



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102015094 B

(45)授权公告日 2016.11.09

(21)申请号 200980114972.0

(22)申请日 2009.04.21

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102015094 A

(43)申请公布日 2011.04.13

(30)优先权数据

0800923-5 2008.04.22 SE

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2010.10.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/SE2009/050406 2009.04.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02009/131526 EN 2009.10.29

(73)专利权人 通用电气医疗集团生物工艺研发
股份公司

地址 瑞典乌普萨拉

(72)发明人 J·伯格斯特伦 G·格拉德

B-L·约翰逊 J-L·马洛伊塞尔

N·诺尔曼 T·E·塞德曼

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 李进 林毅斌

(51)Int.Cl.

G01N 30/00(2006.01)

(56)对比文件

US 6531523 B1,2003.03.11,说明书第1-2

段.

US 6531523 B1,2003.03.11,说明书第1,2

段.

CN 1528511 A,2004.09.15,发明内容部分.

CN 101035439 A,2007.09.21,发明内容.

审查员 刘亚娟

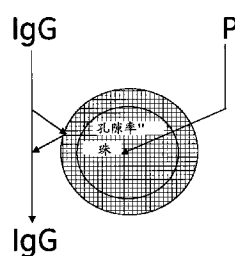
权利要求书2页 说明书13页 附图1页

(54)发明名称

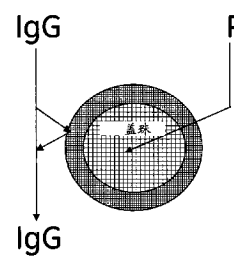
层析介质

(57)摘要

本发明涉及层析法领域。更精确地,本发明涉及一种新型层析介质,即,一种提供有不同的盖的疏水性介质,由于疏水性介质的孔隙率和/或盖的孔隙率,排除超过一定尺寸的分子。本发明还涉及使用所述分离介质来纯化不进入分离介质的大分子以及进入分离介质并从中洗脱的小分子。



基于琼脂糖 20 Fast Flow 的
OH-盖原型和旋转式圆盘介质



基于琼脂糖 6 Fast Flow
的葡聚糖盖介质

1. 分离介质,所述分离介质包含
被烃疏水性相互作用配体官能化的多孔性疏水性核心实体;和
覆盖所述核心实体的整个外部的多孔性亲水性盖,其中所述盖由琼脂糖制成、不含配体,并且仅允许低于一定尺寸的分子/有机体/颗粒渗透核心实体的内部并与之相互作用,且
其中所述疏水性核心实体由琼脂糖构成,为高度疏水性的,并且包含辛基胺配体,其中配体密度值大于 $90\mu\text{mol}/\text{ml}$ 核心实体,以便独立于样品的性质和运行条件结合蛋白质和其他的疏水性的分子/有机体/颗粒。
2. 权利要求1的分离介质,其中所述疏水性核心实体仅允许低于一定尺寸的分子/有机体/颗粒渗透核心实体的内部并与之相互作用。
3. 权利要求1的分离介质,其中在 $0-1\text{M}$ 的低离子强度下、在 $2-11$ 的pH范围内,所述疏水性核心实体允许吸附低于 $60\ 000\text{D}$ 分子量的分子/有机体/颗粒。
4. 权利要求1的分离介质,其中所述核心实体除了所述疏水性配体以外还包含其他配体,所述其他配体可位于所述核心实体上和/或与所述核心实体相关和/或位于所述疏水性配体上。
5. 权利要求4的分离介质,其中所述其他配体为静电相互作用配体。
6. 权利要求1的分离介质,其中所述核心实体的孔径防止超过一定尺寸的分子/有机体/颗粒进入所述孔。
7. 权利要求1的分离介质,其中在盖中提供水凝胶以填充所述孔,从而进一步降低和调节孔径,以防止高分子量分子/有机体/颗粒进入所述孔。
8. 权利要求1的分离介质,其中将磁性颗粒掺入到所述核心实体中。
9. 权利要求1的分离介质,其中所述盖和/或核心实体通过层活化进行官能化。
10. 权利要求1的分离介质,所述分离介质与层析介质混合,其中所述分离介质占总介质体积最高达 10% 。
11. 权利要求10的分离介质,所述层析介质为阳离子交换介质。
12. 权利要求1的分离介质,其中所述盖仅允许小于 $60\ 000\text{D}$ 的小分子或者颗粒渗透核心实体的内部并与之相互作用。
13. 一种分离方法,所述方法包括在 $0-1\text{M}$ 的低离子强度下、在pH $2-11$ 下,将来自样品的低于一定尺寸的分子/有机体/颗粒吸附到权利要求1的分离介质上的步骤。
14. 权利要求13的分离方法,其中所述一定尺寸相应于由选自以下的分子/有机体/颗粒表示的尺寸范围:细胞、细菌、病毒、质粒、抗体、脂类、蛋白质、肽或核酸。
15. 权利要求13的分离方法,其中所述一定尺寸相应于由选自以下的分子/有机体/颗粒表示的尺寸范围:细胞颗粒、病毒样颗粒。
16. 权利要求13的分离方法,其中所述分子/有机体/颗粒为小于 $60\ 000\text{D}$ 的小分子或颗粒。
17. 权利要求13的分离方法,其中所述分子/有机体/颗粒为小于 $1\ 000\ \text{kD}$ 的分子或颗粒。
18. 权利要求13的分离方法,其中所述分子/有机体/颗粒为不被吸附在分离介质上而是在流通物中得到的大分子/有机体/颗粒。

19. 权利要求18的分离方法, 其中所述大分子/有机体/颗粒为细胞、细菌、病毒、质粒、抗体或蛋白质。

20. 权利要求18的分离方法, 其中所述大分子/有机体/颗粒为细胞颗粒或病毒样颗粒。

21. 权利要求13的分离方法, 其中所述分子/有机体/颗粒为被吸附在盖上的大分子/有机体/颗粒。

22. 权利要求21的分离方法, 其中所述大分子/有机体/颗粒为细胞、细菌、病毒、质粒、抗体或蛋白质。

23. 权利要求21的分离方法, 其中所述大分子/有机体/颗粒为细胞颗粒或病毒样颗粒。

层析介质

发明领域

[0001] 本发明涉及层析法领域。更精确地,本发明涉及一种新型层析介质,即,一种提供有不同的盖的疏水性介质,由于疏水性介质的孔隙率和/或盖的孔隙率,排除超过一定尺寸的分子。

[0002] 在生物技术中,迄今为止提出的层析法基于与目标的相互作用的不同的模式。因此,例如,在离子交换层析法中,官能团为与其相反电荷的反荷离子永久结合的离子基团,而在疏水性相互作用层析法(HIC)中,固定相与待分离的组分之间的相互作用基于疏水性。

[0003] 基于疏水性相互作用的层析法通常分为命名为HIC和RPC的两种类型。

[0004] HIC是指使用非常亲水性的基质的蛋白质的疏水性相互作用层析法,其中疏水性配体与蛋白质的固定化程度非常低,以避免已分离的蛋白质变性。为了吸附待分离的蛋白质,需要在水中使用高浓度的无机盐。通常通过在洗脱步骤中逐步降低离子强度来实现解吸。

[0005] RPC是指使用与疏水性非极性分子/配体(通常为包含4-18个碳原子的脂族碳链)官能化程度非常高的基质(通常基于二氧化硅)的层析法。通常无需加入盐可实现吸附。最常通过逐步增加在洗脱溶液中有有机溶剂的含量来进行解吸或洗脱。

[0006] 含有18个碳链的RPC介质与蛋白质牢固结合。在结合过程中蛋白质也有不同程度的变性。为了洗脱蛋白质,需要使用特别的条件。但是,具有较短链(4个碳)的RPC介质可与包含添加剂(例如三氟乙酸)的基于水/乙腈的洗脱液一起使用,用于蛋白质分离。

[0007] 固定相(也称为分离基质)包含载体和与载体偶联的配体,所述载体通常为许多基本上为球形的颗粒。在大多数分离基质中,载体具有多孔性,以在每个颗粒中允许较大量的配体,因此具有更多结合的目标化合物。载体最通常为天然或合成的聚合物,并且可采用多种不同的方式来生产球形颗粒。也使用二氧化硅和玻璃珠。常用于该目的的天然聚合物为多糖葡聚糖和琼脂糖。

[0008] 对于通过层析和分批法分离生物分子,基质(珠、整料、填充膜,等等)的孔隙率非常重要。聚合物介质的优点在于容易在宽范围内改变孔径大小及其高化学稳定性,例如对高pH值的耐受性。在所有文献中可接受的总的原则是对于大分子使用具有大孔径的介质。在这些孔中的传质是由于扩散过程而不是对流。

[0009] 在共同待审的SE 0800263-6申请中,描述了一种基于旋转式圆盘技术的方法(Walter和Prewett, Walton, W.H.; Prewett, W.C. (1949) Proc. Phys. Soc. B. 62, 341-350)来生产具有所选孔隙率的琼脂糖珠来排除大分子。

[0010] 人源化单克隆抗体(mAb)非常有希望作为生物药物。在纯化mAb中所面临的最大的挑战之一为在细胞培养基中将其与宿主细胞蛋白质(HCP)分离。当今可使用多种mAb分离技术,包括在蛋白质A上的亲和层析法、离子交换层析法和疏水性相互作用层析法(HIC)。所有这些技术涉及使用流动相(吸附缓冲液),必须调节该流动相以实现mAb-分子与配体之间的相互作用。例如,在HIC中,必须向流动相中加入大量的盐,并且在离子交换层析法的情况下,必须调节流动相的pH,使得与离子交换配体相比, mAb带相反的电荷。此外,当mAb被配体

吸附时,必须调节流动相以实现mAb的解吸。

[0011] 期望得到一种层析介质,该层析介质的孔径分布和表面性能可防止大分子(例如mAb)进入珠,并且在内部可吸附蛋白质和其他肽或生物分子,而与缓冲液条件无关。用于分离生物分子的离子交换剂在低离子强度下能吸附大多数带电荷的生物分子,但是当离子强度提高至超过一定水平时,这些介质失去吸附样品分子的能力。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供了一种介质,该介质在核心实体中具有高疏水性,使得在非常低离子强度和非常高离子强度下、在宽pH范围内,蛋白质均可相互作用或被吸附。

[0014] 第一方面,本发明涉及一种分离介质,所述分离介质包含多孔性疏水性核心实体;和覆盖所述核心实体的整个外部的多孔性亲水性盖,其中所述盖仅允许低于一定尺寸的分

子渗透分离介质的核心实体的内部并与之相互作用。

[0015] 在一个优选的实施方案中,还优选所述疏水性核心实体仅允许低于一定尺寸的分

子渗透分离介质的核心实体的内部并与之相互作用。

[0016] 所述多孔性亲水性盖为围绕所述核心实体的多孔性外层或夹套/壳。

[0017] 所述分离介质优选提供有高度疏水性核心,以便结合蛋白质和其他疏水性分子,而与样品的特性和运行条件无关,运行条件例如在层析法的情况下,为离子强度和pH,或者在分批法的情况下为上清液。所述分离介质优选为珠形状,但是也可为膜。

[0018] 介质的尺寸排阻特性由其多孔性成分之一或两者的孔隙率决定。以上所指的一定尺寸低于排除以下目标分子/有机体/颗粒的尺寸:例如细胞、细胞颗粒、病毒、病毒样颗粒、质粒、任何类型的抗体、脂类、蛋白质、肽和核酸。该介质将小尺寸分子与上述类型的较大的分子有效分离。

[0019] 所述疏水性核心实体本身可为疏水性的,且可基于疏水性聚合物。例如,苯乙烯/乙基苯乙烯/DVB、包含疏水性取代基的乙烯基醚和丙烯酸酯以及含氟烷烃的聚合物。

[0020] 或者,所述疏水性核心实体本身为亲水性的,且基于被疏水性相互作用配体官能化的亲水性聚合物。所述疏水性相互作用配体可包含脂族烃(例如C₁-C₃₀烷基,优选C₄-C₁₆烷基)和/或芳族烃(例如苯基、蒽(anthracene)、萘(naphtalene))。与配体无关,配体密度应总是优化的,以便在低离子强度下吸附并且目的是得到所需的介质高度疏水性性质。优选,配体密度应超过标准HIC-水平,即,>90μmol/ml核心实体。

[0021] 疏水性核心实体允许吸附样品中的分子(具有最低分子量和/或最小尺寸),该分子在低离子强度例如0-1M,优选0-0.4M,最优选0-0.1M下和在pH间隔2-11下能渗透盖。

[0022] 在一个实施方案中,所述核心实体除了所述疏水性配体以外还包含其他配体,所述其他配体可位于所述核心实体上和/或与所述核心实体相关和/或位于所述疏水性配体上。所述其他配体可为疏水性的,且可包含非主要带电荷的基团。优选,所述其他配体为静电相互作用配体,即,带正电荷和/或带负电荷的配体。例如,这些其他配体可为带有正电荷的辛基胺配体,提高了小的带负电荷的分子与核心实体的结合。应调节另外加入的带电荷的配体的量,使得它们对与主要的疏水性配体的疏水性相互作用的影响不太大。

[0023] 在一个优选的实施方案中,所述核心实体和盖由琼脂糖制成,并且所述疏水性配体为包含4-16个碳原子的烃配体,优选辛基配体。

[0024] 优选,核心实体的孔径防止超过一定尺寸的分子进入所述孔。或者,或者除此以

外,在盖中提供聚合物水凝胶(例如葡聚糖)以填充所述孔,从而进一步降低和调节孔径,以防止高分子量分子进入所述孔。

[0025] 在再一个实施方案中,所述亲水性盖包含任何类型的层析配体,该配体与样品内的具有最高分子量和/或最大尺寸的分子可逆结合。一些小分子可能也与盖结合,但是在洗脱步骤过程中,这些小分子最可能渗透盖并与核结合。

[0026] 对于某些应用,例如蛋白质组分析,可将磁性颗粒掺入到分离介质的核心实体。

[0027] 本发明还涉及一种分离介质,该分离介质包含上述盖珠介质与常规层析介质(例如HIC、IE或亲和介质)的混合物。优选所述盖珠介质占总介质体积的最高达10%。在该混合介质的一个优选的实施方案中,所述盖珠介质包含辛基配体,并且所述层析介质包含阳离子交换介质。该混合介质的益处在于提高大分子与小分子之间的分辨率。

[0028] 在第二方面,本发明涉及在低离子强度下、在pH为2-11下,使用上述分离介质来从样品中吸附低于一定尺寸的分子,优选在一个单一步骤中进行。所述方法可用于纯化超过或低于所述尺寸的分子。因此,该方面涉及使用所述分离介质的方法,所述方法包括吸附分子的步骤和任选的一个或多个其他步骤。

[0029] 在具体的应用中,以上所指的孔径随着目标分子的尺寸而变,并且由目标分子的尺寸决定。优选该一定尺寸范围相应于选自以下的分子/有机体/颗粒的尺寸范围:细胞、细胞颗粒、细菌、病毒、病毒样颗粒、质粒、抗体、脂类、蛋白质、肽、核酸。所述样品可例如为培养上清液,并且所述高分子量分子可为单克隆抗体。所述分离介质在细胞收获时加入非常有用,用于快速除去不期望的酶,如蛋白酶、肽酶和核酸酶,例如胰蛋白酶、糜蛋白酶、DNase和RNase。所述分离介质可用于层析模式或分批模式。可使用任何柱或分批形式。对于某些应用,例如对于临床I期和II期研究的生物药物的纯化,在RTP(准备加工)形式中优选一次性柱。

[0030] 在一个备用实施方案中,被吸附的低分子量例如低于60000D的分子可为期望的分子,例如生物标记或药物标记,例如通过降低洗脱液的极性,将其从核心实体中洗脱,并进一步分析。另一个实例为将目标分子吸附在核心实体中,但不用于进一步分析,例如用于脂类去除。

[0031] 当所述目标分子为大分子/有机体/颗粒时,例如细胞、细胞颗粒、细菌、病毒、病毒样颗粒、质粒、抗体、蛋白质,目标分子可在流通物中得到,因此,不被介质吸附。

[0032] 或者,所述目标分子为大分子/有机体/颗粒,例如细胞、细胞颗粒、细菌、病毒、病毒样颗粒、质粒、抗体、蛋白质,它们被吸附在盖上。所述目标分子随后通过适于所选吸收模式(例如离子交换:盐和/或pH梯度,IMAC:咪唑梯度,硼酸盐:糖或pH梯度,HIC:降低盐浓度)的技术来洗脱。

[0033] 本发明的分离介质的优选用途为纯化单克隆抗体。另一个优选用途为其中所述目标分子为小于1000kD的分子或颗粒。该实施方案适用于纯化病毒,例如流感病毒,但是也适用于其他大分子,例如IgM抗体。

[0034] 附图概述

[0035] 图1说明经测试的三种不同的珠设计。1A:琼脂糖20 Fast Flow(20%琼脂糖颗粒)和旋转式圆盘,1B:盖-葡聚糖琼脂糖6 Fast Flow。IgG=单克隆抗体;P=分子量小于约70000的蛋白质。

[0036] 发明详述

[0037] 本发明涉及一种层析介质,该层析介质在基质中具有亲水性和疏水性区域两者,并且可基于本身为疏水性的基质,或者基于含有疏水性配体的亲水性基质,并且提供有亲水性外层。所述介质还可基于被疏水性配体(例如珠中的疏水性内核)内部官能化的亲水性基质。

[0038] 合成路径的实例

[0039] ●本身疏水性原料,例如覆盖有亲水性和多孔性层的DVB珠。

[0040] ●本身亲水性原料,其被疏水性官能团完全官能化,并且随后覆盖有亲水性和多孔性层。将亲水性基质层活化并与疏水性配体内部偶联(图1)。

[0041] ●将疏水性基质层活化,并且使外部亲水性官能化。

[0042] 本发明还提供了一种从液体的其他组分中分离大分子量分子例如抗体的方法,比起现有技术的方法,所述方法需要较少的时间和加工步骤。这通过以下方法来实现,其中使包含所需高分子量分子(例如抗体)的液体与层析介质接触,并且在非结合模式或可逆结合模式中回收基本上纯的高分子量分子。另一个优点在于即使在非常低的离子强度下,低分子量分子例如宿主细胞蛋白质也被吸附于介质的内部。

[0043] 层析介质的载体基质和核心实体可基于有机材料或无机材料。优选为有机聚合物形式,其不溶于水,但是在水中或多或少可溶胀。合适的聚合物为多羟基聚合物,例如基于多糖,如琼脂糖、葡聚糖、纤维素、淀粉、支链淀粉,等等;和完全合成的聚合物,如聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚(羟烷基乙烯基醚)、聚(羟烷基丙烯酸酯)和聚甲基丙烯酸酯(例如聚缩水甘油甲基丙烯酸酯);聚乙烯醇和基于苯乙烯和二乙烯基苯的聚合物;以及其中包括两种或更多种相应于上述聚合物的单体的共聚物。例如通过交联和通过吸附或共价结合与不溶性物体偶联,可使可溶于水中的聚合物衍生化为不溶性的。通过具有可转化为OH的基团的单体的接枝聚合,或例如通过结合或吸附合适的化合物(例如亲水性聚合物和其他亲水性化合物)使最终的聚合物亲水化,可将亲水性基团引入到疏水性聚合物(例如单乙烯基苯和二乙烯基苯的共聚物)上。可使用包括环氧化物或反应性卤化物的反应。

[0044] 可用于载体基质的合适的无机材料为二氧化硅、玻璃、氧化锆、石墨、氧化钽,等等。

[0045] 优选的载体基质不含对水解不稳定的基团,例如硅烷醇、酯、酰胺基以及因此存在于二氧化硅中的基团。

[0046] 在本发明的一个特别感兴趣的实施方案中,载体基质为不规则或球形颗粒形式,对于高性能应用,其尺寸范围为1-1000 μm ,优选5-50 μm ,对于制备目的,其尺寸范围为50-300 μm 。

[0047] 载体基质的一种感兴趣的形式具有高于或低于液体样品或待使用的缓冲液溶液(例如发酵物料)的密度。这种基质特别适用于用于流化床或膨胀床层析法以及不同的分批法(例如在搅拌的罐中)的大规模操作。流化床和膨胀床法描述于WO 92/18237和WO 92/00799。这些基质最实用的用途为将密度比流化液体的密度高的颗粒/珠与上向流组合。在样品溶液包含颗粒和粘性材料的情况下,这种采用膨胀床模式的载体基质特别有益。

[0048] 术语“亲水性载体基质”在实践中是指基质可接近的表面为亲水性的且对蛋白质友好,即,该表面不会不可逆的吸附蛋白质和使蛋白质变性。通常在亲水性基础基质上的可

接近的表面暴露多个极性基团,例如包含氧和/或氮原子的基团。这种极性基团的实例为羟基、氨基、羧基、磺酸酯(S和SP配体)、低级烷基的醚(例如 $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_n\text{H}$,其中n为2、3、4和更大的整数)。

[0049] 亲水性表面涂层(可能为亲水性增量剂形式)在概念上属于载体基质。

[0050] 在普通的/公认的HIC介质中,需要通过向流动相中加入盐以提高极性来实现蛋白质的结合。随后通过降低盐的浓度,从基质中释放已结合的蛋白质。因此,该方法的缺点在于需要向原料中加入盐,因为这样可能引起问题,并因此增加大规模使用者的成本。通常在盐浓度为0.75-4M之间将蛋白质吸附至普通HIC-介质(Jansson, J.-C.和Rydén, L., Protein Purification-Principles, High Resolution Methods and Applications(蛋白质纯化—原理、高分辨率方法及应用), VCH, Weinheim, 第220-221页)。

[0051] 本发明涉及一种介质,该介质在MAb纯化过程中,使得与小足以渗透至分离基质的疏水性核中的分子(例如HCP)的相互作用最大,并且与样品中的最大的蛋白质(例如MAb-分子和MAb-二聚体)的相互作用最小。此外,本发明的一个实施方案能够使用不额外加入盐的流动相,并且对于含有中性或几乎中性盖(非结合盖)的实施方案,无需洗脱缓冲液(解吸缓冲液)来回收期望的高分子量分子或有机体。测试了针对宿主细胞蛋白质而不是大的单克隆抗体捕获的珠设计的三种不同的方法。在一种方法中,设计基于高含量琼脂糖(20%)的琼脂糖珠来得到一种珠,该珠具有排除大蛋白质(单克隆抗体)的孔隙率(图1A)。在再一种方法中,生产基于琼脂糖6 Fast Flow和凝胶过滤盖的原型。通过使葡聚糖与珠的外区段偶联得到盖。设计在葡聚糖填充的区段中得到的孔径,以防止大分子例如mAb进入珠的核中(图1B)。第三种方法基于旋转式圆盘介质,该介质描述于共同待审的SE专利申请0800263-6。在这种情况下,还设计通过引入中性外区段来排除大蛋白质的珠(图1A),所述中性外区段通过由共同拥有的层活化专利EP 0966 488 B1(Process for introducing a functionality(引入官能团的方法))所描述的方法获得。

[0052] 在疏水性配体与不同的原型连接的过程中,使用一种合成方法来防止配体与珠的表面偶联,并且,采用这种方式,由于单克隆抗体与珠外部的疏水性相互作用而消除吸附。命名为盖-OH核-辛基介质的原型是指辛基配体仅在珠的核中连接。此外,调节珠的核中配体的量,使用具有非常低离子强度的吸附缓冲液,使得宿主细胞蛋白质被吸附,将离子强度调节至与生物分子的层析法相关的任何pH值。

[0053] 实验部分

[0054] 本文提供的这些实施例仅用于举例说明的目的,不应看做是限制由所附权利要求所限定的本发明。

[0055] 实施例1:基于琼脂糖20 Fast Flow(A)、琼脂糖6 Fast Flow(B)和旋转式圆盘介质(C)的辛基介质的制备

[0056] 基质的体积是指澄清床体积,基质的重量是指抽吸干重,并用克给出。对于大规模反应,由于使用磁力棒搅拌器促使破坏珠,因此搅拌是指悬浮的马达驱动的搅拌器。在封闭的小瓶中进行小规模反应(最高达20ml凝胶),并且搅拌是指使用振荡工作台。

[0057] 使用常规方法来分析官能团和确定烯丙基化、环氧化的程度、或者离子交换剂基团在珠上的取代程度。

[0058] A:盖-OH核-辛基琼脂糖20 Fast Flow的制备

[0059] A1:琼脂糖20 Fast Flow的制备

[0060] 通过于95℃下加热约10小时,将琼脂糖(50g)溶解于水(250g)中。在乳化容器中,将该溶液加入到甲苯(375ml)和乙基纤维素(35g)中,温度保持在70℃。该乳化容器配备有浆式搅拌器。将搅拌器的速度从150rpm逐步增至340rpm,温度保持在70℃。当通过显微镜判断琼脂糖颗粒具有所需尺寸时,将速度降至150rpm。随后将乳液冷却,让珠形成凝胶。用乙醇和水洗涤珠。

[0061] 将水加入到250ml珠中,至总重量为310g。向该悬浮液中加入38g Na_2SO_4 、3.0ml 50% NaOH 和0.25g NaBH_4 ,将温度升至47℃。随后在6小时期间,用泵加入表氯醇(31.4ml)和氢氧化钠溶液(21.6ml)。加入完成后,于47℃下继续反应过夜。随后将浆料冷却,并使用60%乙酸中和至pH为5-6。最后,在玻璃滤器上用蒸馏水仔细洗涤凝胶。随后将珠在43 μm 和166 μm 布上筛分。

[0062] A2:OH-盖烯丙基琼脂糖20 Fast Flow的制备

[0063] 烯丙基活化的琼脂糖20 Fast Flow。将50g沥干的琼脂糖20 Fast Flow (Sephacrose™ 6 Fast Flow, GE Healthcare, Uppsala, Sweden)与15ml 50% NaOH 溶液、6g Na_2SO_4 和0.1g NaBH_4 混合。将混合物于50℃下搅拌1小时,接着加入30ml烯丙基缩水甘油基醚(AGE)。将反应浆料于50℃下搅拌17小时。随后在玻璃滤器上用蒸馏水、乙醇洗涤凝胶,最后再次用蒸馏水洗涤。

[0064] 部分溴化和 NaOH 处理(OH-盖的制备)。将10ml沥干的烯丙基化的琼脂糖20 Fast Flow在5ml蒸馏水和0.4g乙酸钠中搅拌。加入在加盖的小瓶中用10ml蒸馏水溶解的125 μl 溴,并继续搅拌5分钟。水洗后,将沥干的凝胶与7.5ml 2M NaOH 一起于50℃下搅拌18小时,接着水洗。通过滴定测得在珠的核中剩余的烯丙基含量为0.37mmol/ml。

[0065] A3:核偶联

[0066] 在珠的核中辛基的偶联。将4.5ml OH-盖琼脂糖20 Fast Flow(见上述)完全溴化并洗涤。将沥干的凝胶与1.25ml辛硫醇在4.5ml 2M NaOH 和1ml乙醇中的溶液混合,接着于50℃下搅拌16小时。用水、乙醇和水洗涤后,将凝胶储存在20%乙醇中。

[0067] B:盖-葡聚糖核-辛基琼脂糖6 Fast Flow的制备

[0068] B1:盖-葡聚糖烯丙基琼脂糖6 Fast Flow的制备

[0069] 琼脂糖6 Fast Flow的烯丙基化。根据以上所述将琼脂糖6 Fast Flow烯丙基化,通过滴定测得烯丙基含量为259 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 。

[0070] 部分溴化。将烯丙基化的琼脂糖6 Fast Flow(100ml)在烧瓶中称重,加入900ml蒸馏水和1.3g硫酸钠。随后在剧烈搅拌下,用移液管加入0.3当量溴(400 μl)。约5分钟(此时溴已消耗完)后,在玻璃滤器上用蒸馏水洗涤凝胶。

[0071] 葡聚糖偶联。将51ml部分溴化的凝胶转移至烧瓶,加入30g葡聚糖AB在125ml蒸馏水中的溶液。搅拌30分钟后,加入10g NaOH 和0.5g NaBH_4 ,将浆料加热至50℃,并搅拌过夜。约18小时后,使用乙酸(60%溶液)将pH调节至约7。随后在玻璃滤器上用蒸馏水洗涤凝胶。

[0072] B2:核偶联

[0073] 在珠的核中辛基的偶联。将10ml沥干的凝胶(与琼脂糖6 FastFlow偶联的葡聚糖,见上述)与蒸馏水一起放在烧杯中,并开始剧烈顶置式搅拌。加入溴,直至浆料剩余深橙色/黄色。搅拌10分钟后,加入甲酸钠(约1.5g),直至浆料完全褪色。随后在玻璃滤器上用蒸馏

水洗涤凝胶。将沥干的溴化的凝胶在烧瓶中称重,并加入10ml蒸馏水和2.3ml辛硫醇。随后使用NaOH(50%溶液)将pH调节至约12.5。随后将混合物于50℃下搅拌过夜。20小时后,用蒸馏水和乙醇洗涤凝胶。

[0074] C:盖-OH核-辛基旋转式圆盘介质的制备

[0075] C1:旋转式圆盘介质的制备

[0076] 6%琼脂糖溶液用作原料。研究温度、冷却速率、粘度、速度和琼脂糖流速(至圆盘)相对于孔隙率的响应。

[0077] 旋转式圆盘装置由ABB Industriservice根据给定的说明书制造(见下面):

[0078] 钢品质:SS 2343-02(对于所有指定的项目)

[0079] 聚合物材料:PTFE,聚碳酸酯(拱顶保护),EPDM(乙烯丙烯二烯单体),硅橡胶。

[0080] 拱顶高度:900mm

[0081] 捕获盆直径:2400mm,包括排水通道

[0082] 捕获盆斜率:3°

[0083] 圆盘数量:6

[0084] 圆盘直径:200mm

[0085] 一般圆盘厚度:最大5.2mm

[0086] 边缘处的圆盘厚度:12.4mm,包括135°斜率

[0087] 上部压力补偿室直径(对于液体琼脂糖溶液):73mm

[0088] 上部压力补偿室高度:6mm

[0089] 分布针数量:6

[0090] 针的内径:0.7mm

[0091] 通过针将琼脂糖溶液加入到6个圆盘中。通过使用6个圆盘而不是1个圆盘,增加了容量。对于6个圆盘中的每一个,琼脂糖流量均相同。这意味着源自每个圆盘的珠尺寸均相同。将圆盘的速度范围调节在3001-3010rpm内,且拱顶内的相对湿度为100%。如果相对湿度小于100%,则存在水从琼脂糖液滴中蒸发的风险。

[0092] 使用调节至69.7℃且粘度在397-421mPa内的烯丙基化的6%琼脂糖溶液加入到旋转式圆盘。将琼脂糖溶液至圆盘的流速调节至170ml/分钟。捕获水温度为20.1℃。

[0093] 与表氯醇交联后,旋转式圆盘珠的孔隙率呈现于表1。使用不同的葡聚糖来估测孔隙率,并且使用蓝色葡聚糖2000得到空隙体积。生产旋转式圆盘原型,以得到不允许免疫球蛋白渗透珠的孔隙率。这意味着分子量大于约150000g/mol的分子应该不能扩散至珠中。

[0094] 表1.用于旋转式圆盘原型的五种不同的葡聚糖标准品的 K_{av} -值

[0095]

Mw Dx	K_{av}
9890	0.655
43500	0.382
66700	0.276
123600	0.021
196300	0.013

[0096] $^1K_{av}$ -值如下计算: $(V_R - V_0)/(V_C - V_0)$,其中 V_R =葡聚糖标准品的保留体积, V_0 =空隙

体积, V_c = 柱的几何体积。

[0097] 颗粒尺寸为 $190\mu\text{m} \pm 5\mu\text{m}$ 。使用旋转式圆盘原型来产生用于捕获分子量小于约 70000g/mol 的蛋白质的介质, 而较大的分子例如免疫球蛋白(人 IgG) 应该不能扩散至珠中以及和珠的核中的配体相互作用。

[0098] C2:OH-盖-烯丙基旋转式圆盘介质的制备

[0099] 烯丙基活化的旋转式圆盘介质。在玻璃滤器上用蒸馏水洗涤旋转式圆盘介质。将 25ml 凝胶在滤器上沥干, 并在三颈圆底烧瓶中称重。加入 NaOH (20ml , 50% 溶液), 并开始机械搅拌。将 0.1g 硼氢化钠和 2.9g 硫酸钠加入到烧瓶中, 将浆料在水浴上加热至 50°C 。约 1 小时后, 加入 27.5ml 烯丙基缩水甘油基醚。随后将浆料剧烈搅拌过夜。约 20 小时后, 将浆料转移至玻璃滤器, 使用乙酸 (60%) 将 pH 调节至约 7 。随后用蒸馏水 ($\times 4$)、乙醇 ($\times 4$) 和蒸馏水 ($\times 4$) 洗涤凝胶。随后通过滴定测得烯丙基含量为 $321\mu\text{mol/ml}$ 。

[0100] 部分溴化和 NaOH 处理 (OH-盖的制备)。将 11.6ml 烯丙基化的凝胶在烧瓶中称重, 加入 90ml 蒸馏水和 1g 硫酸钠。然后剧烈搅拌下, 使用移液管加入 0.3 当量溴 ($57\mu\text{l}$)。约 5 分钟 (此时溴已消耗完) 后, 在玻璃滤器上用蒸馏水洗涤凝胶。使用水溶液将 5ml 部分溴化的凝胶转移至烧瓶。随后加入 NaOH (50% 溶液) 至 $\text{pH} > 13$, 将浆料加热至 50°C 并搅拌过夜。约 18 小时后, 使用乙酸 (60% 溶液) 将 pH 调节至约 7 。随后在玻璃滤器上用蒸馏水洗涤凝胶。

[0101] C3:核偶联

[0102] 在珠的核中辛基的偶联。将 5ml 沥干的 OH-盖旋转式圆盘介质与蒸馏水一起放在烧杯中, 并开始剧烈顶置式搅拌。加入溴, 直至浆料剩余深橙色/黄色。搅拌 10 分钟后, 加入甲酸钠 (约 1.5g), 直至浆料完全褪色。随后在玻璃滤器上用蒸馏水洗涤凝胶。

[0103] 将沥干的溴化的凝胶在烧瓶中称重, 并加入 10ml 蒸馏水和 2ml 辛硫醇。随后使用 NaOH (50% 溶液) 将 pH 调节至约 12.5 。随后将混合物于 50°C 下搅拌过夜。约 20 小时后, 用蒸馏水和乙醇洗涤凝胶。

[0104] 实施例2:在珠的核中基于辛基配体的三种原型的层析评价

[0105] 将在穿透容量方面待研究的三种不同的辛基介质 (原型: 盖-OH核-辛基琼脂糖 20Fast Flow , 盖-OH核-辛基旋转式圆盘和盖-葡聚糖辛基核琼脂糖 Fast Flow) 填充在 $\text{HR } 5/5$ 柱中, 用缓冲液溶液平衡后, 将样品溶液以 0.3ml/分钟 或 1.0ml/分钟 的流速泵送通过柱。评价在最大 UV 检测器信号的 10% (280nm) 下的穿透容量。通过将测试溶液直接泵送至检测器中, 来评价最大 UV 信号。根据下式计算在最大吸光度的 10% 下的穿透容量 ($Q_{b10\%}$):

[0106] $Q_{b10\%} = (T_{R10\%} - T_{RD}) \times C / V_c$

[0107] 其中 $T_{R10\%}$ 为在最大吸光度的 10% 下的保留时间 (分钟), T_{RD} 为在系统中的空隙体积时间 (分钟), C 为样品的浓度 (4mg 蛋白质/ ml), V_c 为柱体积 (ml)。在穿透容量测定时使用的吸附缓冲液为 25mM TRIS ($\text{pH } 8.0$) 或 50mM 乙酸盐 ($\text{pH } 4.75$)。

[0108] 在流通模式中还使用澄清物料测试原型盖-OH核-辛基琼脂糖 20Fast Flow 。将物料 (32ml) 泵送通过填充原型的 $\text{HR } 5/5$ 柱, 并相对于宿主细胞蛋白质 (HCP) 的量和回收的单克隆抗体的量分析流通流份 (36ml)。在这些试验中使用的吸附缓冲液为调节至 pH 为 7.2 的 25mM 磷酸盐缓冲液。

[0109] A:样品

[0110] 用于穿透测定的样品为人免疫球蛋白 (IgG, Gammanorm)、卵清蛋白和溶菌酶。在

4mg/ml浓度下将蛋白质溶解于吸附缓冲液中,一次仅将一种蛋白质施加于柱中。

[0111] 单克隆抗体(mAb)为IgG1(基于IEF,其pI为7.5-8.4),在NS0细胞中表达。已过滤的未纯化的细胞培养上清液用作样品。样品中mAb的浓度为1.3mg/ml,将32ml样品施加于柱(填充原型盖-OH核-辛基琼脂糖20 Fast Flow的HR 5/5柱)。在生产单克隆抗体时使用的生长培养基为DMEM(Gibco)和10%胎牛血清(FCS,Gibco)。

[0112] B:仪器

[0113] 装置

[0114] LC系统:ÄKTA探测器10 XT或等同物

[0115] 软件:UNICORN

[0116] 柱:HR 5/5

[0117] 仪器参数

[0118] 流速:0.3ml/分钟,0.5ml/分钟或1.0ml/分钟

[0119] 检测器池:10mm

[0120] 波长:280nm

[0121] B1:UNICORN方法

[0122] 以下描述在穿透实验中使用的的主要的方法:

[0123] 0.00基础CV 1.00{mL}#柱体积{mL}任何值

[0124] 0.00块开始条件

[0125] 0.00Base SameAsMain

[0126] 0.00波长280{nm}254{nm}215{nm}

[0127] 0.00平均时间2.56{秒}

[0128] 0.00报警压力3.00{MPa}0.00{MPa}

[0129] 0.00块结束

[0130] 0.00块柱位置

[0131] 0.00块平衡

[0132] 0.00Base SameAsMain

[0133] 0.00泵A入口A1

[0134] 0.00缓冲液阀A1 A11

[0135] 0.00流速0.3{ml/分钟}

[0136] 1.00设定标记()#柱名称

[0137] 3.9自动回零UV

[0138] 5.0#平衡体积块结束

[0139] 0.00块样品负载

[0140] 0.00基础体积

[0141] 0.00流速(1)#流速{ml/分钟}

[0142] 0.00设定标记()#样品

[0143] 0.00注射阀注射

[0144] 0.00在最大吸光度的20%时大于(100)的UV观察值{mAu}块结束

[0145] 49.00注射阀负载

- [0146] 49.00块结束
[0147] 0.00块柱洗涤
[0148] 0.00 Base SameAsMain
[0149] 0.00注射阀负载
[0150] 0.00UV观察值
[0151] 0.00泵A入口A1
[0152] 0.00缓冲液阀A1 A11
[0153] 0.00在5%时小于(20)的UV观察值{mAu}块结束
[0154] 20.00块结束
[0155] 0.00块梯度洗脱
[0156] 0.00 Base SameAsMain
[0157] 0.00泵B入口B1
[0158] 0.00梯度100{%B}2.00{基础}
[0159] 0.00流速0.30{ml/分钟}
[0160] 10.00梯度0.00{%B}0.00{基础}
[0161] 10.00块结束
[0162] 0块再平衡
[0163] 0.00方法结束
[0164] C:宿主细胞蛋白质(HCP)分析

[0165] 通过加入pH为8.0的10% 2.0M Tris、1% BSA、0.5%吐温20预处理用于ELISA的样品(将50 μ l BSA溶液加入到450 μ l样品中)。将样品在“样品稀释缓冲液”(目录编号F223A, Cygnus Technologies)中稀释,并使用在试剂盒中指定的“高灵敏度方案”,通过NS/0 HCP ELISA试剂盒(目录编号F220, Cygnus Technologies)分析。分光光度计VERSA max和软件SoftMax™ Pro(均得自Molecular Devices)用于读取和评价各板。

[0166] D:结果

[0167] D1:盖-OH核-辛基琼脂糖20 Fast Flow

[0168] 盖-OH核-辛基琼脂糖20 Fast Flow基于琼脂糖20 Fast Flow,其含有辛基作为核配体。设计基础基质琼脂糖20 Fast Flow具有高含量的琼脂糖,以便得到防止单克隆抗体渗透珠的孔隙率。在这种情况下,琼脂糖20 Fast Flow被烯丙基(0.37mmol/ml)高度活化,这意味着在珠的核中得到高含量配体。

[0169] 测试基于琼脂糖20 Fast Flow的原型(盖-OH核-辛基琼脂糖20Fast Flow)的溶菌酶和IgG的穿透容量。使用25mM TRIS(pH=8.0)作为吸附缓冲液,1.0M NaOH+30%异丙醇用作解吸缓冲液,并且将流速调节至1.0ml/分钟。将各原型填充在HR 5/5柱中。

[0170] 测试结果是,IgG不被吸附($Q_{b10}=0$),而溶菌酶的穿透容量(Q_{b10})为约10mg/ml。可注意到,使用25mM TRIS(pH=8.0)作为流动相得到这些结果,因此,清楚地表明,无需额外加入盐可实现小蛋白质的吸附。

[0171] 这种类型的介质主要用于仅一次循环。但是,该介质可用于洗脱被吸附的宿主细胞蛋白质。为了证实这一点,使用1.0M NaOH+30%异丙醇作为解吸缓冲液来洗脱被吸附的溶菌酶。

[0172] D2: 盖-葡聚糖核-辛基琼脂糖6 Fast Flow

[0173] 该原型基于琼脂糖6 Fast Flow,其孔隙率使得IgG可能扩散至基质中。因此,根据图1,通过连接葡聚糖降低了珠外部的孔径,并且采用这种方式防止IgG扩散至珠中。根据表2,IgG的穿透容量为0mg/ml,这清楚地证实IgG不能扩散至珠中。但是,观察到卵清蛋白具有较高的穿透容量(16mg/ml)。卵清蛋白和IgG的分子量分别为约43000和150000g/mol。这意味着,葡聚糖盖具有高“尺寸-选择性”并且可允许卵清蛋白扩散至珠中,同时防止IgG与核配体的相互作用。

[0174] 表2.对于填充在HR 5/5柱中的两种不同的原型,IgG和卵清蛋白的穿透容量(Q_{b10})

[0175] Q_{b10} IgG¹ Q_{b10} 卵清蛋白¹

[0176] 原型

[0177] (mg/ml) (mg/ml)

[0178] 盖-葡聚糖辛基-核琼脂糖6

[0179] 0 16

[0180] Fast Flow

[0181] 盖-OH辛基-核旋转式圆盘 0.6 14

[0182] ¹使用50mM乙酸盐缓冲液(pH=4.75)作为吸附缓冲液,并且1.0M NaOH+30%异丙醇用作解吸缓冲液,并且将流速调节至1.0ml/分钟。

[0183] D3: 盖-OH核-辛基旋转式圆盘

[0184] 穿透测定。盖-OH核-辛基旋转式圆盘基于旋转式圆盘珠,其含有辛基作为核配体。设计旋转式圆盘介质以得到防止单克隆抗体渗透珠的孔隙率。使用烯丙基(0.32mmol/ml)高度活化旋转式圆盘原型,这意味着在珠的核中得到高含量配体。此外,没有配体与珠的外部偶联(参见珠的制备)。根据表1,IgG的穿透容量非常低(0.6mg/ml),而卵清蛋白的容量高23倍。这些结果还表明,旋转式圆盘原型的孔隙率意味着非常少量的IgG能扩散至珠的核中。

[0185] Mab物料施加。将未在任何其他层析柱上运行的澄清物料施加于填充原型盖-OH核-辛基旋转式圆盘的HR 5/5柱。该柱以流通模式运行,并且将流通流份取样并分析mAb的回收率和宿主细胞蛋白质(HCP)的量。

[0186] 将32ml mAb(1.3mg mAb/ml)施加于填充原型盖-OH核-辛基旋转式圆盘的HR 5/5柱。使用25mM磷酸钠(pH=7.2)作为吸附缓冲液,并且1.0M NaOH+30%异丙醇用作解吸缓冲液。将流速调节至0.5ml/分钟,并且将36ml流通流份取样。

[0187] 在表3中提供回收率和HCP测定的结果。HCP含量降低大于50%,并且mAb的回收率为89%。

[0188] 表3.在图3所述的实验中得到的收率和HCP下降

[0189] 样品 收率(%) HCP(μ g/ml)

[0190] 原料 100 791

[0191] 流通流份¹ 89 341

[0192] ¹将36ml取样(流通流份),将32ml mAb溶液施加于柱(参见实验部分)。

[0193] 实施例3:流感病毒的纯化

[0194] 当大规模生产用于流感疫苗的流感病毒时,重要的是降低在最终的制剂中蛋白质

和DNA的水平。

[0195] 由于病毒颗粒的尺寸明显大于大多数污染物,因此本发明的颗粒非常适用于纯化病毒。

[0196] 在以下实施例中来说明这一点。

[0197] 分析方法

[0198] 病毒浓度

[0199] 根据标准方案使用DotBlot HA测试。

[0200] DNA浓度

[0201] 根据制造商的说明书(得自Invitrogen)使用PicoGreen[®]DNA测试。

[0202] 蛋白质浓度

[0203] 根据制造商的说明书(得自Bio-Rad)使用Bradford蛋白质测试。

[0204] 用于分析在DNA样品中的分子量分布的琼脂糖凝胶电泳

[0205] 根据制造商的说明书使用E-Gel[®]琼脂糖凝胶0.8%(Invitrogen)预制凝胶。

[0206] 所用的DNA梯为1kb Plus DNA标记(Invitrogen)。

[0207] 样品

[0208] 在研究中使用内部生产的流感病毒样品。将病毒在MDCK细胞中繁殖,直至出现细胞裂解。使用流感病毒株A/H1N1/Solomon Islands。裂解后,在超滤(UF)步骤中将物质浓缩约10倍,并且在渗滤(DF)步骤(中空纤维短柱500kDa)中再次浓缩约2倍。渗滤缓冲液为50mM Tris-HCl、150mM NaCl(pH 7.3),将样品冷冻待用。

[0209] 层析方法及结果

[0210] 柱:2ml Tricorn 5/100柱,该柱填充本发明的颗粒,具有7 μ m厚的中性外层,并且在内部具有辛基胺作为配体。在该实施例中的颗粒为琼脂糖颗粒。

[0211] 10ml流感病毒样品以75cm/h的流速施加。收集流通流份。

[0212] 分析原料和流通流份的病毒浓度、DNA浓度和蛋白质浓度。计算病毒回收率、DNA消耗和蛋白质消耗。结果示于表4和表5。

[0213] 表4. 分析结果

[0214]

样品	病毒的量[μ g HA]	DNA的量[μ g]	蛋白质的量[μ g]
原料	600	555	4300
流通流份	582	233	780

[0215] 表5. 病毒回收率、蛋白质和DNA消耗

[0216]

病毒回收率[%]	DNA消耗[%]	蛋白质消耗[%]
97	42	80

[0217] 结果表明,得到良好的蛋白质消耗,其为该纯化步骤的主要功能。DNA消耗较低,这一点可解释为由于在该具体的样品中存在高分子量DNA。

[0218] 分子量最高达约500个碱基对的DNA被有效除去,而较大的DNA不能进入孔结构,并与位于颗粒内部的带正电荷的辛基胺配体结合。

[0219] 在这种情况下,第二个纯化步骤例如常规阴离子交换步骤可除去较大的DNA。

[0220] 或者,可用核酸酶例如Benzonase[®]来处理样品,以将分子量降至充分低于500个碱基对,采用这种方式,当流感病毒样品通过填充本发明的颗粒的柱时,得到几乎完全的DNA和蛋白质消耗。

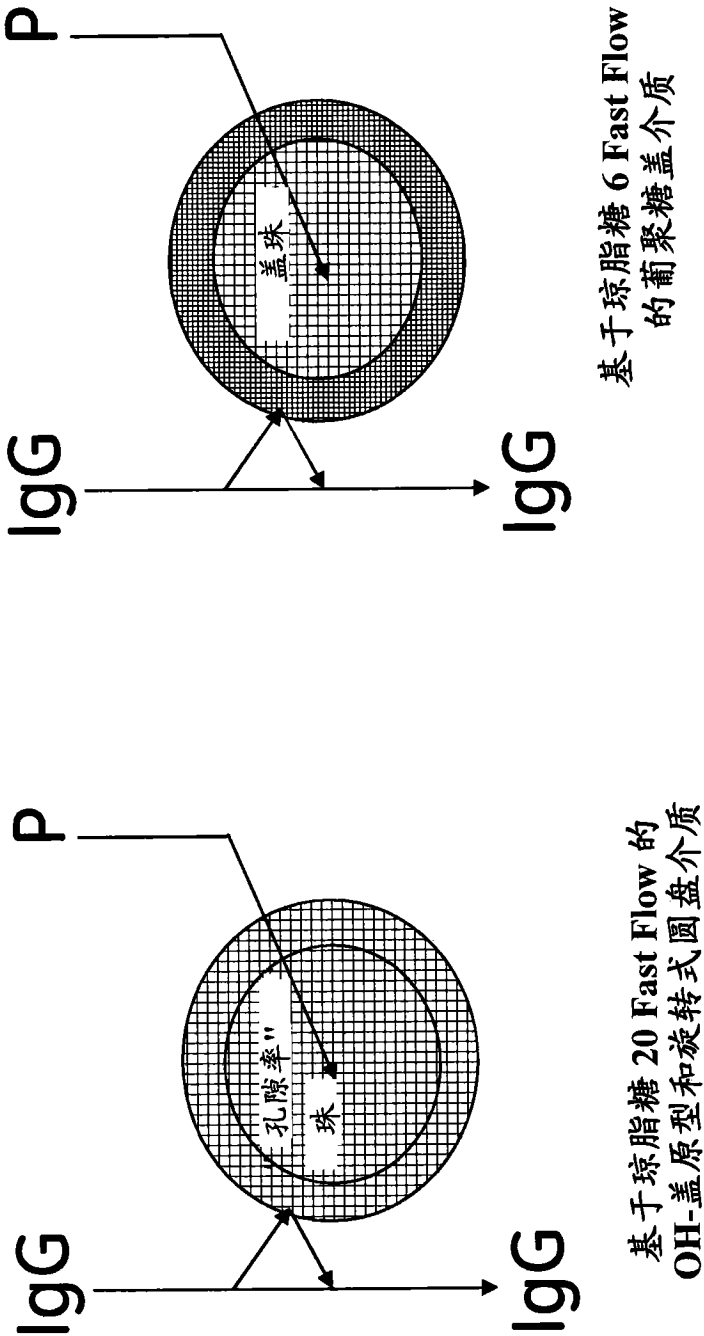


图1