(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 32 492 T2** 2004.12.02

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 699 687 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 32 492.6**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 113 620.9**
(96) Europäischer Anmeldetag: **30.08.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.03.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **28.01.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.12.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C07K 1/22**
C07K 1/36

(30) Unionspriorität:
20770494 31.08.1994 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, IT, LI, NL, SE

(73) Patentinhaber:
Mitsubishi Pharma Corp., Osaka, JP

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:
Noda, Munehiro, Hirakata-shi, Osaka, JP; Sumi, Akinori, Hirakata-shi, Osaka, JP; Ohmura, Takao, Hirakata-shi, Osaka, JP; Yokoyama, Kazumasa, Hirakata-shi, Osaka, JP

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Reinigung von rekombinantem menschlichem Serumalbumin**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur einfachen Reinigung von menschlichem Serumalbumin, dass in hohen Erträgen durch Genmanipulation erzeugt wird, wobei die erhaltene Zusammenstellung rekombinantes menschliches Serumalbumin enthält, das einen extrem geringen Färbungsgrad aufweist, was ein für rekombinantes menschliches Serumalbumin charakteristisches, ernsthaftes Problem darstellt.

[0002] Menschliches Serumalbumin (nachstehend einfach als HSA (human serum albumin) bezeichnet) ist das häufigste im Plasma enthaltene Protein. Es trägt zu Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks im Blut bei und bindet Nährstoffe und Abbauprodukte, um solche Substanzen auf diese Weise zu transportieren. HSA mit diesen Funktionen ist als ein Mittel zur Behandlung von Hypoalbuminämie eingesetzt worden, die durch einen Verlust an Albumin oder eine verminderte Albuminsynthese verursacht wurde, oder bei einem hämorrhagischen Schock.

[0003] HSA ist hauptsächlich aus einer Fraktion entnommenen Blutes hergestellt worden. Dieses Verfahren zur Herstellung von HSA aus Blut weist jedoch Schwierigkeiten wie sporadische Versorgung mit Blut, ökonomischen Nachteil und Verunreinigung mit unerwünschten Substanzen wie etwa dem Hepatitis-Virus auf. Es bestand daher ein dringender Bedarf, ein Material zu entwickeln, das als Ersatz für das natürlich auftretende HSA verwendet werden kann.

[0004] Unter diesen Umständen sind mit dem Fortschreiten der rekombinanten DNA-Technologie Techniken zur Massenproduktion und Reinigung von BSA mit Mitteln der Genmanipulation (als ein Ersatz für das aus dem Blut stammende HSA) entwickelt worden.

[0005] Zur Reinigung des HSA, das aus Genmanipulation erhalten wurde (nachstehend als rekombinantes HSA bezeichnet und mit rHSA abgekürzt), ist die Anwendung der herkömmlichen Verfahren zur Reinigung des aus Plasma stammenden HSA als solche nicht geeignet. Dies beruht darauf, dass die vom rHSA zu entfernenden Verunreinigungen sich vollständig von denen unterscheiden, die in dem aus Plasma stammenden HSA enthalten sind. rHSA ist zum Beispiel besonders mit färbenden Stoffen verunreinigt, die charakteristisch für rekombinante HSA sind, etwa Proteine, die aus den Wirtszellen stammen, Polysaccharide etc. Insbesondere ist es notwendig, Komponenten, die aus den Wirtszellen stammen, in ausreichender Weise zu entfernen, das sie körperfremdes Material für lebende Organismen, einschließlich des Menschen, darstellen und daher ein Antigenizitätsproblem auslösen können.

[0006] Demzufolge sind zahlreiche Studien durchgeführt worden, um rHSA, das mittels einer Kultur aus Komponenten, die aus den Wirtszellen stammen und aus Kultur-Komponenten hergestellt wurde, in ausreichendem Maße zu isolieren und zu reinigen. Eines der herkömmlichen Verfahren wird beispielhaft durch das Verfahren dargestellt, das darin besteht, ein Hefe-Kulturmedium, das rHSA enthält, der Pressung – Ultrafiltrationsmembran-Behandlung – Erhitzung – Ultrafiltrationsmembran-Behandlung zu unterwerfen und es dann mit Verfahren wie etwa der Chromatographie mit einem Kationen-Austauscher und einem Anionen-Austauscher und hydrophober Chromatographie zu behandeln [JP-A-5-317079 (der hierin verwendete Ausdruck „JP-A-" steht für eine „ungeprüfte Japanische Patentanmeldung"), entsprechend EP-A-570916, Biotechnology of Blood Proteins, 1993, 227, 293–298].

[0007] Darüber hinaus ist das Verfahren, das aus der vorstehend genannten Vorgehensweise besteht und der die Behandlung mit Chelat-Harz oder die Behandlung mit Borsäure/Borat folgt, beschrieben worden (EP-A-570916, JP-A-6-245789, entsprechend EP-A-612761).

[0008] In dem vorstehend genannten herkömmlichen Verfahren ist es essentiell erforderlich, die aus den vorstehend genannten zahlreichen Schritten bestehende Reinigung durchzuführen, um auf diese Weise Antigene, die aus den Wirtszellen stammen, zu entfernen und einen hohen Reinigungsgrad zu erreichen. Auf der anderen Seite beinhaltet dieses Verfahren solche Nachteile wie ein Absinken des Ertrags an rHSA und eine ausgedehnte Behandlungsdauer aufgrund der großen Anzahl der Schritte. Obgleich Versuche unternommen worden sind, den Ertrag aus jedem der Schritte zu erhöhen, um den Ertrag an rHSA zu verbessern, scheint es, dass keine weitere Verbesserung des Ertrags erzielt werden kann, und daher der Ertrag an rHSA bereits die obere Grenze erreicht hat. Darüber hinaus leidet das vorstehend beschriebene Verfahren unter dem weiteren Problem, dass die Druckfiltration in einem offenen System durchgeführt wird und auf diese Weise die Gefahr von Verunreinigung besteht. Besonders die Berücksichtigung der Hygiene, die bei der Herstellung von rHSA als Medikament essentiell erforderlich ist, ist hierbei außerordentlich schwierig. Zusätzlich kann die Färbung von rHSA nur auf ein A350/A280-Verhältnis von minimal etwa 0,015 reduziert werden (im Fall einer Lösung, die

250 mg/ml rHSA enthält).

[0009] Auf der anderen Seite ist ein Verfahren entwickelt worden, um ein Zielprotein direkt aus einem unbehandelten Kulturmedium zu gewinnen, ohne jegliche Vorbehandlung wie etwa der Entfernung der Zellen oder Konzentration des Mediums nach der Beendigung der Kultivierung durchzuführen (z. B. das Fließbett-Verfahren mit der Verwendung der erweiterten Bett-Adsorptionstechnik, entwickelt von Pharmacia, Internationale Offenlegung in Japan Nr. 6-500050, entsprechend EP-A-538467).

[0010] Es wurde bisher nichts über die Anwendung der vorstehend genannten erweiterten Bett-Adsorptionstechnik zur Reinigung von rHSA berichtet, besonders der Gewinnung und Reinigung von rHSA aus einem Hefe-Kulturmedium. Es bleibt daher unbekannt, ob ein solches Verfahren tatsächlich nützlich für die Rationalisierung der Reinigung von rHSA und der Verbesserung des Ertrags desselben ist oder nicht. Es wird jedoch erwartet, dass die Anwendung dieses oder eines diesem ähnlichen Verfahrens zur Reinigung von rHSA zur Vereinfachung der herkömmlichen, aus zahlreichen Schritten bestehenden Behandlung zur Reinigung beitragen würde.

[0011] Es erhebt sich jedoch das Problem, dass das im Kulturmedium enthaltene rHSA unter den sauren Bedingungen, die zur Adsorption durch eine Fließbett-Säule (Adsorbens: Streamline SP) bei der Verwendung des vorstehend genannten Verfahrens eingesetzt werden, sehr schnell durch im Kulturmedium enthaltene Proteasen abgebaut wird, und der Ertrag an rHSA auf diese Weise stark gemindert wird. Es ist daher schwierig, das vorstehend genannte Verfahren der erweiterten Fließbett-Adsorptionstechnik als solches zu Reinigung von rHSA einzusetzen.

[0012] Es bestand daher ein dringender Bedarf, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem rHSA in hohem Maße in einem stabilen Zustand mit einem hohen Ertrag gereinigt werden kann, ohne die Vorteile der erweiterten Fließbett-Adsorptionstechnik (d. h. die Vereinfachung und Rationalisierung des Reinigungsverfahrens etc.) zu beeinträchtigen.

[0013] Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines einfachen Verfahrens zur Reinigung von rekombinantem HSA mit einem hohen Reinheitsgrad und einer ausgezeichneten Qualität innerhalb eines kurzen Zeitraums. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Bereitstellung von rHSA, aus dem färbende Stoffe, die charakteristisch für Genmanipulationen sind und von Wirtszellen, Medium etc. stammen, ausreichend entfernt wurden.

[0014] Zur Lösung der vorstehend genannten Probleme haben die Erfinder umfangreiche Studien durchgeführt. Als ein Ergebnis fanden sie heraus, dass Proteasen einfach und wirksam inaktiviert werden können, indem ein Kulturmedium eines Systems zur Produktion von HSA, in dem die Wirtzzellen verbleiben, direkt erhitzt wird, wobei die Erhitzung auf 50 bis 100°C über 1 Minute bis zu 10 Stunden erfolgt. Sie fanden außerdem heraus, dass es die Kombination der vorstehend genannten Hitzebehandlung mit der Adsorbensteilchen-Behandlung ermöglicht, die Anzahl der Schritte des herkömmlichen Verfahrens zur Reinigung von rHSA von fünf (d. h. Pressung – Ultrafiltrationsmembran-Behandlung – Erhitzung – Ultrafiltrationsmembran-Behandlung – Kationen-Austausch) auf zwei (Erhitzung – Adsorptionspartikel-Behandlung) zu reduzieren und auf diese Weise bei Erhöhung des Ertrags die Reinigungszeit zu verkürzen.

[0015] Darüber hinaus fanden die Erfinder heraus, dass ihr Verfahren es ermöglicht, rHSA zu erhalten, das tatsächlich frei von jeder aus den Wirtstellen stammenden Verunreinigung ist und auf diese Weise, verglichen mit dem aus dem herkömmlichen Verfahren gewonnenen, einen tatsächlich verminderten Färbungsgrad aufweist.

[0016] Dem zufolge betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von rHSA, das das Erhitzen eines Kulturmediums umfasst, das rHSA und die rHSA produzierenden Wirtszellen enthält, wobei die Erhitzung auf 50 bis 100°C über 1 Minute bis zu 10 Stunden erfolgt, das in-Kontakt-Bringen der erhitzten Lösung mit Adsorbensteilchen, die in einem Fließbett suspendiert sind, und Gewinnung der adsorbierten Fraktion. Genauer betrifft es ein Verfahren zur Reinigung von rHSA wie vorstehend beschrieben, das das Erhitzen eines Kulturmediums umschließt, das rHSA und einen rHSA produzierenden Wirtsorganismus enthält, das aufwärts gerichtete Einfüllen der erhitzten Lösung in ein Fließbett, in dem Adsorbensteilchen suspendiert sind, um zu bewirken, dass die erhitzte Lösung mit den Adsorbensteilchen in Kontakt tritt, die darauf folgende Umkehr der Fließrichtung und das abwärts gerichtete Einfüllen einer Pufferlösung, um das von den Adsorbensteilchen adsorbierte rHSA zurück zu gewinnen.

[0017] Die vorliegende Erfindung betrifft darüber hinaus ein Verfahren zur Reinigung von rHSA wie vorstehend beschrieben, worin die erhitzte Lösung bei einem pH-Wert von etwa 3 bis 5 in einer Atmosphäre mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,1 bis 50 mS mit den Adsorbensteilchen in Kontakt gebracht wird, und ein Verfahren zur Reinigung von rHSA, worin die Adsorbensteilchen derart sind, dass sie eine starke Kationen-Austauschgruppe aufweisen.

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft darüber hinaus ein Verfahren zur Reinigung von rHSA, worin eine adsorbierte Fraktion, die rHSA enthält und aus dem Fließbett durch das vorstehend genannte Reinigungsverfahren zurück gewonnen wurde, mindestens einer Reinigungsbehandlung unterworfen wird, die aus einer Gruppe von hydrophober Chromatographie, Anionen-Austausch-Behandlung, Chelat-Harz-Behandlung, Borsäure/Borat-Behandlung und Ultrafiltrationsmembran-Behandlung ausgewählt wird, bevorzugt nach Erhitzung in Anwesenheit eines reduzierenden Agens.

[0019] Die erhaltene Zusammenstellung enthält rekombinantes menschliches Serumalbumin, das ein A350/A280-Verhältnis von unter 0,015 aufweist, wenn es in einer 25%igen Lösung des Albumins (d. h. Konzentration von rHSA: 250 mg/ml) formuliert wird.

KURZE BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0020] **Fig.** 1 ist eine grafische Darstellung, die die stabilisierende Wirkung der Hitzebehandlung auf ein rHSA-Kulturmedium darstellt.

[0021] **Fig.** 2 ist eine grafische Darstellung, die die Beziehung zwischen der elektrischen Leitfähigkeit unter der Atmosphäre darstellt, in der die erhitzte Lösung mit den Adsorbensteilchen in Kontakt gebracht wird und die Fähigkeit von rHSA, an die Adsorbensteilchen zu binden.

[0022] **Fig.** 3 ist ein Fließdiagramm, das den optimalen Fluss der Reinigung von rHSA aus einem Kulturmedium (das Hefezellen enthält) unter Verwendung von Streamline SP darstellt.

[0023] **Fig.** 4 zeigt ein Gelfiltrations-HPLC-Profil eines Streamline SP-Eluats einschließlich der Behandlung mit einem Erhitzungsschritt (Erhitzung – Adsorbensteilchen) [(a)] und das eines Streamline SP-Eluats ohne die Behandlung mit dem Erhitzungsschritt (keine Erhitzung – Adsorbensteilchen) [(b)] (Absorption: gemessen bei 280 nm).

[0024] **Fig.** 5 zeigt einen Vergleich zwischen dem herkömmlichen Verfahren und dem Verfahren der vorliegenden Erfindung durch Beobachtung der Änderung des Färbungsgrades (A350/A280) von rHSA bei jedem Schritt.

[0025] **Fig.** 6 stellt Absorptionsspektren von rHSA dar, die durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung erhalten wurden, verglichen mit denen von rHSA, das durch das herkömmliche Verfahren erhalten wurden.

[0026] **Fig.** 7 stellt Chromatogramme dar, die die Ergebnisse der GPC-HPLC-Analyse von rHSA zeigen, die durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung erhalten wurden (Absorption: gemessen bei 280 nm).

[0027] In diesen Abbildungen hat jedes Symbol die nachstehende Bedeutung:
A: Kontrolle
B: 68°C, 30 Minuten, pH-Wert 6,0.
C: 68°C, 30 Minuten, pH-Wert 6,8.
D: 68°C, 30 Minuten, pH-Wert 7,5.
E: 68°C, 30 Minuten, pH-Wert 8,2.
F: 60°C, 2 Stunden, pH-Wert 6,0.
G: 60°C, 2 Stunden, pH-Wert 6,8.
H: 60°C, 2 Stunden, pH-Wert 7,5.
I: 60°C, 2 Stunden, pH-Wert 8,2.
J: 60°C, 2 Stunden, pH-Wert 6,8, 10 mM Cystein.
K: 60°C, 2 Stunden, pH-Wert 7,5, 10 mM Cystein.
L: Zimmertemperatur (25°C), 2 Stunden, pH-Wert 6,0.
1: rHSA gereinigt durch das herkömmliche Verfahren (Pressung – Membran – Erhitzung – Membran – Kationen-Austauscher – hydrophobe Chromatographie – Anion-Austauscher-Behandlung) gefolgt von der Behandlung mit Chelat-Harz.

2: rHSA erhalten nach der Anionen-Austauscher (DEAE)-Behandlung in Übereinstimmung mit dem Verfahren aus Beispiel 1.
3: rHSA erhalten nach der Behandlung mit Chelat-Harz in Übereinstimmung mit dem Verfahren aus Beispiel 1.

(1) durch Genmanipulation erhaltenes HSA

[0028] In der vorliegenden Erfindung ist der rHSA produzierende, durch Genmanipulation erhaltene Wirtsorganismus nicht besonders eingeschränkt, soweit er durch Genmanipulation hergestellt wurde. Es können besonders entweder jene, die in der öffentlich bekannten Literatur beschrieben worden sind, oder jene, die in Zukunft entwickelt werden, als hierfür geeignet ausgewählt werden. Genauer besteht ein solcher Wirtsorganismus beispielhaft aus HSA produzierenden Mikroorganismen, die durch Genmanipulation erhalten wurden (Escherichia coli, Hefen, Bacillus subtilis etc.) und Tierzellen. Es ist besonders vorteilhaft, Hefen als Wirtsorganismus zu verwenden, besonders jene, die zur Gattung Saccaromyces (zum Beispiel S. cervisiae) oder Pichia (zum Beispiel P. pastoris) gehören. Auch autotrophe Stämme und Antibiotikum-sensitive Stämme lassen sich hierfür verwenden. Es ist auchvorteilhaft, den Stamm Saccharomyces cervisiae AH22 (a, His 4, Leu 2, Can 1) oder den Stamm Pichia pastoris GTS115 (His 4). zu verwenden.

[0029] Die Vorgänge der Herstellung des HSA produzierenden Wirtsorganismus, Produktion von rHSA durch seine Kultivierung und Isolierung und Rückgewinnung von rHSA aus dem Kulturmedium werden alle in Übereinstimmung mit bekannten Verfahren durchgeführt, die leicht abgewandelt sein können. Zum Beispiel kann die Herstellung eines HSA produzierenden Wirtsorganismus unter Verwendung eines Verfahrens durchgeführt werden, in dem ein natürlich vorkommendes HSA-Gen eingesetzt wird (JP-A-58-56684, entsprechend EP-A-73646, JP-A-58-90515, entsprechend EP-A-79739 und JP-A-58-150517, entsprechend EP-A-91527), eines Verfahrens, in dem ein verändertes menschliches Serumalbumin-Gen verwendet wird (JP-A-62-29985 und JP-A-1-98486, entsprechend EP-A-206733), eines Verfahrens, in dem eine synthetische Signalsequenz verwendet wird (JP-A-1-240191, entsprechend EP-A-329127), eines Verfahrens, in dem eine Serumalbumin-Signalsequenz verwendet wird (JP-A-2-167095, entsprechend EP-A-319641), eines Verfahrens, in dem ein rekombinantes Plasmid in ein Chromosom eingebracht wird, (JP-A-3-72889, entsprechend EP-A-399455), eines Verfahrens, in dem Wirtszellen fusioniert werden (JP-A-3-53877, entsprechend EP-A-409156), eines Verfahrens, in dem eine Mutation in einem Methanol enthaltenden Kulturmedium hervor gerufen wird, eines Verfahrens, in dem ein mutierter AOX_2-Promotor verwendet wird (EP-A-506040), eines Verfahrens, in dem HSA in B. subtilis exprimiert wird (JP-A-62-215393, entsprechend EP-A-229712), eines Verfahrens, in dem HSA in Hefe exprimiert wird (JP-A-60-41487, entsprechend EP-A-123544, JP-A-63-39576, entsprechend EP-A-248657 und JP-A-63-74493, entsprechend EP-A-251744) und eines Verfahrens, in dem HSA in Pichia exprimiert wird (JP-A-2- 104290, entsprechend EP-A-344459).

[0030] Aus diesen Verfahren wird das Verfahren, in dem eine Mutation in einem Methanol enthaltenden Kulturmedium ausgelöst wird, in der nachstehenden Weise durchgeführt. Ein Transformant eines geeigneten Wirtsorganismus, bevorzugt einer Pichia Hefe, zur Erläuterung eines Stammes GTS115 (NRRL-Hinterlegungs-Nr. Y-15851), wird in der herkömmlichen Weise hergestellt, indem ein Plasmid in die AOX_1-Gen-Region des Wirtsorganismus eingebracht wird, der eine Transkriptionseinheit enthält, durch die HSA unter der Kontrolle des AOX_1-Promotors exprimiert wird (vgl. JP-A2-104290). Dieser Transformant wächst in einem Methanol enthaltenden Kulturmedium kaum. Daher wird dieser Transformant in einem Methanol enthaltenden Kulturmedium kultiviert, um Mutationen zu erzeugen, und ein Stamm, der in der Lage ist, in dem Kulturmedium zu wachsen, wird isoliert. Die Methanolkonzentration in dem Kulturmedium kann variieren, zum Beispiel von 0,0001 bis 5%. Das Kulturmedium kann entweder synthetisch oder natürlich sein. Die Kultivierung kann zum Beispiel bei einer Temperatur von 15 bis 40°C annähernd über 1 bis 1.000 Stunden durchgeführt werden.

[0031] Die Kultivierung des HSA produzierenden Wirtsorganismus kann mit Hilfe jedes der Verfahren durchgeführt werden, die in den vorstehend genannten Patenten offengelegt werden, mit Hilfe eines Verfahrens, mit dem produzierende Zellen und das Produkt in hohen Konzentrationen durch eine Fed-batch Kultur (eine Semi-batch Kultur) erhalten werden; dieses Verfahren wird durchgeführt, indem eine hoch konzentrierte Lösung von Glucose, Methanol oder dergleichen schrittweise in geeigneten kleinen Mengen zugegeben wird, um Substrat-Inhibition der produzierenden Zellen durch hohe Konzentration zu vermeiden (JP-A-3-83595); oder mit Hilfe eines Verfahrens, in dem die HSA-Produktivität durch die Zugabe von Fettsäuren zum Kulturmedium verbessert wird (JP-A-4-293495, entsprechend EP-A-504823 und US-Patent 5,334,512).

[0032] Ein gewöhnlich in dem Fachgebiet verwendetes Kulturmedium, ergänzt durch eine Fettsäure mit 10 bis 26 Kohlenstoffatomen oder ein Salz hieraus, kann als ein Medium zur Kultivierung eines transformierten Wirtsorganismus verwendet werden, und die Kultivierung des Transformanten kann unter bekannten Bedin-

gungen durchgeführt werden. Das Kulturmedium kann entweder synthetisch oder natürlich sein, ist aber bevorzugt ein flüssiges Medium. Zum Beispiel kann ein geeignetes synthetisches Kulturmedium zusammengesetzt sein aus: Kohlenstoffquellen wie etwa verschiedenen Sacchariden; Stickstoffquellen wie etwa Harnstoff, Ammoniumsalzen, Nitraten; Spurenstoffen wie verschiedenen Vitaminen, Nucleotiden; und anorganischen Salzen wie etwa von Mg, Ca, Fe, Na, K, Mn, Co und Cu. Ein erläuterndes Beispiel für solch ein Kulturmedium ist YNB-Flüssigmedium, das aus 0,7% Hefe-Stickstoff- Base (Difco) und 2% Glucose besteht. Ein erläuterndes Beispiel für ein nützliches natürliches Kulturmedium ist YPD Flüssigmedium, das aus 1% Hefeextrakt (Difco), 2% Bactopepton (Difco) und 2% Glucose besteht. Der pH-Wert des Kulturmediums kann neutal, schwach basisch oder schwach sauer sein. Im Fall eines methylotrophischen Wirtsorganismus kann das Kulturmedium weiterhin mit Methanol in einer Menge von etwa 0,01 bis 5% ergänzt werden.

[0033] Die Kultivierungstemperatur liegt bevorzugt zwischen 15 bis 43°C (20 to 30°C für Hefe, 20 bis 37°C für ein Bakterium). Der Kultivierungszeitraum reicht von 1 bis zu 1.000 Stunden, bevorzugt 20 bis 360 Stunden, mit Hilfe von statischer oder geschwenkter Kultivierung, oder Batch-, Semi-batch oder fortlaufender Kultivierung unter Rühren und Belüftung. Es ist wünschenswert, eine Stammkultur vor der Batch-Kultivierung mittels der statischen oder geschüttelten Kultivierung oder der Batch-, Semi-batch oder fortlaufenden Kultivierung unter Rühren und Belüftung anzulegen. Die Stammkultur kann mit Hilfe des vorstehend genannten YNB-Flüssigmediums oder des YPD-Flüssigmediums angelegt werden, bevorzugt bei 30°C (für Hefe) oder 37°C (für ein Bakterium) und über 10 bis 100 Stunden.

(2) Reinigung von rHSA

(i) Hitzebehandlung

[0034] In dem Verfahren zur Reinigung von rHSA nach der vorliegenden Erfindung wird das Kulturmedium des HSA produzierenden Wirtsorganismus, der in dem vorstehend genannten Kultivierungsschritt erhalten wurde, direkt hitzebehandelt, während es die Wirtszellen enthält und ohne dass ein Trennverfahren wie Zentrifugation oder Behandlung mittels Ultrafiltrationsmembran durchgeführt wird. Das heißt, dass die Hitzebehandlung als erster Schritt im Reinigungsverfahren der vorliegenden Erfindung durchgeführt wird.

[0035] Die Erhitzung wird bei 50 bis 100°C über 1 Minute bis 10 Stunden durchgeführt, bevorzugt bei 60 bis 80°C über 20 Minuten bis 3 Stunden und noch weiter bevorzugt bei 68°C über 30 Minuten. Es ist vorteilhaft, diese Behandlung in Anwesenheit eines Stabilisators durchzuführen. Beispiele für den Stabilisator umschließen Acetyltryptophan, organische Carboxylsäuren mit 6 bis 18 Kohlenstoffatomen und Salze hiervon. Diese Stabilisatoren können gemeinsam verwendet werden. Acetyltryptophan wird in einer solchen Menge zugegeben, dass sich eine Endkonzentration von zum Beispiel etwa 1 bis 100 mM ergibt. Beispiele für die organischen Carboxylsäuren mit 6 bis 18 Kohlenstoffatomen umschließen Capronsäure, Caprylsäure, Capronsäure, Laurinsäure, Palmitinsäure und Oleinsäure. Es ist vorteilhaft, 10 mM Caprylsäure zu verwenden. Beispiele für die Salze hiervon umschließen Alkalimetallsalze (Natriumsalz, Kaliumsalz etc.) und Erdalkalisalze (Calciumsalz etc.). Diese organischen Carboxylsäuren mit 6 bis 18 Kohlenstoffatomen oder Salze hiervon können in einer Menge von zum Beispiel etwa 1 bis 100 mM zugegeben werden.

[0036] Um die durch die Erhitzung verursachte Färbung zu unterdrücken, ist es wirksam, etwa 1 bis 100 mM, bevorzugt 5 bis 30 mM, einer Thiol-Komponente zuzugeben (z. B. Mercaptoethanol, Cystein, reduziertes Glutathion etc.) und bevorzugt darüber hinaus 10 bis 1.000 mM Aminoguanidin im Erhitzungsschritt zuzugeben. (JP-A-3-103188).

[0037] Im herkömmlichen Verfahren werden entweder ein Überstand (Filtrat) oder Zellen erhitzt, die durch Zentrifugation oder Filtrierung eines Kulturmediums des Wirtsorganismus gewonnen wurden. Dies wird durchgeführt, weil befürchtet wird, dass eine Leckage an Verunreinigungen, Lipiden, Nukleinsäuren Proteasen etc. zu unerwünschten Auswirkungen auf die Reinigung der Zielsubstanz führen könnte, wenn ein Zellen enthaltendes Kulturmedium direkt erhitzt wird. Es war daher unbekannt, ob direkte Erhitzung eines Zellen enthaltenden Kulturmediums hilfreich für die Reinigung der Zielsubstanz ist oder nicht.

[0038] Auf Grund der vorliegenden Erfindung wurde jedoch gezeigt, dass weder die strukturelle Funktion des rHSA, noch der Ertrag desselben beeinträchtigt wird, wenn das das rHSA und die Wirtszellen enthaltende Kulturmedium direkt erhitzt wird, die im Kulturmedium enthaltenen machtvollen Proteasen dagegen wirksam inaktiviert werden können. Auf diese Weise kann das Verfahren zur Inaktivierung der Proteasen vereinfacht werden. Darüber hinaus kann HSA, das durch Genmanipulation gewonnen wird, wirksam durch das Verfahren gereinigt werden, wie nachfolgend beschrieben wird.

(ii) Verdünnung der erhitzten Lösung und Einstellung ihrer Eigenschaften

[0039] Die nach vorstehender Beschreibung (i) erhaltene Lösung wird dann mit Adsorbensteilchen behandelt, die in einem Fließbett suspendiert sind. Es ist vorteilhaft, die erhitzte Lösung vor dieser Behandlung zu verdünnen, um diese erhitzte Lösung mit den Adsorbensteilchen in einer Atmosphäre mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,1 bis 50 mS, bevorzugt von 0,5 bis 35 mS und weiter bevorzugt von 5 bis 15 mS in Kontakt zu bringen. Wie nachstehend im Testbeispiel 3 beschrieben wird, erhöht sich die Menge an rHSA, die an Adsorbensteilchen bindet, wenn die Verdünnung der erhitzten Lösung erhöht wird und die elektrische Leitfähigkeit der Atmosphäre, in der die erhitzte Lösung mit den Adsorbensteilchen in Kontakt gebracht wird, erniedrigt wird und erreicht einen maximalen Wert bei einer elektrischen Leitfähigkeit von etwa 8 bis 12 mS. Die als Verdünnung zu verwendende Lösung ist nicht besonders eingeschränkt, solange die strukturelle Funktion von rHSA in der erhitzten Lösung hierdurch nicht beeinträchtigt wird. Es kann im Hinblick auf die Adsorptionsbedingungen eine geeignete ausgewählt werden. Zum Beispiel kann die Verdünnungslösung eine Acetatpufferlösung mit einer Konzentration von 50 mM oder darunter und destilliertes Wasser sein. Aus dem Blickwinkel der Durchführbarkeit ist die Verwendung von destilliertem Wasser vorzuziehen.

[0040] Als nächstes wird der pH-Wert der Lösung auf einen sauren Wert eingestellt, der zur Adsorption durch die Adsorbensteilchen geeignet ist. Er wird gewöhnlich auf pH-Wert 3 bis 5 eingestellt, bevorzugt auf pH-Wert 4 bis 4,8 und weiter bevorzugt auf etwa pH-Wert 4,5.

[0041] Obgleich jede saure Lösung ohne Einschränkung zur Einstellung des pH-Wertes verwendet werden kann, ist es vorzuziehen, Essigsäure zu verwenden.

(iii) Behandlung der Adsorbensteilchen

[0042] Nach der Verdünnung und der Einstellung des pH-Wertes wird die erhaltene erhitzte Lösung mit den Adsorbensteilchen in Kontakt gebracht.

[0043] Beispiele für die Adsorbensteilchen umschließen einen Trägerstoff mit einer Kationen-Austauschgruppe (d. h. ein kationisches Adsorbens), wie etwa die Adsorbensteilchen vom Typ der Sulfogruppe oder vom Typ der Carboxylgruppe. Adsorbensteilchen vom Typ der Sulfogruppe sind zum Beispiel Sulfo-Agarose (Streamline SP, S-Sepharose, beide hergestellt von Pharmacia), Sulfo-Zellulose (S-Cellulofine, hergestellt von Chisso Corporation), Sulfopropyl-Agarose (SP-Sepharose, hergestellt von Pharmacia), SP-Cellthru-Big Beads (hergestellt von Sterogene), Sulfopropyl-Dextran (SP-Sephadex, hergestellt von Pharmacia) und Sulfopropyl-Polyvinyl (SP-Toyopearl, hergestellt von Tosoh Corporation). Adsorbensteilchen vom Typ der Carboxylgruppe sind zum Beispiel Carboxymethyl-Agarose (CM-Cellthru-Big Beads, hergestellt von Sterogene), Carboxymethyl-Dextran (CM-Sephadex, hergestellt von Pharmacia) und Carboxymethyl-Zellulose (CM-Cellulofine, hergestellt von Chisso Corporation). Die Verwendung der stark kationischen Adsorbensteilchen vom Typ der Sulfogruppe ist vorzuziehen, besonders bevorzugt ist Streamline SP (hergestellt von Pharmacia).

[0044] Die Partikelgröße der Adsorbensteilchen reicht gewöhnlich von zum Beispiel 30 bis 1.100 µm, bevorzugt von 100 bis 300 µm.

[0045] Der Kontakt kann bei einem pH-Wert von etwa 3 bis 5 durchgeführt werden, bevorzugt von etwa 4 bis 4,8 und weiter bevorzugt bei etwa 4,5, und bei einer Salzkonzentration von etwa 0,01 bis 0,2 M, bevorzugt von etwa 0,05 bis 0,1 M.

[0046] Es ist vorteilhaft, die Adsorbensteilchen zuvor unter solchen Kontaktbedingungen wie vorstehend beschrieben zu äquilibrieren. Genauer ist es vorteilhaft, die Adsorbensteilchen mit einer 50 mM Acetatpufferlösung (pH-Wert 4,5), die 50 mM Natriumchlorid enthält, zu äquilibrieren.

[0047] Die Adsorbensteilchen werden gewöhnlich äquilibriert, und die Probe wird in das Fließbett injiziert, das die Adsorbensteilchen enthält, mit den Adsorbensteilchen in Kontakt gebracht und dann in Übereinstimmung mit der nachstehenden Verfahrensweise aus dem Fließbett eluiert.

[0048] Besonders die vorstehend genannten Adsorbensteilchen werden zuerst in eine geeignete Säule gefüllt, in der man sie absinken lässt. Dann wird eine Pufferlösung zur Äquilibrierung oberhalb des unteren Anschlusses der Säule eingefüllt, um auf dieses Weise die Adsorbensteilchen zu suspendieren. In diesem Schritt dient die Fließrate der in der Säule aufwärts fließenden Pufferlösung als Gegengewicht gegen die Sedimentation der Adsorbensteilchen aufgrund der Schwerkraft, und auf diese Weise werden die Adsorbensteilchen in

einem äquilibrierten Status gleichmäßig suspendiert (d. h. in einem so genannten Fließbett). In die Säule, in der das vorstehend genannte Fließbett gebildet wurde, wird das unbehandelte, die Zellen enthaltende Kulturmedium, das entsprechend der vorstehend genannten Schritte (i) Erhitzung und (ii) Verdünnung behandelt worden ist, oberhalb des unteren Anschlusses der Säule eingefüllt. Die Ziel-rHSA bindet darauf an die Adsorbensteilchen, während feine Partikel und Verunreinigungen, die aus den Wirtszellen oder dem Kulturmedium stammen, sich unverändert zwischen den Adsorbensteilchen im Fließbett bewegen und auf diese Weise am oberen Anschluss der Säule angesammelt werden. Ebenso werden Verunreinigungen, die sich locker an die Adsorbensteilchen binden, durch die Waschpufferlösung fort gespült, die nach und nach und aufwärts gerichtet zugegeben wird. Es ist vorzuziehen, diese Verfahrensweisen in Übereinstimmung mit der erweiterten Adsorptionsbett-Technik [Journal of Chromatography, 597 (1992), 129–145] durchzuführen.

[0049] Als Waschpufferlösung wird eine Pufferlösung zur Äquilibrierung verwendet.

[0050] Das Zielprotein, d. h. rHSA, wird durch die Umkehr der Fließrichtung und abwärts gerichtetes Einfüllen einer Eluierungspufferlösung am oberen Anschluss der Säule zurück gewonnen. Die Eluierung von rHSA kann bei einem pH-Wert durchgeführt werden, der zwischen etwa 8 bis 10 liegt, bevorzugt zwischen etwa 8,5 bis 9,5 und weiter bevorzugt bei etwa 9, und die Salzkonzentration liegt etwa bei 0,2 bis 0,5 M, bevorzugt bei etwa 0,3 bis 0,4 M. Ein besonderes Beispiel für die Eluierungspufferlösung ist eine 0,1 M Phosphatpufferlösung (pH-Wert 9), die 0,3 M Natriumchlorid enthält.

[0051] Die vorstehend genannten Vorgehensweisen einschließlich der Äquilibrierung der Adsorbensteilchen, der Injektion der Probe in das Fließbett, das die Adsorbensteilchen enthält, des Kontaktes mit den Adsorbensteilchen, der Eluierung aus dem Fließbett etc. können leicht und wirksam mit einer hohen Reproduzierbarkeit durchgeführt werden, wenn ein Streamline-System (hergestellt von Pharmacia) zusammen mit einer Streamline-Säule (Adsorbens: Streamline SP, hergestellt von Pharmacia) verwendet wird.

[0052] Auf diese Weise kann rHSA in hoher Reinheit gewonnen werden. Die Reinheit des durch die vorstehend genannte Behandlung mit den Adsorbensteilchen gewonnenen rHSA ist nahezu vergleichbar mit derjenigen des rHSA, das durch das herkömmliche Verfahren, bestehend aus mehreren Schritten, einschließlich Pressung – Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran – Erhitzung – Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran – Behandlung mit Kationen-Austauscher, gewonnen wird. Darüber hinaus kann rHSA in einer stabilen Form (d. h. ohne degradiert zu werden), mit einem hohen Ertrag auf Grund der Erhitzung des Kulturmediums vor der Behandlung mit den Adsorbensteilchen gewonnen werden. Demzufolge ermöglicht es die vorliegende Erfindung, die Anzahl der Schritte des vorstehend genannten herkömmlichen Verfahrens zur Reinigung von rHSA von fünf auf zwei zu vermindern und auf diese Weise den Zeitaufwand für die Reinigung wesentlich zu verkürzen. Die vorliegende Erfindung ermöglicht es darüber hinaus, den Ertrag an rHSA aus dem Kulturmedium im Vergleich zum herkömmlichen Verfahren zu erhöhen.

[0053] Das durch diese Behandlungen gewonnene rHSA kann durch ein herkömmliches Reinigungsverfahren weiter gereinigt werden. Beispiele für das hierin verwendete Reinigungsverfahren umschließen jene, die allgemein auf dem Fachgebiet eingesetzt werden, wie etwa hydrophobe Chromatographie, Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran, Behandlung mit Anionen-Austauscher, Behandlung mit Chelat-Harz und Behandlung mit Borsäure/Borat. Jede dieser Behandlungsarten oder eine Kombination hieraus können verwendet werden. Um ein gereinigtes rHSA-Produkt mit verbesserten Qualitäten zu gewinnen, ist es vorteilhaft, die hydrophobe Chromatographie, Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran, Behandlung mit Anionen-Austauscher, Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran, Behandlung mit Chelat-Harz, Behandlung mit Borsäure/Borat und Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran in dieser Reihenfolge durchzuführen.

[0054] Es ist vorteilhaft, die adsorbierte Fraktion, die nach dem Kontakt der Lösung mit den Adsorbensteilchen eluiert wird, vor der vorstehend genannten Reinigung in Anwesenheit eines reduzierenden Agens noch einmal zu erhitzen. Wie nachstehend im Testbeispiel 6 gezeigt werden wird, ist diese Hitzebehandlung hochwirksam im Bezug auf Verringerung der für rHSA charakteristischen Färbung, wobei der Ertrag an rHSA im Vergleich zu dem Fall, dass diese Hitzebehandlung ausgelassen wird, nicht beeinträchtigt wird. Besonders ermöglicht es diese Hitzebehandlung, die färbenden Stoffe durch das nachfolgende Reinigungsverfahren signifikant zu entfernen.

[0055] Die Erhitzungstemperatur beträgt gewöhnlich von 50 bis 100°C, bevorzugt von etwa 60 bis 80°C und weiter bevorzugt 60°C. Die Erhitzungsdauer beträgt gewöhnlich von 10 Minuten bis 10 Stunden, bevorzugt von etwa 30 Minuten bis 5 Stunden und weiter bevorzugt 1 Stunde.

[0056] Das hierin zu verwendende reduzierende Agens ist nicht besonders eingeschränkt, solange es eine reduzierende Wirkung ausübt. Beispiele hierfür umschließen Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht, die eine SH-Gruppe besitzen (z. B. Cystein, Cysteamin, Cystamin, Methionin, Glutathion etc.), Sulfate, Pyrosulfite, phosphorierte Pyrosulfite und Ascorbinsäure. Cystein wird bevorzugt verwendet. In Bezug auf Zugabespiegel kann Cystein zum Beispiel in einer solchen Menge zugegeben werden, dass sich eine Endkonzentration von etwa 1 bis 100 mM ergibt, während ein Sulfat in einer solchen Menge zugegeben werden kann, dass sich eine Endkonzentration von etwa 0,001 bis 10% ergibt.

[0057] Es ist vorteilhaft, diese Behandlung in Anwesenheit eines Stabilisators vorzunehmen. Beispiele für den Stabilisator umschließen Acetyltryptophan und organische Carboxylsäure mit 6 bis 10 Kohlenstoffatomen oder Salze hiervon. Die Stabilisatoren können zusammen verwendet werden. Acetyltryptophan kann zum Beispiel in einer solchen Menge zugegeben werden, dass sich in der Lösung eine Endkonzentration von etwa 1 bis 100 mM ergibt. Beispiele für die organischen Carboxylsäuren mit 6 bis 18 Kohlenstoffatomen umschließen Capronsäure, Caprylsäure, Capronsäure, Laurinsäure, Palmitinsäure und Oleinsäure. Es ist vorteilhaft, 10 mM Caprylsäure zu verwenden. Beispiele für die Salze hiervon umschließen Salze der Alkalimetalle (z. B. Natriumsalz, Kaliumsalz etc.) und Salze der Erdalkalimetalle (z. B. Calciumsalz etc.). Diese organischen Carboxylsäuren mit 6 bis 18 Kohlenstoffatomen oder Salze hiervon können in einer Menge von zum Beispiel etwa 1 bis 100 mM zugegeben werden.

[0058] Durch weitere Zugabe von 10 bis 1.000 mM Aminoguanidin kann die auf die Erhitzung zurück zu führende Färbung unterdrückt werden (JP-A-3-1031BB).

(a) Hydrophobe Chromatographie

[0059] Die hydrophobe Chromatographie kann in herkömmlicher Weise durchgeführt werden. Beispiele für den Trägerstoff für die hydrophobe Chromatographie umschließen unlösliche Trägerstoffe mit einer Alkylgruppe, die 4 bis 18 Kohlenstoffatome trägt (Butylgruppe, Oktylgruppe, Oktyldekylgruppe etc.) oder eine Phenylgruppe. Es ist vorteilhaft eine solche mit einer Phenylgruppe zu verwenden, wie etwa Phenylzellulose (Phenyl-Cellulofine, hergestellt von Chisso Corporation). Bei diesem Schritt kann rHSA in die nicht adsorbierte Fraktion zurück gewonnen werden. Der Kontakt kann zum Beispiel bei einem pH-Wert von etwa 6 bis 8 durchgeführt werden, bevorzugt etwa bei dem PH-Wert 6,5 bis 7, und bei einer Salzkonzentration von etwa 0,01 bis 0,5 M, bevorzugt etwa 0,05 bis 0,2 M.

(b) Behandlung mit Anionen-Austauscher

[0060] Die Behandlung mit einem Anionen-Austauscher kann ebenfalls in einer herkömmlichen Weise durchgeführt werden. Es kann jeder Anionen-Austauscher verwendet werden, solange sein unlöslicher Trägerstoff eine Anionen-Austauschgruppe besitzt. Beispiele für diese Anionen-Austauschgruppe umschließen eine Diethylaminoethyl (DEAE) -gruppe und eine quartäre Aminoethyl (QAE) -gruppe. Es ist vorteilhaft, eine solche zu verwenden, die eine DEAE-Gruppe besitzt, wie etwa DEAE-Agarose (DEAE-Sepharose, hergestellt von Pharmacia), DEAE-Dextran (DEAE-Sephadex, hergestellt von Pharmacia) und DEAE-Polyvinyl (DEAE-Toyopearl, hergestellt von Tosoh Corporation). Bei diesem Schritt kann rHSA in die nicht adsorbierte Fraktion zurück gewonnen werden. Der Kontakt kann zum Beispiel bei einem pH-Wert von 6 bis 8 durchgeführt werden, bevorzugt bei etwa 6,5 bis 7, und bei einer Salzkonzentration von etwa 0,01 bis 0,1 M.

[0061] Durch diese Behandlung mit einem Anionen-Austauscher können färbende Stoffe und Spurenverunreinigungen entfernt werden.

(c) Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran

[0062] Nach Abschluss der hydrophoben Chromatographie und/oder der Behandlung mit einem Anionen-Austauscher wird die auf diese Weise zurück gewonnene, rHSA enthaltende Fraktion bevorzugt der Behandlung mit der Ultrafiltrationsmembran unterworfen. Durch diese Behandlung mit der Ultrafiltrationsmembran können Pyrogene entfernt werden. Bei der Behandlung mit der Ultrafiltrationsmembran ist es vorteilhaft, eine Ultrafiltrationsmembran zu verwenden, die eine Molekulargewichtsgrenze bei etwa 100 bis 300 K aufweist. Als ein besonderes Beispiel hiervon kann eine Pellicon-Kassettenmembran 100 K (hergestellt von Millipore) genannt werden.

(d) Behandlung mit Chelat-Harz

[0063] Die Behandlung mit Chelat-Harz ist besonders bei der Entfernung färbender Stoffe wirksam, die für das durch Genmanipulation gewonnene rHSA charakteristisch sind. Im vorstehend genannten Reinigungsverfahren wird diese Behandlung bevorzugt im Anschluss an die hydrophobe Chromatographie – Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran – Behandlung mit Anionen-Austauscher – Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran durchgeführt. Sie wird durchgeführt, indem ein Chelat-Harz mit einem spezifischen Liganden mit rHSA in Kontakt gebracht wird, und das rHSA ist dann in der durchgelaufenen Fraktion enthalten. Es ist vorteilhaft, dass der Trägerteil des Chelat-Harzes ein solcher mit hydrophoben Eigenschaften ist. Beispiele hiervon umschließen ein Styrol/Divinylbenzen-Copolymer und ein Acrylsäure/Methacrylsäure-Copolymer. Auf der anderen Seite umschließen Beispiele für den Ligand-Teil des Chelat-Harzes Polyol-Gruppen wie etwa N-Methylglucamin, Polyamin-Gruppen (einschließlich Polyalkylen-Polyamine wie etwa Polyethylen-Polyamin) mit mehreren Iminogruppen, Aminogruppen, Ethylen-Iminogruppen etc. im Molekül und Thioharnstoff-Gruppen. Man kann jene kommerziell erhältlichen verwenden, die einen Styrol/Divinylbenzen-Copolymer-Trägerstoff aufweisen, wie etwa DIAION CRB02 (Ligand: N-Methylglucamin-Gruppe, hergestellt von Mitsubishi Kasei Corporation), LEWATIT TP214 (Ligand: – $NHCSNH_2$, hergestellt von Bayer) und Amberlite CG4000.

[0064] Geeignete Bedingungen für diese Behandlung mit Chelat-Harz sind wie folgt:
pH-Wert: sauer oder neutral oder basisch (pH-Wert 3 bis 9, bevorzugt pH-Wert 4 bis 1).
Dauer: 1 Stunde oder länger, bevorzugt 6 Stunden oder länger.
Ionenkonzentration: 50 mmho oder darunter, bevorzugt von 1 bis 10 mmho.
Mischungsverhältnis: 0,1 bis 100 g, bevorzugt 1 bis 10 g (Nassgewicht) Harz pro 250 mg HSA.

(e) Behandlung mit Borsäure Borat

[0065] Durch die weitere Behandlung der rHSA enthaltenden Lösung, die durch die vorstehend genannte Behandlung gewonnen wurde, mit Borsäure oder Borat (hierin als Borsäure/Borat bezeichnet) können Verunreinigungen entfernt werden, die eine aus dem Wirtsorganismus stammenden Antigenizität aufweisen, und nicht antigen wirkende freie Verunreinigungen, die mit dem Phenol-Schwefelsäure-Verfahren nachgewiesen werden können.

[0066] Beispiele für die Borsäure, die hierin verwendet werden kann, umschließen Orthoborsäure, Metaborsäure und Tetraborsäure. Beispiele für die Borate umschließen Salze der Alkalimetalle (z. B. Natriumsalz, Kaliumsalz etc.) und Salze der Erdalkalimetalle (z. B. Calciumsalz etc.). Es ist vorteilhaft, Calciumtetraborat zu verwenden. Die Borsäure oder das Borat können in solchen Mengen zugegeben werden, dass sie eine Endkonzentration von etwa 0,01 bis 1 M erreichen, bevorzugt von etwa 0,05 bis 0,2 M. Diese Behandlung wird zum Beispiel bei einem pH-Wert von etwa 8 bis 11, bevorzugt bei einem pH-Wert von etwa 9 bis 10, über etwa 1 bis 100 Stunden, bevorzugt etwa 5 bis 50 Stunden durchgeführt. Bei diesem Schritt ist die rHSA enthaltende Lösung mit einer geringen elektrischen Leitfähigkeit wünschenswerter. Zum Beispiel beträgt die elektrische Leitfähigkeit der rHSA enthaltenden Lösung 1 mS oder weniger. Ebenso ist die rHSA enthaltende Lösung mit einer hohen Konzentration an rHSA wünschenswerter. Zum Beispiel beträgt die rHSA-Konzentration 5% oder mehr, bevorzugt von etwa 15 bis 20%.

[0067] Nach Abschluss der vorstehend genannten Behandlung mit Borsäure/Borat wird rHSA durch ein herkömmliches Verfahren wie etwa Zentrifugation oder Ultrafiltration aus dem Überstand zurück gewonnen.

(3) Eigenschaften von hoch gereinigtem, aus Genmanipulation stammenden HSA

[0068] Das auf diese Weise gewonnene, hoch gereinigte rHSA ist eine homogene Substanz mit einem Molekulargewicht von etwa 67.000 und einem isoelektrischen Punkt bei 4,9. Es besteht allein aus Monomeren, ist im wesentlichen frei von Dimeren, Polymeren oder Verfallsprodukten (Molekulargewicht: etwa 43.000). Es ist auch im wesentlichen frei von allen antigen wirkenden Verunreinigungen oder Polysacchariden, die aus dem produzierenden Wirtsorganismus stammen. Bei Formulierung in einer rHSA-Lösung von 250 mg/ml (einer 25%igen Lösung) weist es ein A350/A280-Verhältnis von unter 0,015 auf, bevorzugt von 0,013 oder darunter und weiter bevorzugt von etwa 0,01 bis 0,015. rHSA mit einem solchen reduzierten Färbungsgrad (d. h. einem niedrigen A350/A280-Wert) kann durch die Anwendung einer geeigneten Kombination der bekannten Reinigungstechniken [die vorstehend genannten Techniken (a) bis (e), etc.] gewonnen werden.

[0069] Die vorliegende Erfindung ermöglicht es erstmals, ein rekombinantes HSA (oder eine Zusammenstellung, die jenes enthält) bereit zu stellen, das ein A350/A280-Verhältnis von unter 0,015 aufweist, wenn es in

einer 25%igen rHSA-Lösung formuliert wird.

(4) Formulierung

[0070] Das durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung gewonnene rHSA kann mit bekannten Verfahren (Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran, Zugabe von Stabilisatoren, antiseptische Filtration, Pipettierung, Gefriertrocknung etc.) in Präparate formuliert werden. Die auf diese Weise erhaltenen Präparate können für klinische Zwecke als Serumalbumin-Präparate in der gleichen Dosierung und der gleichen Weise verabreicht werden, wie jene, die im Fall des herkömmlichen, aus Plasma stammenden HSA eingesetzt werden. Sie sind auch als Stabilisatoren, Füllstoffe oder Trägersubstanzen für Wirkstoffe verwendbar.

[0071] Der hierin verwendete Ausdruck „rHSA enthaltende Zusammensetzung" bezeichnet ein Material, das das hoch gereinigte rHSA der vorliegenden Erfindung in einer hohen Konzentration, aber niedriger als 100%, zusammen mit (einem) anderen Bestandteilen) in einer Spurenmenge enthält.

[0072] Um die vorliegende Erfindung in genaueren Einzelheiten zu erläutern, und nicht um sie einzuschränken, werden die nachstehenden Beispiele angeführt.

Beispiel 1

(1) Hitzebehandlung des Kulturmediums

[0073] Eine HSA produzierende Hefe Pichia pastoris wurde erworben und in Übereinstimmung mit dem in EP-A-655503 beschriebenen Verfahren inkubiert.

[0074] Etwa 2,8 Liter des Kulturmediums einschließlich der Zellen, die auf diese Weise erhalten wurden, wurden als Ganzes auf 68°C über 30 Minuten erhitzt. Die Hitzebehandlung wurde in Gegenwart von 10 mM Natriumcaprylat durchgeführt. Dieses Kulturmedium hatte einen pH-Wert von 6. Als nächstes wurde die erhitzte Lösung schnell auf etwa 15°C abgekühlt und etwa 2-fach mit destilliertem Wasser verdünnt (Gesamtvolumen: 5,5 Liter). Dann wurde der pH-Wert hiervon mit einer Essigsäurelösung auf 4,5 eingestellt.

(2) Behandlung mit Adsorbensteilchen (Streamline SP-Behandlung)

[0075] Eine Streamline SP-Säule (C50, 5 × 100 cm, Gelvolumen: 300 ml, hergestellt von Pharmacia), die mit 50 mM Acetatpufferlösung (pH-Wert 4,5), die 50 mM Natriumchlorid enthielt, äquilibriert worden war, wurde aufwärts gerichtet mit 5,5 Litern des die Hefezellen enthaltenden Kulturmediums (elektrische Leitfähigkeit: < 10 mS) befüllt, das aus der vorstehend genannten Hitzebehandlung (1) erhalten worden waren. Das Befüllen wurde mit einer Fließrate von 100 cm/h unter Rühren durchgeführt. Als nächstes wurde die gleiche Pufferlösung (im Volumen 2,5 mal mehr als die Säulenkapazität) wie jene, die auch für die Äquilibrierung der Säule verwendet worden war, aufwärts gerichtet in die Säule gefüllt, um auf diese Weise die Säule mit einer Fließrate von 100 cm/h über 1 Stunde und dann mit 300 cm/h über 30 Minuten zu waschen. Im Folgenden wurde die Fließrichtung umgekehrt und ein Eluent [eine 100 mM Phosphatpufferlösung (pH-Wert 9), die 300 mM Natriumchlorid enthielt, Flussrate: 50 cm/h] in die Säule gegeben. Auf diese Weise wurden eine rHSA enthaltende Fraktion gewonnen.

[0076] Die auf diese Weise eluierte, rHSA enthaltende Fraktion wurde durch Messen der Absorption bei 280 nm nachgewiesen.

(3) Hitzebehandlung

[0077] Die auf diese Weise erhaltene, rHSA enthaltende Fraktion wurde auf 60°C über 1 Stunde in Gegenwart von 10 mM Cystein, 5 mM Natriumcaprylat und 100 mM Aminoguanidin-Hydrochlorid bei einem pH-Wert von 7,5 erhitzt.

(4) Hydrophobe Chromatographie

[0078] Die im vorstehende Abschnitt (3) erhitzte rHSA-Lösung wurde in eine Säule gegossen, die mit Phenyl-Cellufine gefüllt war (5 × 25 cm, Gel-Volumen: 500 ml, hergestellt von Chisso Corporation) und mit einer 50 mM Phosphatpufferlösung (pH-Wert 6,8), die 0,15 M Natriumchlorid enthielt, äquilibriert worden war. Unter diesen Bedingungen wurde das rHSA nicht von der Phenyl-CellulofineSäule adsorbiert, sondern wanderte

durch sie hindurch. Die rHSA enthaltende, die Säule passierende Lösung wurde auf ein Volumen von etwa 0,2 Liter konzentriert, indem eine Ultrafiltrationsmembran mit einer Molekulargewichtsgrenze von 30.000 (hergestellt von Millipore) verwendet wurde, und die rHSA enthaltende Lösung wurde durch einen 50 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 6,8) ersetzt.

(5) Behandlung mit Anionen-Austauscher

[0079] Nach Abschluss der hydrophoben Chromatographie wurde die rHSA enthaltende Lösung, die konzentriert und mit Pufferlösung ersetzt worden war, in eine Säule gegossen, die mit DEAE-Sepharose FF (5 × 25 cm, Gelvolumen: 500 ml, hergestellt von Pharmacia) gefüllt und mit einer 50 mM Phosphatpufferlösung (pH-Wert 6,8) äquilibriert worden war. Unter diesen Bedingungen wurde das rHSA von der DEAE-Sepharose-Säule nicht adsorbiert, sondern lief durch sie hindurch. Das durch die Säule gelaufene rHSA wurde unter Verwendung einer Ultrafiltrationsmembran mit einer Molekulargewichtsgrenze von 30.000 (hergestellt von Millipore) auf etwa 0,2 Liter konzentriert, und die rHSA enthaltende Lösung wurde durch destilliertes Wasser ersetzt.

(6) Behandlung mit Chelat-Harz

[0080] Zu den 0,2 Litern der gereinigten rHSA-Lösung, die eine Konzentration von etwa 7% aufwies, wurde Essigsäure zugegeben, um den pH-Wert auf 4,5 einzustellen. Dann wurde sie in eine Säule gegossen, die mit DIAION CRB02 (5 × 2,5 cm, Gelvolumen: 500 ml, hergestellt von Mitsubishi Kasei Corporation) gefüllt und mit einer 50 mM Natriumacetatpufferlösung (pH-Wert 4,5) äquilibriert worden war, und man ließ sie über Nacht zirkulieren. Unter diesen Bedingungen wurde das rHSA nicht vom Gel adsorbiert, sondern lief durch die Säule hindurch.

(7) Behandlung mit Borsäure/Borat

[0081] Die rHSA-Konzentration wurde auf 2,5% eingestellt, während die elektrische Leitfähigkeit der Lösung auf 1 mS oder darunter reguliert wurde. Natriumtetraborat wurde hierzu zugegeben, so dass es in einer Endkonzentration von 100 mM vorlag. Als nächstes wurde Calciumchlorid hierzu zugegeben, so dass es in einer Endkonzentration von 100 mM vorlag, während der pH-Wert auf 9,5 gehalten wurde. Nachdem eine Standzeit von etwa 10 Stunden gestattet worden war, wurde der auf diese Weise gebildete Niederschlag entfernt, und der Überstand wurde zurück gewonnen, konzentriert und entsalzen. Dann wurde er unter Verwendung einer Ultrafiltrationsmembran mit einer Molekulargewichtsgrenze von 30.000 (hergestellt von Millipore) konzentriert und der Ersetzung durch Pufferlösung unterworfen. Falls notwendig, wurden Stabilisatoren (Natriumcaprylat und Acetyltryptophan) zugegeben, gefolgt von Filtersterilisation unter Verwendung eines 0,22 µm Filters (hergestellt von Millipore).

TESTBEISPIEL 1

Stabilisierender Einfluss der Hitzebehandlung auf das rHSA-Kulturmedium

[0082] Es ist bekannt, dass wirkungsvolle Proteasen, die in einem rHSA-Kulturmedium enthalten sind, rHSA abbauen. Wie Tabelle 1 zeigt, läuft der Abbau von rHSA unter sauren Bedingungen bei pH-Wert 4 extrem schnell ab.

TABELLE 1
pH-Stabilität von rHSA-Kulturmedium

Probe	Lagerbedingungen	pH-Wert bei Lagerung	HSA-Konzentration (mg/ml)	Ertrag (%)
Kulturmedium (Hefezellen enthaltend)	15 °C, 15 h (stationär)	Kontrolle	7,6	100,0
		6,0	7,7	100,9
		4,5	7,2	94,0
		4,0	3,0	39,9

[0083] rHSA wurde von Streamline SP bei einem pH-Wert von etwa 4,5 adsorbiert. Daher wurde die Stabilität von rHSA bei dem pH-Wert von etwa 4,5 untersucht, und die Erhitzungsbedingungen, die die Inaktivierung von Proteasen als eine Vorbehandlung für die Gewinnung von rHSA in einem stabilen Status bewirken, wurden untersucht, indem die Stabilität von rHSA nach Einstellung des pH-Wertes der erhitzten Lösung auf 4,5 und Gestatten eine Standzeit bei Zimmertemperatur über Nacht bestimmt wurde. **Fig.** 1 zeigt die Ergebnisse. Im Erhitzungsschritt wurde Natriumcaprylat zu jeder Probe zugegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 10 mM ergab. Die verwendeten Erhitzungsbedingungen sind wie folgt:
A: Kontrolle
B: 68°C, 30 Minuten, pH-Wert 6,0.
C: 68°C, 30 Minuten, pH-Wert 6,8.
D: 68°C, 30 Minuten, pH-Wert 7,5.
E: 68°C, 30 Minuten, pH-Wert 8,2.
F: 60°C, 2 Stunden, pH-Wert 6,0.
G: 60°C, 2 Stunden, pH-Wert 6,8.
H: 60°C, 2 Stunden, pH-Wert 7,5.
I: 60°C, 2 Stunden, pH-Wert 8,2.
J: 60°C, 2 Stunden, pH-Wert 6,8, 10 mM Cystein.
K: 60°C, 2 Stunden, pH-Wert 7,5, 10 mM Cystein.
L: Zimmertemperatur (25°C), 2 Stunden, pH-Wert 6,0.
M: Zimmertemperatur (25°C), 2 Stunden, pH-Wert 8,2.

[0084] Ein Ergebnis war, dass es wirkungsvoller war, auf 68°C für 30 Minuten zu erhitzen, als auf 60°C für 2 Stunden zu erhitzen. In Bezuge auf den pH-Wert wurden die wünschenswertesten Ergebnisse bei einem pH-Wert von etwa 6 erreicht, welches der pH-Wert des Kulturmediums zu Beginn der Erhitzung war.

TESTBEISPIEL 2

Beziehung zwischen pH-Wert des rHSA-Kulturmediums und der Bindungsfähigkeit an das Adsorbens

[0085] Der pH-Wert des Kulturmediums (rHSA: 55,6 mg) wurde mit Essigsäure auf verschiedene Werte (pH-Werte 4,5 bis 4,9) eingestellt, gefolgt von der Zugabe von 1 ml eines Streamline SP-Gels, das mit 50 mM Acetatpufferlösung äquilibriert worden war. Nach Vermischung und Rühren bei Zimmertemperatur über 1 Stunde und Waschung mit jeder Äquilibrierungspufferlösung wurde die Menge (%) des rHSA bestimmt, das in der nicht adsorbierten Fraktion zurück geblieben war. Als ein Ergebnis wurde herausgefunden, dass die Menge des rHSA, das an das Adsorbens bindet, mit dem Sinken des pH-Wertes anstieg und das Maximum bei einem pH-Wert von etwa 4,5 erreichte (Tabelle 2).

TABELLE 2
pH-Wert des Kulturmediums und Bindungsfähigkeit an das Gel

Probe (Adsorptionsbedingung)	rHSA in nicht adsorbierter Fraktion (mg)	rHSA in nicht adsorbierter Fraktion (%)
Ausgangsmaterial	55,6	100,0
kein Gel zugegeben:		
pH-Wert 4,5	51,0	91,7
1 ml Gel zugegeben		
pH-Wert 4,5	5,1	9,2
pH-Wert 4,6	7,6	13,7
pH-Wert 4,7	14,9	26,8
pH-Wert 4,8	33,1	59,5
pH-Wert 4,9	49,4	88,8

TESTBEISPIEL 3

Beziehung zwischen elektrischer Leitfähigkeit der Atmosphäre für den Kontakt der erhitzten Lösung mit Adsorbensteilchen und der Bindungsfähigkeit von rHSA an Adsorbensteilchen

[0086] Nach Erhitzung wurde das Kulturmedium [elektrische Leitfähigkeit: etwa 20 mS (bei 25°C), rHSA: 47,1 mg] mit destilliertem Wasser verdünnt, um verschiedene Verdünnungen zu erhalten, und der pH-Wert von jeder Verdünnung wurde mit Essigsäure auf 4,5 eingestellt, gefolgt von der Zugabe von 1 ml eines Streamline SP-Gels, das mit einer 50 mM Acetatpufferlösung (pH-Wert 4,5), die 50 mM Natriumchlorid enthielt, äquilibriert worden war. Nach Vermischung bei Zimmertemperatur über 1 Stunde und Waschung mit der Äquilibrierungspufferlösung wurde rHSA mit einer 0,1 M Phosphatpufferlösung (pH-Wert 9), die 0,3 M Natriumchlorid enthielt, eluiert. Als ein Ergebnis wurde herausgefunden, dass die Menge an rHSA, die an die Adsorbensteilchen bindet, mit einem Ansteigen der Verdünnung und einem Absinken der elektrischen Leitfähigkeit der Lösung anstieg und den höchsten Wert erreichte, wenn die elektrische Leitfähigkeit der Atmosphäre (in dem Gel-Gemisch), bei der die erhitzte Lösung mit den Adsorbensteilchen in Kontakt gebracht wurde, etwa 8 bis 12 mS betrug (**Fig.** 2).

TEISBEISPIEL 4

Stabilität des Streamline SP-Eluats

[0087] Das Kulturmedium wurde 2-fach mit destilliertem Wasser verdünnt, und der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 4,5 eingestellt. Dann wurde eine definierte Menge Streamline SP-Gel, das mit einer 50 mM Acetatpufferlösung (pH-Wert 4,5), die 50 mM Natriumchlorid enthielt, äquilibriert worden war, hierzu zugegeben, und das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur für 1 Stunde gerührt. Als nächstes wurde das Gel mit der Äquilibrierungspufferlösung gewaschen, und rHSA wurde mit Hilfe einer 0,1 M Phosphatpufferlösung (pH-Wert 9), die 0,3 M Natriumchlorid enthielt, gewaschen. Darauf wurde die Stabilität des rHSA in der Fraktion (pH-Wert 8) untersucht. Ein Ergebnis war, dass das rHSA im Kulturmedium, das zuerst erhitzt worden war (68°C, 30 Minuten), nach drei Tagen keine Änderung zeigte, während das aus dem unbehandelten Kulturmedium stammende rHSA aufgrund von Abbauvorgängen auf etwa 50% reduziert worden war (Tabelle 3).

TABELLE 3
Stabilität des Streamline SP-Eluats
(Zimmertemperatur, 3 Tage, pH-Wert 8)

Probe	rHSA vor Lagerung (mg/ml)	rHSA nach Lagerung (mg/ml)	Erhaltungsgrad (%)
Eluat aus nicht erhitzter rHSA-Kultur	4,39	2,44	55,7
Eluat aus erhitzter rHSA-Kultur (60 °C, 2 h)	4,55	4,45	97,6
Eluat aus erhitzter :HSA-Kultur (68 °C, 30 min)	4,52	4,67	103,4

TESTBEISPIEL 5

Vergleich zwischen rHSA-Ertrag und Färbungsgrad zwischen Behandlung (Erhitzen – Adsorbensteilchen) und Behandlung (nicht erhitzen – Adsorbensteilchen)

[0088] Beruhend auf den Ergebnissen der Testbeispiele 1 bis 4 wurde eine optimale Abfolge für das Verfahren Erhitzung – Behandlung mit Adsorbensteilchen entwickelt (**Fig.** 3).

[0089] In Übereinstimmung mit der Abfolge aus **Fig.** 3 wurde ein Versuch unternommen, rHSA unter Verwendung einer Streamline SP-Säule (5 × 100 cm, Gelvolumen: 300 ml) aus einem Kulturmedium (2,8 Liter) zu reinigen, das Hefezellen enthielt. Auf der anderen Seite wurde ein Kulturmedium (2,7 Liter), das Hefezellen enthielt, der Behandlung mit den Adsorbensteilchen ohne anfängliche Erhitzung unterworfen, um auf diese Weise rHSA zu reinigen.

[0090] Ein Ergebnis war, dass der Gesamtertrag, der mit der (keine Erhitzung – Adsorbensteilchen) – Behandlung erreicht wurde, 50% betrug, während mit der (Erhitzung – Adsorbensteilchen) – Behandlung der vorliegenden Erfindung ein höherer Ertrag (etwa 85%) erreicht wurde. Das aus der (keine Erhitzung – Adsorbensteilchen) -Behandlung gewonnene rHSA wies auch einen Färbungsgrad von 0,048 aus dem Verhältnis A350/A280 auf, während das rHSA, das mit der Behandlung der vorliegenden Erfindung (Erhitzung – Adsorbensteilchen) einen geringeren Färbungsgrad (0,0345) aufwies (Tabelle 4). **Fig.** 4 zeigt einen Vergleich zwischen einem Gelfiltrations-HPLC-Profil eines Streamline-Eluats aus der (Erhitzung – Adsorbensteilchen)- Behandlung und dem eines Streamline SP-Eluats aus der (keine Erhitzung – Adsorbensteilchen) -Behandlung. Letzteres zeigt bedeutenden Abbau und Degradierung von rHSA.

Tabelle 4
Reinigung von rHSA mit Streamline SP-Säule

Probe	Volumen (Liter)	rHSA (g)	Ertrag (%)	Färbungsgrad (A350/A280)
erhitzte Probe:				
Kulturmedium	2,8	19,3	100	0,0475
erhitzt (60 °C, 30 min)	5,5	17,5	90,5	0,0291
Säulendurchfluss	10,5	1,3	6,6	-
Säuleneluat	1,2	16,5	85,4	0,0345
nicht erhitzte Probe:				
Kulturmedium	2,7	11,9	100	0,0482
zur Säule zugegebene Lösung (verdünnt, pH-Wert eingestellt)	5,3	10,0	84,2	0,0366
Säulendurchfluss	10,5	1,0	8,8	-
Säuleneluat	1,2	5,9	50,0	0,0480

TESTBEISPIEL 6

Einfluss der Erhitzung mit Cystein auf rHSA-Färbung

[0091] Das rHSA-Eluat aus der Streamline SP-Säule der (Erhitzung – Adsorbensteilchen) – Behandlung der vorstehend angeführten Tabelle 4, das als Ausgangsmaterial verwendet wurde, wurde der in Beispiel 1 (4) und (5) beschriebenen hydrophoben Chromatographie und der Behandlung mit Anionen-Austauscher unterworfen, und auf diese Weise wurde der Färbungsgrad (A350/A280) untersucht. In dieser Untersuchung wurden zwei Proben der Streamline SP-Eluate verwendet, d. h. eines, das aus der Erhitzung in Anwesenheit von Cystein stammte (Endkonzentration: 10 mM), und das andere wurde durch nicht Erhitzen in Anwesenheit von Cystein erhalten. Ein Ergebnis war, dass die Erträge an rHSA aus diesen beiden Proben fast die gleichen waren, unabhängig vor. der Anwesenheit von Cystein. In Bezug auf den Färbungsgrad jedoch zeigte die Probe, die in Anwesenheit von Cysein erhitzt worden war, den Wert 0,0128, der im Vergleich zu 0,0184 für die nicht erhitzte Probe nach der Behandlung mit dem Anionen-Austauscher signifikant niedriger war (Tabelle 5).

TABELLE 5
Reinigung von rHSA nach dem Streamline-Schritt

Probe	Färbungsgrad (A350/A280)
Streamline-Eluat	0,0311
erhitzt mit Cystein	0,0212
Phenyl-behandelt	0,0197
ultrafiltriert (UF30K-R)	0,0205
DEAE-behandelt	0,0128
Streamline-Eluat	0,0311
Phenyl-behandelt	0,0270
ultrafiltriert (UF30K-R)	0,0275
DEAE-behandelt	0,0184

TESTBEISPIEL 7

Reduzierung des Färbungsgrades (A350/A280) von rHSA durch Einführung der Streamline SP-Behandlung

[0092] **Fig.** 5 zeigt einen Vergleich der Änderungen des Färbungsgrades (A350/A280)zwischen rHSA bei jedem Schritt des herkömmlichen Verfahrens und rHSA im Verfahren der vorliegenden Erfindung, das den Streamline SP-Schritt bis zu Schritt der Behandlung mit dem Anionen-Austauscher umschloss. Im Verfahren der vorliegenden Erfindung, worin die Streamline SP-Behandlung angewendet wurde, und die Erhitzung direkt im Anschluss daran in Anwesenheit von Cystein durchgeführt wurde, wurde bei dem Schritt der hydrophoben Chromatographie ein großer Unterschied zum herkömmlichen Verfahren beobachtet. Nach Abschluss der Behandlung mit dem Anionen-Austauscher wurde ein extrem niedriger Färbungsgrad (0.0128) beobachtet. **Fig.** 6 zeigt einen Vergleich des Absorptionsspektrums zwischen einer Probe, die nach der Behandlung mit Chelat-Harz im Anschluss an das herkömmliche Verfahren erhalten wurde, wie in **Fig.** 5 (Kurve 1) dargestellt, und Proben, die nach der Behandlung mit Anionen-Austauscher und Behandlung mit Chelat-Harz aus dem Reinigungsverfahren der vorliegenden Erfindung erhalten wurde, wie in Beispiel 1 (Kurve 2 und 3) beschrieben. Ein Ergebnis war, dass das Absorptionsspektrum des rHSA, das mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung gereinigt worden war, im Vergleich zu der Probe, die nach der Behandlung mit Chelat-Harz im Anschluss an das herkömmliche Verfahren, wie in **Fig.** 5 dargestellt, gewonnen worden war, schon nach der Behandlung mit dem Anionen-Austauscher ein bemerkenswert geringes Muster im sichtbaren Bereich (350–700 nm) zeigte. Nach Behandlung mit dem Chelat-Harz in dem neu erfundenen Verfahren wurde dieser Unterschied noch deutlicher.

TESTBEISPIEL 8

Analyse von rHSA, erhalten mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung durch Gelfiltrations-HPLC

[0093] **Fig.** 7 zeigt die Ergebnisse der Analyse durch die hoch auflösende Gelfiltrations-Flüssigchromatographie (GPC-HPLC) der rHSA-Proben, die nach den genannten Schritten des Verfahrens der vorliegenden Erfindung gewonnen wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben (rHSA-Kulturmedium, Streamline SP-Eluat, nicht adsorbierte Streamline SP-Fraktion, DEAE-nachbehandelte Fraktion). Ein Ergebnis war, dass geklärt wurde, dass im Kulturmedium enthaltene Substanzen mit hohem Molekulargewicht, die nicht rHSA waren, und Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht zum größten Teil zusammen mit den Hefezellen mit einem hohen Wirkungsgrad mit der nicht adsorbierten Streamline SP-Fraktion ausgewaschen wurden und Albumin spezifisch im Eluat zurück behalten wurde. Das HPLC-Muster der Probe, die unter Verwendung dieser Fraktion als ein Ausgangsmaterial und nachfolgender Reinigung durch Behandlung mit dem Anionen-Austauser (DEAE) gewonnen worden war, zeigte nur einen scharfen Albumin-Gipfel (HSA-Monomer). Seine Reinheit war daher vergleichbar oder sogar besser als die der Probe, die aus dem DEAE-Schritt des herkömmlichen Reinigungsverfahrens erhalten wurde.

[0094] Auf der Basis dieser Testbeispiele wurde der Ertrag an rHSA aus dem DEAE-Schritt des herkömmli-

chen Reinigungsverfahrens und aus dem DEAE-Konzentrationsschritt des Verfahrens, das den Schritt der Behandlung mit Adsorbensteilchen (Streamline SP) verwendet, berechnet und miteinander verglichen. In dem Verfahren, das den Schritt der Behandlung mit Adsorbensteilchen (Streamline SP) verwendet, wurde die Anzahl der Schritte von fünf im herkömmlichen Verfahren (d. h. Pressen – Membran – Erhitzen – Membran – Behandlung mit Kationen-Austauscher) auf zwei reduziert. Auf diese Weise wurde die Behandlungszeit wesentlich verkürzt, und der Ertrag wurde um 30% gesteigert.

TESTBEISPIEL 9

Analyse von Verunreinigungen, die aus dem Wirtsorganismus stammen

[0095] Das Kulturmedium einer Hefe, die kein Albumin produzierte, wurde in gleicher Weise wie nach dem wie in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren der vorliegenden Erfindung gereinigt. Dann wurde ein Kaninchen hiermit immunisiert. Unter Verwendung des auf diese Weise gewonnenen Antiserums wurde eine Untersuchung zum Nachweis von Verunreinigungen in der gereinigten Albumin-Lösung, die aus der Hefe stammten, durchgeführt. Hierfür wurde ein Enzym-Immunoassay (EIA) verwendet. Die Albumin-Konzentration der Probe wurde auf 250 mg/ml eingestellt.

[0096] Ein Ergebnis war, dass im gereinigten Albumin nach der Behandlung mit Borsäure/Borat keine antigene, aus der Hefe stammende Verunreinigung bei einer Nachweisgrenze von 0,1 ng/ml nachgewiesen werden konnte.

TESTBEISPIEL 10

Eigenschaften des rHSA der vorliegenden Erfindung, gereinigt durch das Verfahren aus Beispiel 1

(1) Molekulargewicht

[0097] Das Molekulargewicht wurde durch das vorstehend genannte Verfahren der Gel-Filtrations-HPLC bestimmt. Das in Übereinstimmung mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung gereinigte rHSA hatte ein Molekulargewicht von etwa 67.000, d. h. fast das gleiche wie das des aus Plasma stammenden HSA.

(2) Isoelektrischer Punkt

[0098] Der isoelektrische Punkt wurde in Übereinstimmung mit dem Verfahren von Allen et al., [J. Chromatoq., 146, 1 (1978)] unter der Verwendung eines Polyacrylamid-Gels bestimmt. Das in Übereinstimmung mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung gereinigte rHSA hatte einen isoelektrischen Punkt von etwa 4,9, d. h. fast den gleichen wie der des aus Plasma stammenden HSA.

(3) Färbungsgrad

[0099] Der Färbungsgrad wurde bestimmt, indem eine Lösung des gereinigten rHSA verwendet wurde (Albumin-Konzentration: 250 mg/ml), die Absorption dieser Lösung bei 280 und 350 nm gemessen und das Verhältnis von A350/A280 berechnet wurde. Das in Übereinstimmung mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung gereinigte rHSA wies einen extrem niedrigen Färbungsgrad (A350/A280) von etwa 0,012 auf.

BEISPIEL 2

(1) Hitzebehandlung des Kulturmediums

[0100] Etwa 1.000 Liter des Kulturmediums, Zellen eingeschlossen, das durch das in EP-A-655503 beschriebene Verfahren in der gleichen Weise wie in Beispiel 1 gewonnen worden war, wurde als Ganzes auf 68°C für 30 Minuten erhitzt. Die Hitzebehandlung wurde in Anwesenheit von 10 mM Natriumcaprylat durchgeführt. Dieses Kulturmedium hatte einen pH-Wert von 6. Als nächstes wurde die erhitzte Lösung auf etwa 25°C abgekühlt und etwa 2-fach mit destilliertem Wasser verdünnt (Gesamtvolumen: etwa 2.000 Liter). Dann wurde der pH-Wert hiervon mit einer Essigsäure-Lösung (99,7%) in einer Menge von etwa 1,1% (v/v) des Volumens des Kulturmediums vor der Verdünnung auf 4,5 eingestellt.

(2) Behandlung mit Adsorbensteilchen (Streamline SP-Behandlung)

[0101] Eine Streamline SP-Säule (C1000, 100 × 110 cm, Gelvolumen: 150 Liter, hergestellt von Pharmacia), die mit 50 mM Acetatpufferlösung (pH-Wert 4,5), die 50 mM Natriumchlorid enthielt, äquilibriert worden war, wurde aufwärts gerichtet mit 2.000 Litern des die Hefezellen enthaltenden Kulturmediums befällt, das aus der vorstehend genannten Hitzebehandlung (1) erhalten worden waren. Das Befüllen wurde mit einer Fließrate von 100 bis 250 cm/h unter Rühren durchgeführt, so dass die Zellen sich nicht absetzen konnten, bevor die Zugabe des Kulturmediums in die Säule abgeschlossen war. Als nächstes wurde die gleiche Pufferlösung (fünfmal mehr im Volumen als die Säulenkapazität) wie die zur Äquilibrierung der Säule verwendete aufwärts gerichtet in die Säule gefüllt, um auf diese Weise die Säule mit einer Fließrate von 100 bis 500 cm/h zu waschen. Im Anschluss daran wurde die Fließrichtung umgekehrt, und ein Eluent [eine 100 mM Phosphatpufferlösung (pH-Wert 9), die 300 mM Natriumchlorid enthielt, Flussrate: 50 bis 100 cm/h] wurde in die Säule eingefüllt. Auf diese Weise wurde eine rHSA enthaltende Fraktion gewonnen.

[0102] Die auf diese Weise eluierte, rHSA enthaltende Fraktion wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm nachgewiesen.

(3) Hitzebehandlung

[0103] Die auf diese Weise gewonnene, rHSA enthaltende Fraktion wurde in Anwesenheit von 10 mM Cystein, 10 mM Natriumcaprylat, Natriumoleat in einer Menge von 4 Mol pro Mol rHSA und 100 mM Aminoguanidin-Hydrochlorid bei pH-Wert 7.5 über 1 Stunde auf 60°C erhitzt, um den Färbungsgrad von rHSA zu reduzieren und die Umwandlung von Dimeren in Monomere zu beschleunigen.

[0104] Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse von vier Durchgängen unter entsprechender Verwendung von 1 Tonne des Kulturmediums. Der durchschnittliche Ertrag nach der Hitzebehandlung von 68°C über 30 Minuten und der Hitzebehandlung mit Cystein beträgt 98,6% beziehungsweise 88,4%. Der Gesamtertrag aus den vier Durchgängen beträgt nicht weniger als 87,1%, was eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Beispiel 1 darstellt, in dem die Säule mit experimentellen Abmessungen (C50) verwendet wurde. Auf diese Weise wurde bestätigt, dass das Verfahren der vorliegenden Erfindung in einem großen Rahmen reproduzierbar ist.

TABELLE 6

Lauf Nr.	Schritt	Volumen (Liter)	rHSA (g)	Ertrag (%)	Färbungsgrad (A350/A280)
1	Kulturmedium	922	5868	100.0	0.0596
	erhitzt (68 °C, 30 min)	1900	5399	92.0	0.0379
	Säulendurchfluss	6000	-	-	-
	Säuleneluat	200	-	-	-
	erhitzt mit Cystein	62	4840	82.5	0.0268
2	Kulturmedium	943	6246	100.0	0.0547
	erhitzt (68 °C, 30 min)	1960	6351	101.7	0.0375
	Säulendurchfluss	6400	-	-	-
	Säuleneluat	300	-	-	-
	erhitzt mit Cystein	61	5674	90.9	0.0248
3	Kulturmedium	937	6200	100.0	0.0539
	erhitzt (68 °C, 30 min)	1877	6261	101.1	0.0307
	Säulendurchfluss	5777	462	7.4	-
	Säuleneluat	200	-	-	-
	erhitzt mit Cystein	111	5594	90.2	0.0227
4	Kulturmedium	916	6845	100.0	0.0520
	erhitzt (68 °C, 30 min)	1885	6818	99.6	0.0556
	Säulendurchfluss	5885	-	-	-
	Säuleneluat	300	-	-	-
	erhitzt mit Cystein	111	5804	84.8	0.0235

REFERENZBEISPIEL 1

Bestimmung von rHSA (Bewertung des Ertrags)

[0105] In den vorstehend angeführten Testbeispielen 1 bis 8 und 10 wurde das rHSA quantitativ (einschließlich des Ertrags) ausgewertet, indem eine rHSA enthaltende Lösung der Gelfiltrations-HPLC unterworfen wurde. Die genauen Elutionsbedingungen sind wie folgt.

[0106] Die rHSA enthaltende Lösung wurde in eine TSK-Gel G3000 SWxL-Säule (0,78 × 30 cm, hergestellt von Tosoh Corporation) gefüllt, die mit einer 50 mM Natriumphosphatpufferlösung (pH-Wert 6,5), die 0,1% NaN_3 und 0,3% NaCl enthielt, äquilibriert worden war. Dann wurde rHSA unter Verwendung der Äquilibrierungspufferlösung als ein Eluent mit einer Fließrate von 1 ml/min eluiert und durch Messung der Absorption bei

280 nm und 350 nm bestimmt.

[0107] Die vorliegende Erfindung wurde auf der Basis der Entdeckung gemacht, dass Proteasen einfach und wirksam durch direkte Erhitzung eines Hefe enthaltenden Kulturmediums als Ganzes inaktiviert werden können. Auf diese Weise liefert die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur einfachen und wirksamen Reinigung von rHSA, indem ein Kulturmedium, in dem Hefezellen verbleiben, erhitzt wird, und die erhitzte Lösung direkt mit den Adsorbensteilchen in einem Fließbett in Kontakt gebracht wird. Auf diese Weise wird die Anzahl der Schritte von fünf im herkömmlichen Verfahren (bestehend aus Pressung – Membran – Erhitzung – Membran – Behandlung mit Kationen-Austauscher) auf die zwei Schritte Erhitzung – Behandlung mit Adsorbensteilchen reduziert. Auf diese Weise wird die Behandlungszeit wesentlich verkürzt, und der Ertrag wird gesteigert. Darüber hinaus kann das Problem der Färbung, das für rekombinantes HSA charakteristisch ist, durch das Reinigungsverfahren der vorliegenden Erfindung gelöst werden, durch welches die färbenden Faktoren, die die Färbung verursachen, wirksam entfernt werden können.

[0108] Mit dem Reinigungsverfahren der vorliegenden Erfindung kann darüber hinaus das gesamte Verfahren zur Produktion von rekombinantem HSA, einschließlich der Schritte von der Kultivierung der Zellen bis zur Reinigung, in einem geschlossenen System durchgeführt werden, was die Vorteile mit sich bringt, dass die Produktion von HSA automatisiert werden kann und dass hygienische Handhabung, die bei der Herstellung von HSA als ein Medikament wesentlich erforderlich ist, leicht durchgeführt werden kann.

[0109] Daher ist das Verfahren der vorliegenden Erfindung als ein Verfahren zur Reinigung von rHSA sehr nützlich, denn es ermöglicht nicht nur, die Behandlungszeit zu verkürzen und den Ertrag zu steigern, sondern auch die Qualität des Produktes zu verbessern.

[0110] Zusätzlich ermöglicht es die vorliegende Erfindung, rHSA bereit zu stellen, das keine Verunreinigungen enthält, die auf den produzierenden Wirtsorganismus oder dergleichen zurück zu führen sind, und das ausreichend unterdrückte Färbung zeigt, um als ein Medikament verwendet werden zu können.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Reinigung von rekombinantem menschlichem Serumalbumin, umfassend das Erhitzen eines Kulturmediums, welches das Albumin und rekombinantes menschliches Serumalbumin herstellende Wirtszellen enthält, wobei das Erhitzen bei 50 bis 100°C für 1 Minute bis 10 Stunden durchgeführt wird, Inkontaktbringen der erhitzten Lösung mit Adsorbensteilchen, die in einem Fließbett suspendiert sind, unter Bedingungen zum selektiven Adsorbieren des Albumins und Gewinnen der adsorbierten Fraktion.

2. Verfahren zur Reinigung von rekombinantem menschlichem Serumalbumin nach Anspruch 1, umfassend das Erhitzen eines Kulturmediums, welches das Albumin und rekombinantes menschliches Serumalbumin herstellende Wirtszellen enthält, Zuführen der erhitzten Lösung nach oben in ein Fließbett, in dem die Adsorbensteilchen suspendiert sind, um Inkontaktbringen der erhitzten Lösung mit den Adsorbensteilchen unter Bedingungen zum selektiven Adsorbieren des Albumins zu bewirken, anschließend Umkehren der Fließrichtung und Zuführen eines Puffers nach unten, um die adsorbierte Fraktion zu eluieren und zu gewinnen.

3. Verfahren zur Reinigung von rekombinantem menschlichem Serumalbumin nach Anspruch 2, wobei die erhitzte Lösung mit den Adsorbensteilchen bei einem pH-Wert von 3 bis 5 in Kontakt gebracht wird.

4. Verfahren zur Reinigung von rekombinantem menschlichem Serumalbumin nach Anspruch 3, wobei die erhitzte Lösung mit den Adsorbensteilchen in einer Atmosphäre einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,1 bis 50 mS in Kontakt gebracht wird.

5. Verfahren zur Reinigung von rekombinantem menschlichem Serumalbumin nach Anspruch 4, wobei die Adsorbensteilchen eine starke Kationenaustausch-Gruppe besitzen.

6. Verfahren zur Reinigung von rekombinantem menschlichem Serumalbumin, wobei eine adsorbierte Fraktion, die menschliches Serumalbumin enthält, welche durch ein Reinigungsverfahren nach Anspruch 1 oder 2 gewonnen wurde, weiterhin mindestens einer Reinigungsbehandlung unterzogen wird, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus hydrophober Chromatographie, Anionenaustauscher-Behandlung, Chelatharz-Behandlung, Borsäure-/Borat-Behandlung und Ultrafiltrationsmembran-Behandlung.

7. Verfahren zur Reinigung von rekombinantem menschlichem Serumalbumin, wobei eine adsorbierte

Fraktion, die menschliches Serumalbumin enthält, welche durch ein Reinigungsverfahren nach Anspruch 1 oder 2 gewonnen wurde, in Anwesenheit eines Reduktionsmittels erhitzt wird und anschließend mindestens einer Reinigungsbehandlung unterzogen wird, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus hydrophober Chromatographie, Anionenaustauscher-Behandlung, Chelatharz-Behandlung, Borsäure-/Borat-Behandlung und Utrafiltrationsmembran-Behandlung.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

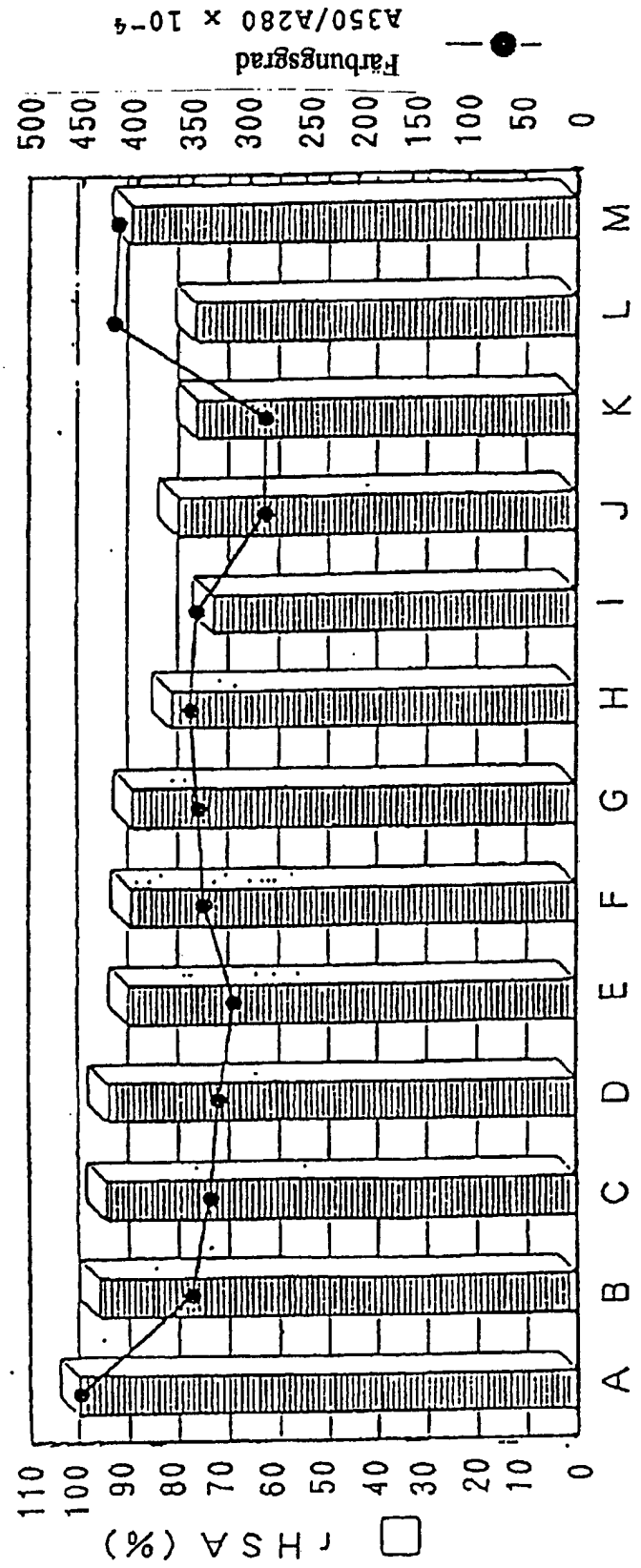

Fig. 2

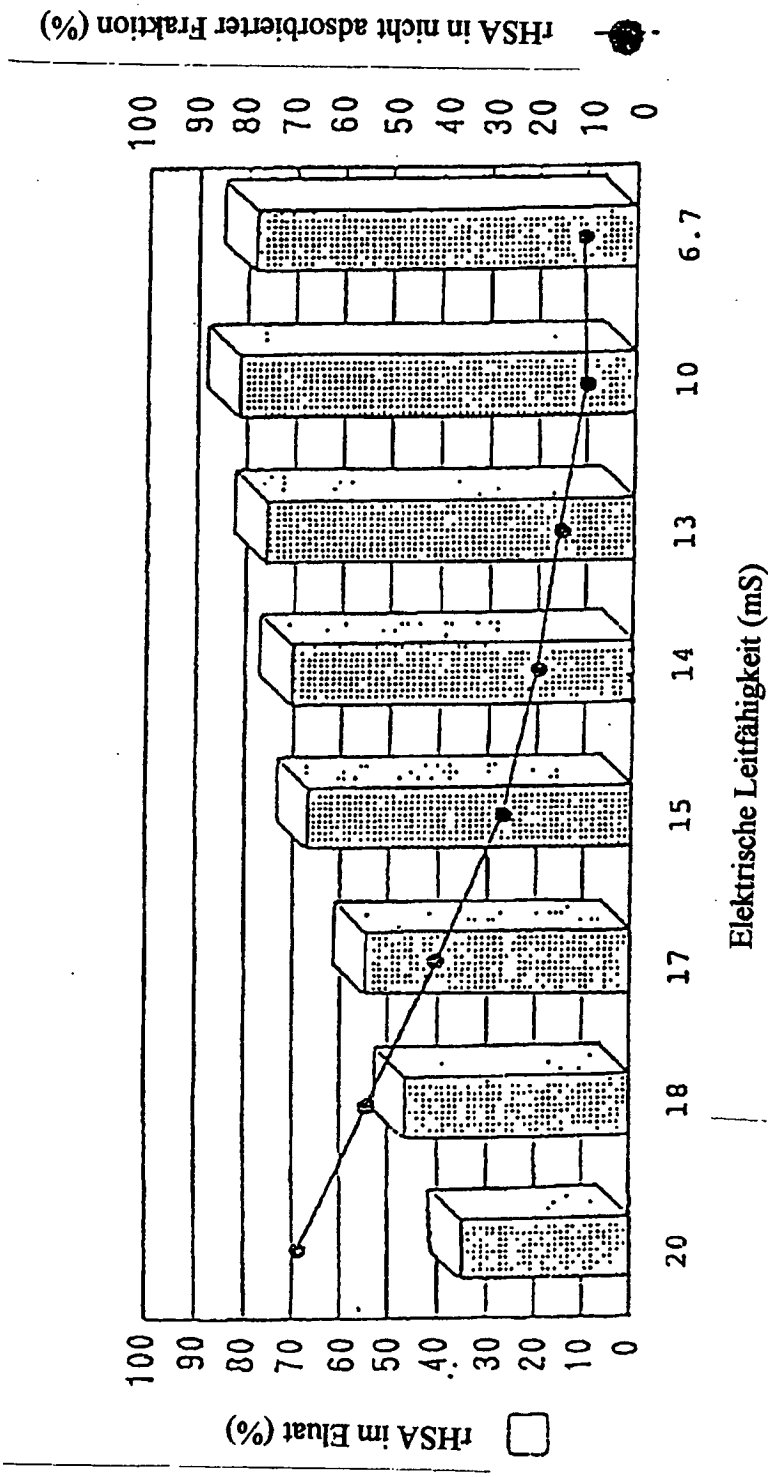
rHSA in nicht adsorbierter Fraktion (%)
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
6.7
10
13
14
15
17
18
20
Elektrische Leitfähigkeit (mS)
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
rHSA im Eluat (%)

Fig. 3

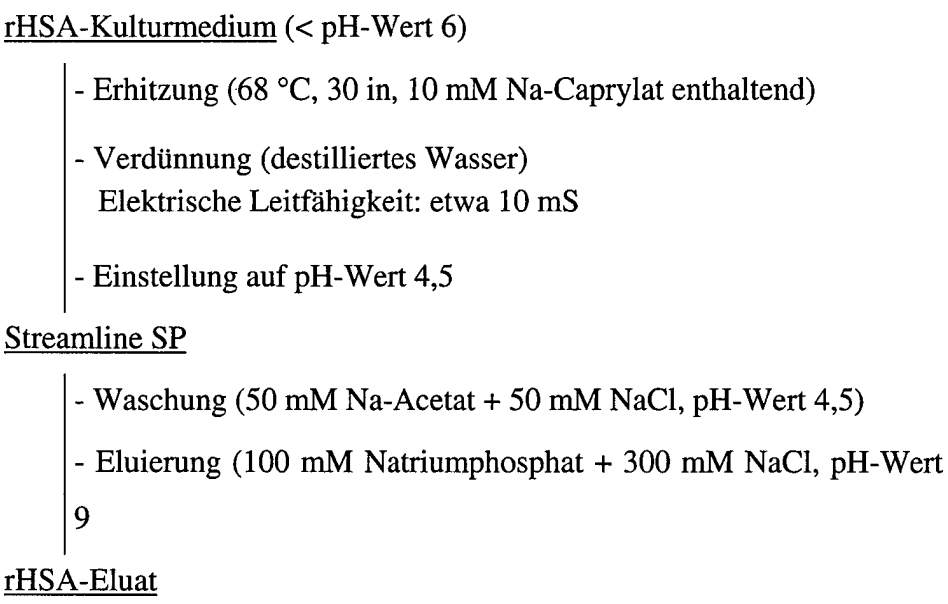
rHSA-Kulturmedium (< pH-Wert 6)
- Erhitzung (68 °C, 30 in, 10 mM Na-Caprylat enthaltend)
- Verdünnung (destilliertes Wasser)
Elektrische Leitfähigkeit: etwa 10 mS
- Einstellung auf pH-Wert 4,5
Streamline SP
- Waschung (50 mM Na-Acetat + 50 mM NaCl, pH-Wert 4,5)
- Eluierung (100 mM Natriumphosphat + 300 mM NaCl, pH-Wert 9
rHSA-Eluat

Fig. 4

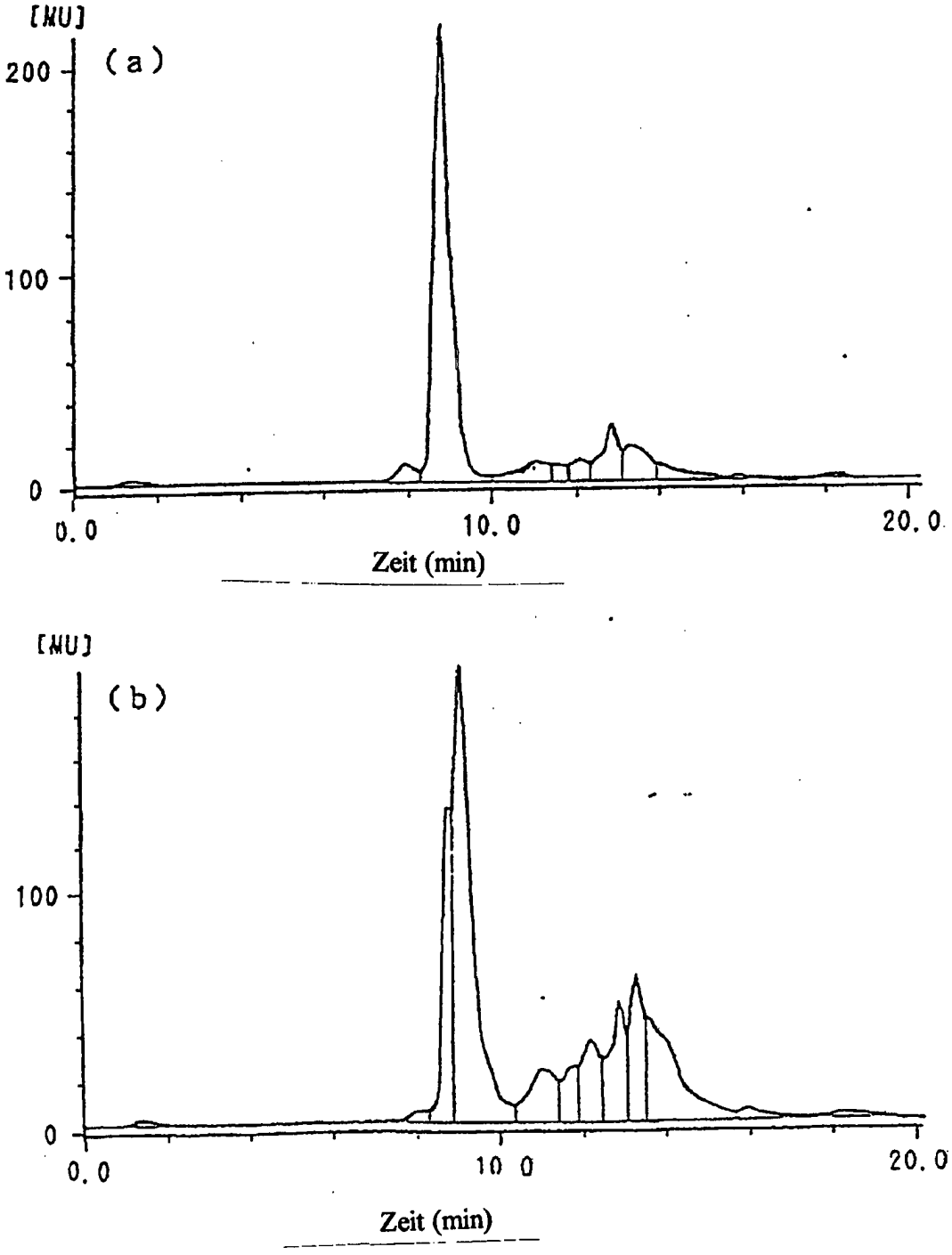

Fig. 5

Verfahren der Erfindung	Absorption (A350/A280)		Absorption (A350/A280)	Herkömmliches Verfahren
↓ Kulturmedium	0.0475		0.0475	↓ Kulturmedium
			0.0639	↓ Pressung
			0.0601	↓ 1. Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran
↓ Erhitzung (68 °C, 30 min)	0.0291		0.0353	↓ Cystein HT (60 °C, 1 h)
↓ Streamline SP	0.0311		0.0332	↓ 2. Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran
↓ Cystein HT (60 °C, 1 h)	0.0212		0.0385	↓ Behandlung mit Kationen-Austauscher
↓ hydrophobe Chromatographie	0.0197	----	0.0390	↓ hydrophobe Chromatographie
↓ Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran	0.0205	----	0.0317	↓ Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran
↓ DEAE-Chromatographie	0.0128	----	0.0178	↓ DEAE-Chromatographie
↓ Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran	0.0140	----	0.0204	↓ Behandlung mit Ultrafiltrationsmembran

Fig. 6

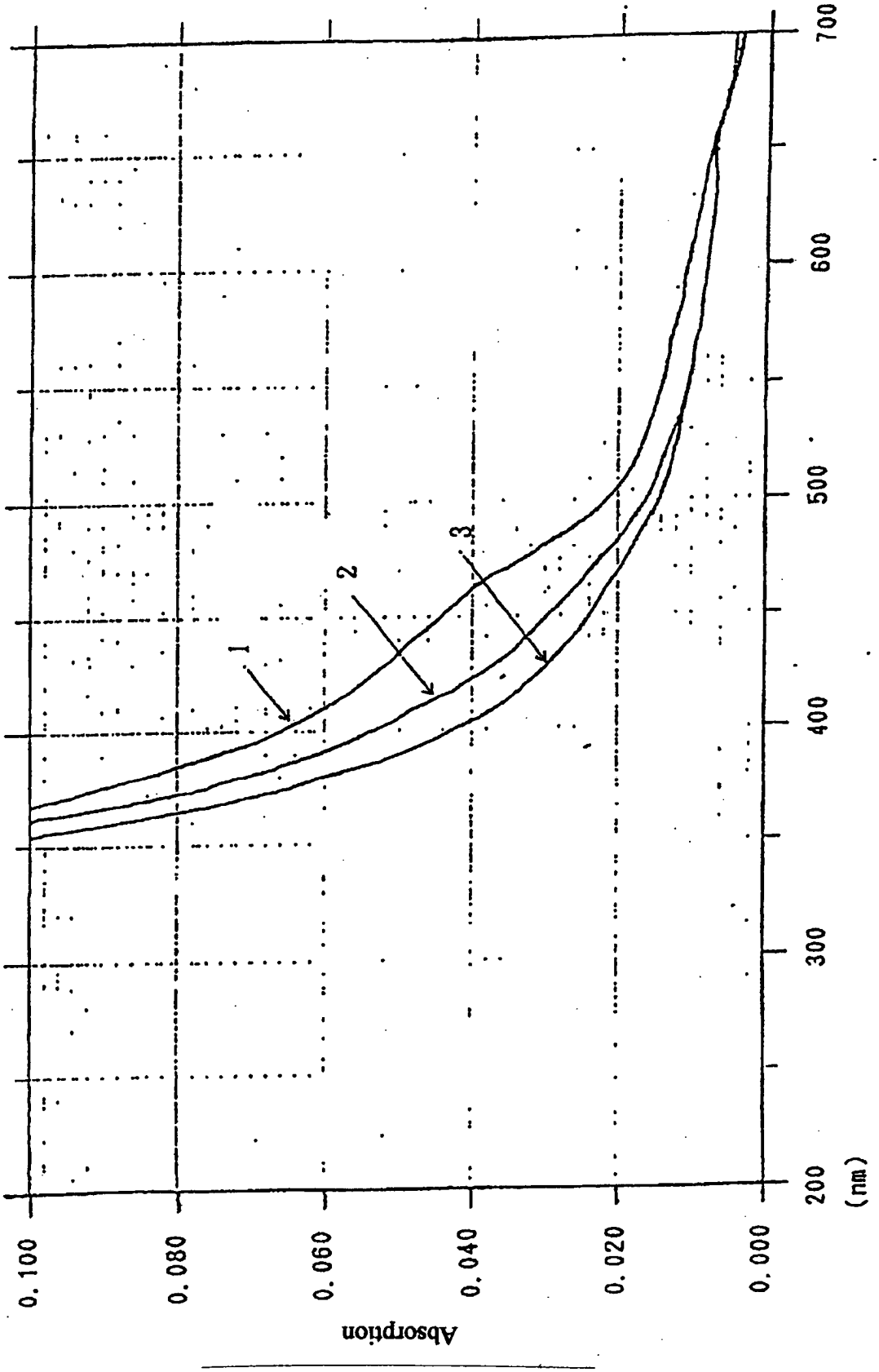
Absorption
0.100
0.080
0.060
0.040
0.020
0.000
200
300
400
500
600
700
(nm)
1
2
3

Fig. 7

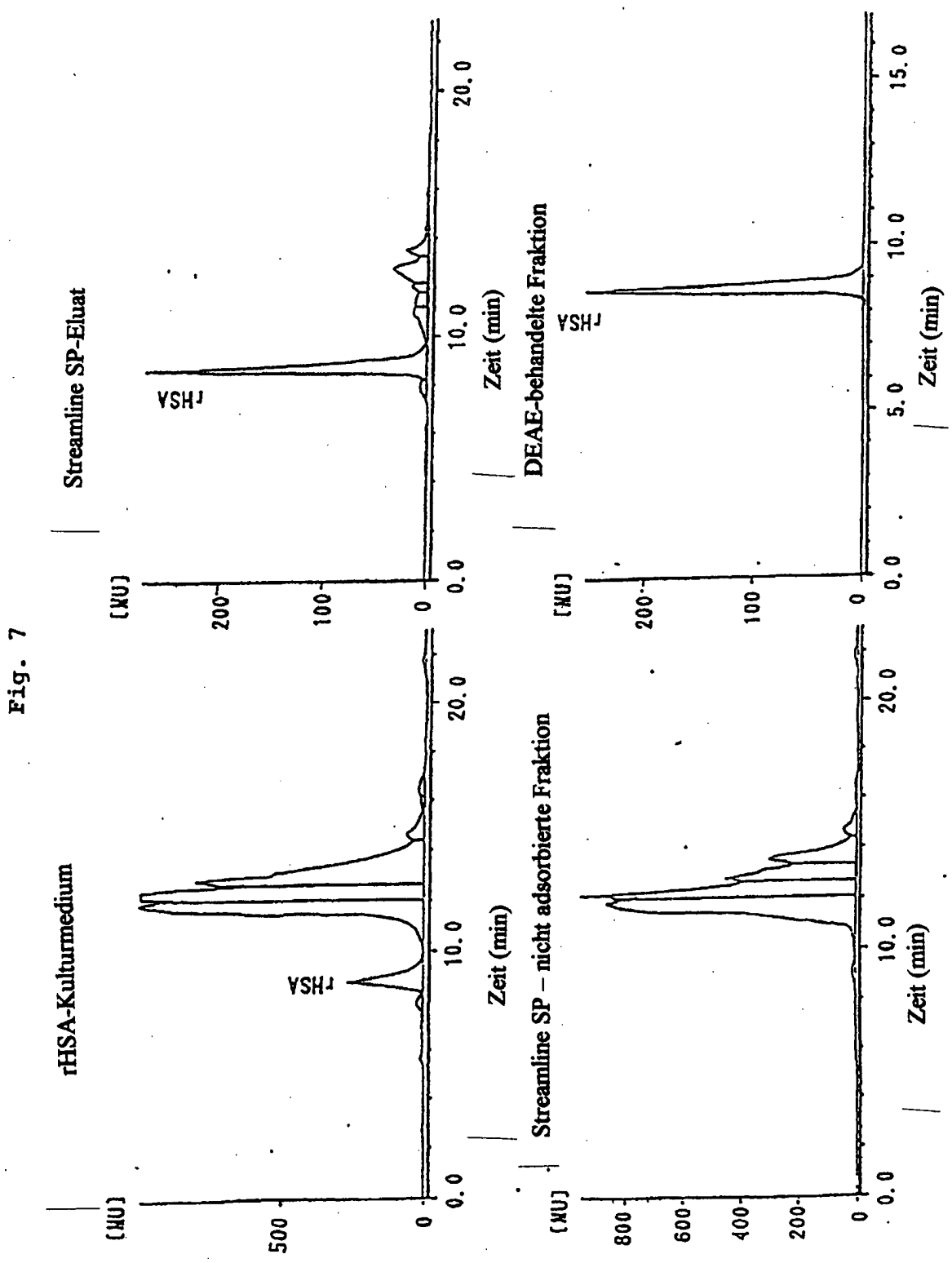
Fig. 7
rHSA-Kulturmedium
Streamline SP-Eluat
Streamline SP – nicht adsorbierte Fraktion
DEAE-behandelte Fraktion
rHSA
[MU]
Zeit (min)
0
100
200
500
600
800
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0