下述特征:

[0040] 产品的纯度>99.9999%;

[0041] 宿主的蛋白残留<1μg/g蛋白;

[0042] 宿主DNA残留<0.5ng/g蛋白;和

[0043] 产品内毒素残留<0.0083EU/mg。

[0044] 本发明方法制备的高纯度人血清白蛋白用于人体静脉滴注后,具有很好安全性和耐受性。不产生抗宿主蛋白和抗药抗体,具有与血浆来源人血清白蛋白具有相同药效。

[0045] 根据本发明的再一方面,提供含有本发明所述的重组人血白蛋白的药物组合物,可以将本发明的人血白蛋白添加药学上或生理学上可接受的辅料形成适于临床使用的药物组合物。

[0046] 根据本发明的又一方面,本发明的重组人血白蛋白可以作为蛋白药物的冻干保护剂和/或赋型剂应用。

[0047] 本发明的有益效果在于:

[0048] 1、本发明解决了在临床应用需求的高纯度重组人血清白蛋白的高纯度的制备工艺。

[0049] 2、本发明解决了40多年来的重组人血清白蛋白因高剂量静脉注射带来安全性问题;突破了重组人血清白蛋白高纯度(纯度>99.9999%,宿主蛋白含量(HCP)低于1ug/g;残留外源DNA低于0.5ng/g)的关键技术。

[0050] 3、本发明解决了因人血清白蛋白具有结合小分子导致内毒素不易去除的困境,而重组人血清白蛋白用于临床上应用的内毒素含量要达到美国FDA或中国药典的低于0.0083EU/mg的标准,静脉注射在体内产生发热的安全性问题。

[0051] 本发明制备的重组人血清白蛋白因上述特点,使得其在临床上的安全性和有效性获得保证,此外,本发明方法制备的重组人血清白蛋白可替代血浆来源的人血清白蛋白在临床上、药物辅料上的应用,可有效地保护生物大分子的生物活性。

## 附图说明

[0052] 图1为不同保护剂对OsrPA冻干后活性影响。

## 具体实施方式

[0053] 通过以下详细说明结合附图可以进一步理解本发明的特点和优点。所提供的实施例仅是对本发明方法的举例说明,而不以任何方式限制本发明揭示的其余内容。

[0054] 以下实施例中使用的试剂和仪器,除特别说明以外,均为普通市售。

[0055] 水稻重组人血白蛋白(OsrHSA)的制备:

[0056] 参考中国专利No.200510019084.4的方法制备含有OsrHSA的转基因水稻;

[0057] 参考中国专利No.201010606635.8的方法从水稻种子中提取OsrHSA,得到澄清的OsrHSA提取液。

[0058] 参考中国专利CN103880947B的方法进行阳离子交换层析A。

[0059] **【实施例1】**高纯度、低内毒素和HCP含量的植物源重组人血清白蛋白制备方法

[0060] CN103880947B公开了一种分离纯化高纯度重组人血清白蛋白的层析方法(下称老工艺),主要步骤为高效表达水稻稻谷经脱壳,抛光后,采用磨粉机械粉碎到180-200目的稻米粉,按照稻米粉:提取缓冲液1:5比例进行提取1-3小时,采用20%乙酸调pH至4.5后酸沉3-12小时,经板框压滤机压滤后达到固液分离,含有重组人血清白蛋白的提取液经复合阳离子层析、复合阴离子层析和PhenylHP疏水层析,然后超滤、浓缩至200mg/ml以上获得OsrHSA原液。该方法主要是采用第二步层析的引入异丙醇洗杂步骤。

[0061] 老工艺在分离纯化所用的填料基架为高度交联刚性极强的琼脂糖,该填料存在耐受压力低、工艺流速慢、去除杂质和内毒素能力弱等缺点,需要具有克服现有填料缺点的更好的填料。随着填料制备工艺的发展,聚甲基丙烯酸酯硬胶基架,具有耐压更高,流速更快、去除杂质的能力更强,产品质量更高等优点。利用硬胶基架的新填料研发新工艺,使得装柱高可升高至50cm以上,工艺规模更容易放大,工艺时长缩短,单批次产能进一步扩大,成本可获得最大程度的降低。

[0062] 本研究在老工艺基础上,对重组人血白蛋白的纯化的填料和纯化工艺进行优化,从而达到中国药典和美国药典的人血白蛋白项下的内毒素标准和ICH对重组蛋白药物的HCP的要求,确保了重组人血白蛋白在临床上的安全性。

[0063] 1、层析填料选择

[0064] 由于老工艺采用琼脂糖为基架的层析介质,但这种介质不耐压,线性流速低,装柱高度受到限制,这些不仅严重影响了分离纯化效果,而且总体载量受到限制,从而增加了层析柱的投入。新工艺在第二步和第三步层析介质采用具有纳球的硬胶基质,可以增加装柱高度,提高重组人血白蛋白的分离度,达到更好的分离效果,提高重组人血白蛋白的纯度,新工艺与老工艺的层析介质的比较如表1。从表1可以看出,将琼脂糖凝胶基质改变为硬胶基质后,装柱高度从30cm提高到50cm,装柱体积增加了66.7%。

[0065] 表1新工艺与老工艺的层析填料

	老工艺	新工艺	装柱高度
[0066] 层析 A	Bestarose Diamond MMC	Bestarose Diamond MMC	30CM

[0067]	层析 B	Diamond MMA	UniMMA-50S	50CM
	层析 C	Phenyl Bestarose HP	UniHR Phenyl 30L	50CM

[0068] 2、新工艺的工艺参数优化

[0069] 1、层析B(UniMMA-50S)条件优化。

[0070] 为了优化第二步层析(新填料)的上样和洗脱条件,基于HCP和人血白蛋白的理化性质与UniMMA-50S性质,取同一批次的Bestarose Diamond MMC层析(第一步层析)收集液,研究洗脱条件(10~20mM PB,150~300mM NaCl,pH7.0~8.0和电导(15~35mS/cm))对HCP含量、纯度、二聚体含量、内毒素等关键工艺参数的影响。结果如表2所示,洗脱液的pH值对HCP的含量影响较小,但洗脱液的电导对HCP含量和回收率具有较大影响,重组人血白蛋白回收率和HCP含量随着洗脱液的电导提高而增加,其纯度也相应下降;根据实验结果。UniMMA-50S在上样pH为8.0,电导为5mS/cm;洗杂pH为8.0,电导为9~9.5mS/cm,洗杂体积为12CV,洗脱pH为8.0,电导为26.9mS/cm,可获得最佳的HCP去除效果。

[0071] 表2 UniMMA-50S层析HCP去除条件优化实验设计

[0072]	实验编号	模式	pH	Cond (mS/cm)	HCP (μg/g)	Purity (%)	Recovery (mg)
	1	+-	7.99	15.58	174.9	100.0	94
	2	A0	8.01	25.40	135.9	98.9	277
	3	0a	7.50	15.40	192.0	99.4	101
	4	00	7.50	24.90	127.2	98.5	310
	5	0A	7.49	35.15	137.0	94.9	384
	6	++	8.00	35.12	128.2	95.2	381
	7	-+	7.01	35.10	149.7	94.0	363

[0073] 注:+表示高水平点,-表示低水平点,A表示轴点(Axial Point),0表示中心点(Center point),如实验编号1对应的考察模式即为pH高水平点和电导低水平点的组合,记为+-。

[0074] 3、新工艺(UniMMA-50S)与老工艺(Bestarose Diamond MMA)对二聚体含量影响

[0075] 在老工艺条件下,内毒素含量随二聚体含量增加而增加,因此,比较了新工艺和老工艺的二聚体含量,结果表明:在内毒素大大低于老工艺的情况下,内毒素含量并没有随二聚体增加而增加,二聚体含量主要受洗脱液的电导相关,即电导越高,二聚体含量随之升高。洗脱电导在40~47mS/cm范围时,收集液中的二聚体含量可控制在2~7%范围内(表3)。新工艺的填料为UniMMA-50S,洗脱液的电导为40~47mS/cm,优选电导为42mS/cm。

[0076] 表3不同洗脱条件下的二聚体含量

[0077]	填料名称	批次	洗脱电导 (mS/cm)	二聚体 (%)	
	老工艺	Bestarose Diamond MMA	20211222-1	42.6	0.96
	新工艺	UniMMA-50S	20220514-1	27.1	0.27
			20220517-1	32.1	0.29
			20220627-2	41.2	2.99
			20220627-1	46.5	5.88

[0078] 3、新工艺采用UniHR Phenyl疏水层析填料对内毒素含量的影响

[0079] 获得较低的内毒素含量是重组人血清白蛋白用于临床应用的关键指标之一。在原工艺采用Phenyl Bestarose HP层析主要用于去除上一步Bestarose Diamond MMA层析中的微量内毒素,虽然有较好的效果,但要获得更安全的内毒素含量,必须进一步降低内毒素含量。在新工艺中纳微填料,选用了粒径分别为80 $\mu\text{m}$ 、60 $\mu\text{m}$ 、30 $\mu\text{m}$ 的疏水层析填料UniHR Phenyl进行对比实验。具体方法是:取第二步层析(UniMMA-50S)20220627-2批原液(内毒素0.0417~0.0521EU/mg),经调配过滤后分别上UniHR Phenyl 80L LS、UniHR Phenyl 30L、UniHR Phenyl60S,分别研究了不同上样电导(层析缓冲液为10~20mM PB,500~600mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,2g/L辛酸钠,pH 6.5~6.6)的内毒素含量,结果显示第三步层析收集液内毒素含量除UniHR Phenyl 80L LS外,内毒素含量在0.0004~0.0033EU/mg之间,均可小于老工艺的0.0083EU/mg,尤其是采用UniHR Phenyl 30L和相同电导(84mS/cm)条件下,内毒素含量最低(0.0003~0.0013EU/mg),比老工艺降低了6.3-27.6倍(表4)。新工艺第三步层析优选的填料为UniHR Phenyl 30L,洗脱条件电导为80~92mS/cm,优选条件是84mS/cm。

[0080] 表4不同粒径的疏水层析填料对微量内毒素的去除效果

[0081]	填料名称	上样电导 (mS/cm)	内毒素 (EU/mg)
	UniHR Phenyl 80 L LS	80	>0.0017
[0082]		84	0.0016~0.0033
		88	0.0004~0.0014
		92	0.0016~0.0033
	UniHR Phenyl 30L	80	0.0004~0.0014
		84	0.0003~0.0013
		88	0.0013~0.0028
		92	0.0016~0.0033
	老工艺	84	0.0083

[0083] 4、新工艺与老工艺的HCP含量和种类比较分析

[0084] 综上所述,新工艺显著地降低了内毒素含量和增加纯度,由于HCP含量和种类对于临床级重组人血清白蛋白的安全性至关重要,因此我们比较了新工艺和老工艺的HCP含量和种类。结果如表5所示,新工艺和老工艺的HCP含量分别为0.64 $\mu\text{g/g}$ 和0.60 $\mu\text{g/g}$ ,二者没有显著差别,但HCP种类存在显著差异,新工艺的HCP种类为11个,而老工艺为27个,安全性大大提高。

[0085] 表5 原工艺与新工艺的HCP含量比较

[0086]	工艺	批次	HCP ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>A</sup>	HCP种类数 <sup>B</sup>
	老工艺	C001201910003	0.60	27
	新工艺	20220627-2	0.64	11

[0087] A指采用水稻宿主蛋白开发的双抗体夹心ELISA法,对获得的原液进行宿主蛋白残留检测,宿主蛋白测定浓度与重组人血清白蛋白浓度的比值即为原液中的HCP残留。

[0088] B指采用高分辨率质谱方法(LC-MS/MS),对获得的原液进行宿主蛋白总量和种类进行测定。

[0089] 3、新工艺和老工艺的层析柱载量比较

[0090] 第一步层析:

[0091] 1) 上样液调配:新工艺的提取和第一步层析条件与原工艺一致,700Kg米粉经提取澄清后上第一步层析柱,其收集液加入纯化水和保护剂调节pH为8.0,电导为5.4mS/cm,除菌过滤后准备上UniMMA-50S层析。

[0092] 2) 层析步骤:将第二步UniMMA-50S填料装填于直径45cm的层析柱中,装柱高度为48.8cm,以400~600L/h的流速进行层析。层析所用缓冲液依次为:

[0093] 平衡液:10~20mM PB,pH 7.95~8.05,Cond 1~3mS/cm;

[0094] 再平衡液:同平衡液;

[0095] 洗杂液:10~20mM PB,150~170mM NaCl,pH 7.95~8.05,Cond 9~9.5mS/cm;

[0096] 洗脱液:10~20mM PB,420~460mM NaCl,pH 7.95~8.05,Cond 41~43mS/cm。

[0097] 第三步层析:

[0098] 1) 上样液调配:向第二步UniMMA-50S层析洗脱收集液中加入硫酸铵调配母液,调节pH为6.57,电导为84.34mS/cm,除菌过滤后准备上UniHR Phenyl 30L层析。

[0099] 2) 层析步骤:将第三步UniHR Phenyl 30L填料装填于直径30cm的层析柱中,装柱高度为44.2cm,以70~80L/h的流速进行层析。层析所用平衡缓冲液为10~20mM PB,500~600mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,2g/L辛酸钠,pH 6.5~6.6。

[0100] 新工艺在第二步和第三步更换纳微的硬胶填料后,老工艺琼脂糖软质填料的装柱高度为30cm,而新工艺的硬质基质填料装柱高度达到50cm,随着单位柱体积增加而装填填料增加,新工艺的第二步和第三步层析填料装填量和载量比老工艺分别增加了1.7倍(表6)。

[0101] 表6新工艺和老工艺的单位柱体积与载量比较

工艺	层析步骤	层析柱高 (cm)	柱直径 (cm)	柱体积 (L)	载量 (g/L)	总载量 (g)
[0102] 老工艺	Bestarose Diamond MMA	30	100	230.5	23.6	5439.8
	Phenyl Bestarose HP	30	100	230.5	45.9	10579.9
新工艺	UniMMA-50S	50	100	392.5	23.6	9263.0
	UniHR Phenyl 30L	50	100	392.5	45.9	18015.8

[0103] 【实施例2】重组人血清白蛋白的纯度检测。

[0104] 采用水稻宿主蛋白研发的HCP的ELISA检测方法,具体方法是:采用基因工程水稻提取工艺的粗提取物,经去除OsrHSA之后的全杂质成分作为抗原免疫兔子,获得抗全杂质成分血清,经protein A纯化和pHSA吸附去除残留HSA抗体后所得纯化抗体,用于HCP Elisa检测。以50mM pH9.6碳酸盐缓冲液1:1000稀释纯化的全杂质兔抗作为捕获抗体,100μL/孔加入空白96孔酶标板中,2-8℃过夜包被,用300μL/孔含0.05%Tween20的PBS(PBST)洗板5次后,加入300μL/孔的1%BSAPBS溶液室温封闭2小时,同样洗板后加入0.5%BSA-PBS(稀释液)稀释的0.5-100ng/ml全杂质成份作为标曲,同时样本用稀释液稀释至标曲范围内,均100μL/孔加入封闭后酶标板中,室温孵育2小时后,PBST洗板5次,再加入用稀释液1:5000倍

稀释的生物素标记的纯化全杂质兔抗,室温孵育1小时后相同方式洗板,加入稀释液1:20000倍稀释的辣根酶标记链亲和素,室温避光孵育30分钟,PBST洗板10次后拍干,加入TMB室温避光显色20分钟,再加入100 $\mu$ L/孔2M硫酸溶液终止显色,于酶标仪(Versamax, Molecular Device, USA)中采用405nm进行读数,以四参数方式进行标曲浓度和OD405nm读值拟合标曲,根据样本吸光度值,从标曲上回算HCP浓度值,并根据最终稀释倍数计算0srHSA供试品中的HCP含量。

[0105] 采用ELISA方法对连续3批次的重组人血清白蛋白的HCP含量检测,检测数据结果:植物源人血清白蛋白的HCP含量在0.5-0.6 $\mu$ g/g蛋白之间,纯度均大于99.99994-99.99995%(表7)。

[0106] 表7 重组人血清白蛋白的残留宿主蛋白含量与纯度

[0107]	批号	C001201910003	C001202009001	C001202010002
	宿主蛋白残留( $\mu$ g/g)	0.6	0.6	0.5
	纯度%	99.99994	99.99994	99.99995

[0108] #纯度计算公式: % = (总蛋白含量-宿主蛋白含量)/总蛋白含量\*100。

[0109] 【实施例3】新工艺植物源重组人血清白蛋白的热源测试为了进一步证明内毒素含量在进入动物体内不产生热源,按照中国药典采用热原检查法进行检测。具体方法是:取适用的家兔3只,测定其正常体温后15分钟以内,按照家兔体重每1kg注射0.6g蛋白质的剂量,取适量供试品温热至约38 $^{\circ}$ C后自耳静脉缓缓注入,然后每隔30分钟测量1次体温,共测6次,以6次体温中最高的一次减去正常体温,即为该兔体温的升高温度。经给予重组人血清白蛋白注射后,单只家兔的体温变幅在0-0.1.1度之间,且3只家兔体温升高总和低于1.3 $^{\circ}$ C。结果表明:内毒素低于<0.0083Eu/mg的0srHSA对动物体内不会产生发热反应(表8)。

[0110] 表8 重组人血清白蛋白的热源检测

[0111]	批号	C001201512001	C001201512002	C001201512003
	3只家兔最大升温 $^{\circ}$ C	0.4,0.2,0.5	0.0,0.0,0.1	0.0,0.0,0.0
	3只家兔最大降温 $^{\circ}$ C	0.0,0.0,0.0	0.0,-0.3,0.0	-0.5,-0.3,-0.2
	3只家兔体温升高总和	1.1	0.1	0.0

[0112] 【实施例4】植物源重组人血清白蛋白的残留DNA含量检测。

[0113] 为了检测残留宿主核酸含量,采用Chen等(Chenet al,Quantitation of the residual DNA from rice-derived recombinant human serum albumin.ANALYTICAL BIOCHEMISTRY,2014,450:4-10)的水稻残留DNA检测方法对重组人血清白蛋白的残留核酸含量进行检测。具体方法:首先,对供试品采用DEPC(焦碳酸二乙酯)处理水进行适当稀释,采用WAKO DNA提取试剂盒(Wako Chemicals MSA,Richmond,VA,MSA)对稀释后的供试品进行残留DNA提取,获得供试品模板DNA。将水稻基因组DNA进行稀释分别获得浓度为1000ng/ml、500ng/ml、100ng/ml、10ng/ml、1ng/ml、0.1ng/ml的标准模板DNA溶液。采用5SrRNA基因作为内参(Chen等(2014)),按照下列引物信息、反应体系和扩增条件采用SYBR Green法在荧光定量PCR仪内进行40个循环扩增检测。以Ct(y轴)对log标准模板DNA浓度(x轴)作标准曲线进行线性拟合,根据供试品残留DNA的Ct值对应标曲回算得到相应的DNA浓度,再根据DNA复溶体积和和初始稀释倍数计算供试品残留DNA含量。

[0114] 对连续三批的重组人血清白蛋白残留核酸含量检测结果如表9所示,残留核酸含

量在0.01-0.002ng/g之间。

[0115] 表9 重组人血清白蛋白的宿主DNA残留含量

[0116]		C001201910003	C001202009001	C001202010002
	宿主DNA残留 (ng/g)	0.01	0.01	0.002

[0117] 【实施例5】高纯度植物源重组人血清白蛋白在健康人群的安全性。

[0118] 重组人血清白蛋白 (OsrHSA) 按照上述实施例1方法制备。

[0119] 在健康人群中开展的重组人血清白蛋白的安全性和耐受性的临床I期研究。总计招募41名受试者,分别以20mg/kg、40mg/kg、80mg/kg、140mg/kg和200mg/kg体重等5个剂量,分别给予重组人血清白蛋白和安慰剂。研究表明:在静脉滴注重组人血清白蛋白后,在随访30天,没有报告与重组人血清白蛋白的相关的不良事件(表10)、产生抗药抗体(ADA)(表11)和HCP抗体(表12)

[0120] 表10 植物源重组人血清白蛋白的在健康人的不良事件表

[0121]	受试者号	种族	剂量组	剂量	不良事件类型	严重程度	药物相关性
	005	非亚裔	第一组	安慰剂	头痛	轻微	不相关
	045	非亚裔	第二组	40 mg/kg	普通感冒	轻微	不相关
[0122]	053	非亚裔	第二组	40 mg/kg	胃酸过多	轻微	不相关
	112	亚裔	第三组	80 mg/kg	嗓子疼	轻微	不相关
	149	非亚裔	第四组	140 mg/kg	痛经	轻微	不相关
	173	亚裔	第四组	140 mg/kg	普通感冒	轻微	不相关

[0123] 表11重组人血清白蛋白的在健康人抗药抗体检测结果

[0124]	访视时间	安慰剂	OsrHSA				
		(N = 10)	第一组	第二组	第三组	第四组	第五组
			20 mg/kg (N = 6)	40 mg/kg (N = 6)	80 mg/kg (N = 6)	140 mg/kg (N = 7)	200 mg/kg (N = 6)
	给药前	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	第8天	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	第15天	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	第20天	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	第30天	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

[0125] 表12重组人血清白蛋白在健康人的抗HCP抗体的检测结果

访视时间	结果	安慰剂	OsrHSA				
		(N = 10)	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	第 5 组
			20 mg/kg (N = 6)	40 mg/kg (N = 6)	80 mg/kg (N = 6)	140 mg/kg (N = 7)	200 mg/kg (N = 6)
[0126] 给药前	阳性	1 (10.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (14.29%)	1 (16.67%)
	阴性	9 (90.00%)	6 (100.0%)	6 (100.0%)	6 (100.0%)	6 (85.71%)	5 (83.33%)
第 8 天	阳性	1 (10.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (14.29%)	1 (16.67%)
	阴性	9 (90.00%)	6 (100.0%)	6 (100.0%)	6 (100.0%)	6 (85.71%)	5 (83.33%)
第 15 天	阳性	1 (10.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (14.29%)	1 (16.67%)
	阴性	8 (80.00%)	5 (83.33%)	6 (100.0%)	6 (100.0%)	6 (85.71%)	5 (83.33%)
[0127] 第 22 天	阳性	1 (10.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (14.29%)	1 (16.67%)
	阴性	8 (80.00%)	4 (66.67%)	6 (100.0%)	6 (100.0%)	6 (85.71%)	4 (66.67%)
第 30 天	阳性	1 (10.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (14.29%)	1 (16.67%)
	阴性	8 (80.00%)	5 (83.33%)	6 (100.0%)	6 (100.0%)	6 (85.71%)	4 (66.67%)

[0128] 综上所述:植物源重组人血清白蛋白安全并具有好的耐受性;没有受试者产生抗药抗体(ADA);没有受试者在给药后产生抗HCP抗体。

[0129] 【实施例6】高纯度植物源重组人血清白蛋白在肝硬化腹水患者的抗药和抗HCP抗体

[0130] 高纯度重组人血清白蛋白(OsrHSA)按照上述实施例1方法制备。

[0131] 在肝硬化低蛋白血症的患者的开展II期临床研究,总计220例18-80岁,血清白蛋白浓度小于或者等于30g/L的失代偿性肝硬化合并腹水患者的给药前后的OsrHSA的抗药抗体(Anti-Drug Antibody,ADA)和抗OsrHSA宿主蛋白(Host Cell Proteins,HCP)抗体进行检测。分别给予静脉滴注高纯度重组人血清白蛋白10和20克/天,连续14天,随访30天。分别在完成给药7天15天和30天检测抗药抗体。结果显示:在176例接受重组人血清白蛋白的肝硬化患者中,没有观察到具有临床意义的抗药抗体(表13)。

[0132] 对所有患者接受重组人血清白蛋白治疗后的抗HCP抗体检测中,没有检测到具有临床意义的抗HCP抗体(表14)。

[0133] 综合US-HY1001和US-China-HY1001两项研究结果,认为OsrHSA在临床使用中未发现明显的免疫源性,也未见与OsrHSAHCP相关的免疫源性,OsrHSA的安全性良好。

[0134] 表13接受重组人血清白蛋白药物后各剂量组的抗药抗体的发生率

	OsrHSA 10g (N=85) n(%)	pHSA 10g (N=22) n(%)	OsrHSA 20g (N=86) n(%)	pHSA 20g (N=23) n(%)
[0135] 基线阳性--治疗后仍为阳性	1 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
基线阴性--治疗后为阳性	2 (2.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
治疗后抗体滴度升高 1-5 倍	3 (3.5)	1 (4.5)	6 (7.0)	0 (0.0)
治疗后抗体滴度升高 6-10 倍	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
治疗后抗体滴度升高大于 10 倍	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

[0136] 注:N=分析集的治疗组参与者人数,N=治疗组相关类别的参与者人数。

[0137] pHSA为血浆来源的人血清白蛋白。

[0138] 表14接受重组人血清白蛋白药物后各剂量组的抗药抗体的发生率

	OsrHSA 10g (N=85) n(%)	pHSA 10g (N=22) n(%)	OsrHSA 20g (N=86) n(%)	pHSA 20g (N=23) n(%)
[0139] 基线阳性--治疗后仍为阳性	12 (14.1)	4 (18.2)	11 (12.8)	5 (21.7)
基线阴性--治疗后为阳性	0 (0.0)	1 (4.5)	0 (0.0)	0 (0.0)
治疗后抗体滴度升高 1-5 倍	10 (11.8)	4 (18.2)	7 (8.1)	6 (26.1)
治疗后抗体滴度升高 6-10 倍	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

[0140] 注:N=分析集的治疗组参与者人数,N=治疗组相关类别的参与者人数。

[0141] 【实施例7】高纯度植物源重组人血清白蛋白在肝硬化腹水患者的有效性。

[0142] 对人血清白蛋白水平低于30克/L的肝硬化腹水低蛋白血症的患者给予连续14天静脉滴注10克或20克/每天的重组人血清白蛋白(OsrHSA),以达到35克/L的天数,以血浆来源的人血清白蛋白(pHSA)做对照,采用全分析集(FAS)方式按剂量水平进行统计学分析,以10g OsrHSA不低于10g pHSA(97.5% CI下限=-0.114),20g OsrHSA不低于20g pHSA(97.5% CI下限=-0.187)。二者均达到临床终点设置的介质-0.2的水平,即重组人血清白蛋白非劣于血浆来源人血清白蛋白;在复合方案集(PPAS)方式中按剂量水平进行统计学分析,重组人血清白蛋白在10g(97.5% CI下限=-0.076)和20g(97.5% CI下限=-0.106)剂量水平上均不劣于血浆来源人血清白蛋白。所有剂量水平合并分析,在FAS(97.5% CI下限=-0.119)和PPAS(97.5% CI下限=0.065)人群中,重组人血清白蛋白的有效性并不劣于血浆来源人血清白蛋白(表15)。以达到35克/L的天数的中位值计算,重组人血清白蛋白10g剂量达到 $\geq 35$ g/L的时间为9天,而血浆来源人血清白蛋白(对照药)12天,达到时间早3天;在重组人血清白蛋白的20g剂量剂量组达到 $\geq 35$ g/L的时间与对照药相当,均为6天。

[0143] 表15重组人血清白蛋白的主要疗效终点分析

队列	分析集	OsrHSA n/N (%)	pHSA n/N (%)	率差	97.5% CI 下限
[0144] 20g	FAS	72/86(0.837)	21/23(0.913)	-0.076	-0.187
	PPS	72/77(0.935)	21/22(0.955)	-0.020	-0.106
10g	FAS	58/85(0.682)	13/22(0.591)	0.091	-0.114
	PPS	57/79(0.722)	13/22(0.591)	0.131	-0.076
合并分析	FAS	130/171(0.760)	34/45(0.756)	0.005	-0.119
	PPS	129/156(0.827)	34/44(0.773)	0.054	-0.065

[0145] 注:FAS=全分析集,PPS=符合方案集

[0146] 【实施例8】高纯度植物源重组人血清白蛋白在药物辅料的应用

[0147] 植物源重组瑞替普酶(OsrPA)的制备参考CN202110735731.0。

[0148] 高纯度重组人血清白蛋白(OsrHSA)按照上述实施例1方法制备。

[0149] HSA在药物制剂生产过程中也经常被用作冻干保护剂/赋型剂,高纯度的OsrHSA在药物生产过程中可以被用来作为辅料,对酶类/抗体类药物具有保护作用,同时也具有一定的赋型效果。植物源重组瑞替普酶(OsrPA)摸索不同保护剂对其冻干前后形态和活性变化。

[0150] 表16含OsrHSA配方OsrPA成品6个月加速稳定性考察结果

检测项目	接受标准	批号	加速稳定性(25±2℃, RH60%±5%) /月				
			0	1	2	3	6
[0151] SEC-HPLC 纯度	单体≥96.0%	C036202109003	99.5	97.6	98.6	98.8	98.4
[0152] OsrPA 蛋白含量		C036202109004	99.0	98.1	98.4	98.8	98.5
		C036202109005	98.4	97.8	98.5	98.9	98.5
	应为 10.0-14.0mg/瓶	C036202109003	13.0	13.2	12.0	11.8	10.2
		C036202109004	13.0	12.5	13.3	11.6	10.7
		C036202109005	11.0	11.8	10.8	11.9	11.1
	生物学活性 (500万U/瓶) 的90.0%~ 120.0%	C036202109003	112.8	109.6	103.7	101.0	98.0
C036202109004		105.7	105.1	102.2	100.5	107.7	
C036202109005		95.2	101.6	102.2	99.4	105.7	

[0153] 利用筛选的含OsrHSA配方对连续3批OsrPA成品制剂进行加速稳定性考察,结果显示:加速6个月后,OsrPA样品纯度,水分含量(2.1%),生物学活性等指标仍合格(表16)。

[0154] 根据OsrHSA做保护剂与其他赋形剂对OsrPA的生物活性与稳定性的结果,OsrHSA对OsrPA冻干赋型上优于其他保护剂,对OsrPA冻干后活性保护效果也优于其他保护剂。

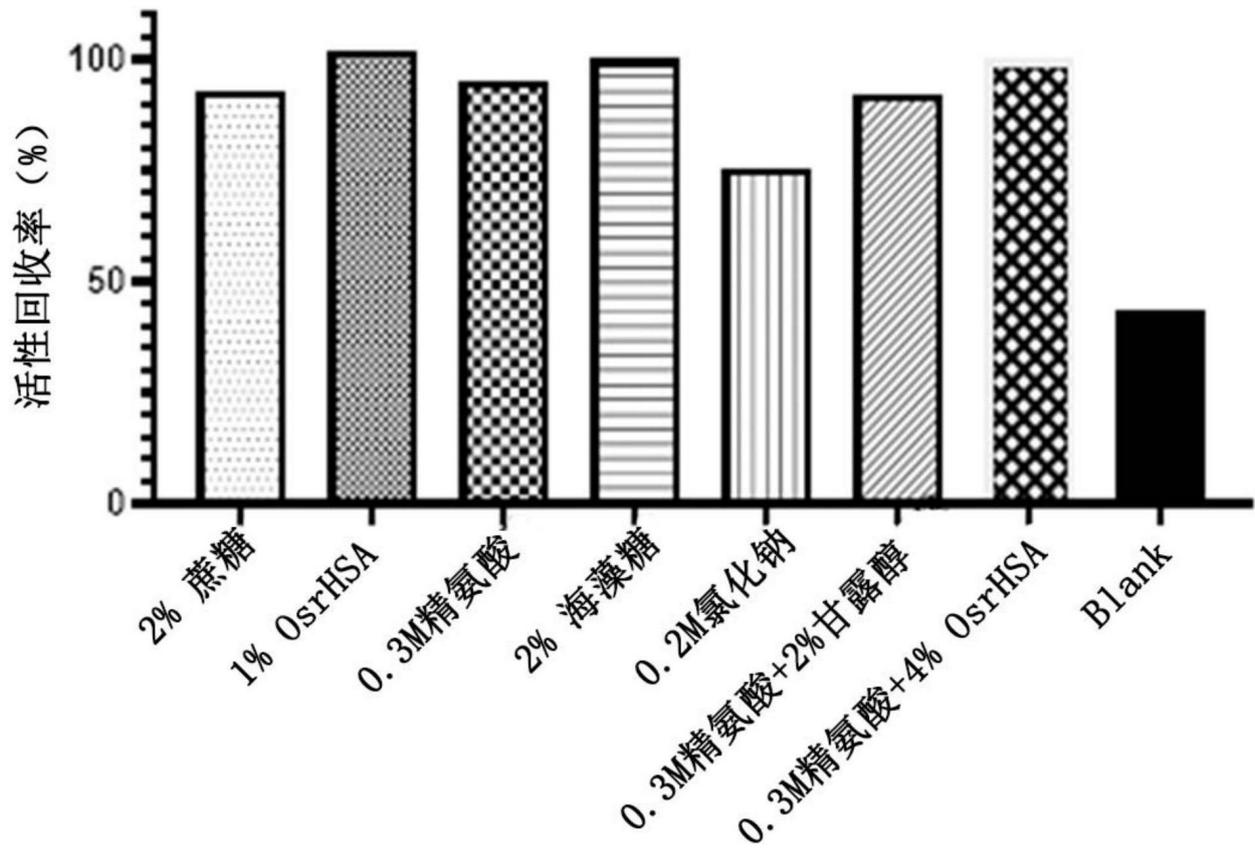


图1