(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110295114 A
(43)申请公布日 2019.10.01

(21)申请号 201910262728.4

(22)申请日 2014.03.14

(30)优先权数据
61/800,345 2013.03.15 US

(62)分案原申请数据
201480028322.5 2014.03.14

(71)申请人 安迅生物制药公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 斯蒂芬·霍利

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 郑霞

(51)Int.Cl.
C12N 1/06(2006.01)
C07K 1/14(2006.01)

权利要求书1页 说明书19页
序列表4页 附图15页

(54)发明名称

蛋白纯化的新颖方法

(57)摘要

本申请涉及蛋白纯化的新颖方法。本公开内容提供了用于释放细胞内蛋白的方法。该方法允许从细胞分离感兴趣的蛋白，不需机械破碎细胞、不需从培养基分离细胞且不需从培养基取出细胞。

CN 110295114 A

1.一种用于从表达感兴趣的蛋白的细菌细胞或真菌释放感兴趣的细胞内蛋白的方法，所述方法包括：

(a)提供表达感兴趣的细胞内蛋白的细胞的培养物；

(b1)使所述培养物与无机盐接触；保持包含添加的无机盐的所述培养物至少10分钟；使所述包含添加的无机盐的所述培养物与螯合剂接触；或

(b2)使所述培养物与无机盐和螯合剂接触；

(c)使包含添加的无机盐和添加的螯合剂的所述培养物保持至少10分钟；

(d)任选地将所述包含添加的无机盐和添加的螯合剂的所述培养物的pH调整至在4和9之间的pH；并任选地使所述包含添加的无机盐和添加的螯合剂的所述培养物保持至少15分钟；

(e)使所述包含添加的无机盐和添加的螯合剂的所述培养物与去垢剂接触；

(f)使所述包含添加的无机盐、添加的螯合剂和添加的去垢剂的所述培养物保持至少1小时；

(g)任选地使所述包含添加的无机盐、添加的螯合剂和添加的去垢剂的所述培养物的温度降低；

(h)使所述包含添加的无机盐、添加的螯合剂和添加的去垢剂的所述培养物与沉淀剂接触；

(i)使所述包含添加的无机盐、添加的螯合剂、添加的去垢剂和添加的沉淀剂的所述培养物保持至少1小时，以及

(j)使所述包含添加的无机盐、添加的螯合剂、添加的去垢剂和添加的沉淀剂的所述培养物经历除去大部分的细胞碎片的方法，由此提供包含感兴趣的蛋白的组合物；

其中，所述方法不包括选自由以下组成的组的至少两个步骤：(i)机械破碎所述细胞，(ii)除去基本上所有的培养基，和(iii)添加降解细胞壁材料的酶。

2.如权利要求1所述的方法，其中所述方法不包括选自由以下组成的组的任一步骤：(i)机械破碎所述细胞，(ii)除去基本上所有的培养基，和(iii)添加降解细胞壁材料的酶。

3.如权利要求1所述的方法，其中所述方法确实包括除去基本上所有的培养基。

4.如权利要求1所述的方法，其中所述无机盐选自：磷酸钠、硫酸铵和氯化钠。

5.如权利要求1所述的方法，其中所述去垢剂选自由以下组成的组：Triton、SDS、CHAPS 3、Nonidet P40、n-辛基葡萄糖苷和吐温-20。

6.如权利要求5所述的方法，其中所述去垢剂是选自由以下组成的组的两种去垢剂的混合物：Triton、SDS、CHAPS 3、Nonidet P40、n-辛基葡萄糖苷和吐温-20。

7.如权利要求1所述的方法，其中所述沉淀剂选自由以下组成的组：PEI、和铵盐、和聚乙二醇、TCA和乙醇。

8.如权利要求1所述的方法，其中所述细胞是大肠杆菌(E.coli)。

9.如权利要求1所述的方法，其中所述感兴趣的蛋白是DAS181。

10.如权利要求1-9中的任一项所述的方法，其中步骤(c)是至少20分钟。

蛋白纯化的新颖方法

[0001] 本申请是申请日为2014年3月14日，申请号为201480028322.5，发明名称为“蛋白纯化的新颖方法”的申请的分案申请。

[0002] 关于联邦政府资助的研究的声明

[0003] 本文公开的本发明部分由政府资助做出，且政府在本发明中拥有某些权利。特别地，本文公开的本发明的部分部分地根据美国国立卫生研究院给予的合同号N01-AI-60015C得到资助。

发明领域

[0004] 本发明总体上涉及从细胞培养物获取细胞内蛋白的新颖方法和试剂。

[0005] 背景

[0006] 围绕大规模纯化蛋白的关注对于生物技术产业是日益重要的问题。许多紊乱已是蛋白或酶替代疗法的主题，所述紊乱包括营养不良性大疱性表皮松解症(dystrophic epidermolysis bullosa)和溶酶体贮积紊乱(lysosomal storage disorders)诸如戈谢病(Gaucher disease)、法布里病(Fabry disease)和庞贝氏病(Pompe disease)。供应患者需要的大规模蛋白生产一定是成本敏感的，具有生产效率和出产高质量产品。蛋白纯化的过程是时间漫长的、繁重的和昂贵的。这些缺点大大地影响蛋白替代疗法的成本并通常对医疗保健构成巨大的挑战。

[0007] 蛋白生产主要在细胞内完成，即，哺乳动物、细菌或真菌，它们通过插入包含用于该蛋白的基因的重组质粒被工程化以产生感兴趣的蛋白。在复合生长培养基中培养表达感兴趣的蛋白的细胞，该复合生长培养基包含通常由动物血清制剂提供的糖、氨基酸和生长因子。纯化需要从供给细胞的化合物和细胞碎片的混合物分离期望的蛋白以便以高质量纯化足够的量用作人类治疗剂。

[0008] 用于从细胞碎片纯化蛋白的程序是漫长和复杂的。取出感兴趣的蛋白需要的多个和重复的步骤大大地降低最终蛋白的产率和质量。在许多情况下，蛋白在纯化后必须是功能性的。

[0009] 在生物学表达系统的细胞内区室中表达的重组蛋白在存在细胞壁的情况下通常通过机械破碎从表达系统细胞释放。此类机械方法包括匀浆化、微流化、氮爆、超声和珠搅拌方法。其他方法包括添加酶以部分地降解细胞壁组分随后用渗透剂以诱导周质内含物的破裂和释放。结合酶消化和化学处理的这些方法主要用于在革兰氏阴性细菌中靶向周质间隙的表达的蛋白。没有细胞壁的细胞可通过渗透压而不不添加酶，或通过使用去垢剂或有机溶剂完全破碎细胞膜来破碎。为了提高效率可组合使用破碎方法。

[0010] 大多数以前的方法仅适用于从周质区室释放蛋白或导致细胞区室完全破碎。当完全破碎细胞时，DNA可从亚细胞区室被释放并导致高粘性液体的形成。DNA可被剪切或酶促降解以降低粘性并使在大规模生产期间处理工艺流体流(the process fluid stream)成为可能。这些步骤成功地用于医药级蛋白的生产；然而，每个处理步骤增加了制造的复杂性，时间和成本。

[0011] 发明概述

[0012] 本公开内容提供了新颖方法和试剂,所述新颖方法和试剂涉及从存在于培养基中的细菌细胞特别是大肠杆菌(E.coli)纯化感兴趣的细胞内蛋白的方法,而(i)没有从培养基取出细胞,(ii)不使用细胞的机械破碎或不使用酶降解细胞壁;和(iii)没有将细胞群压实成浓缩的沉淀形式。

[0013] 所公开的方法用于通过添加透化细胞用于释放重组蛋白的预定组合无机盐和去垢剂来释放细胞内的重组蛋白,而不导致细胞的全部破碎,从而减少DNA释放的量和产生的增加的粘度。

[0014] 可通过在选择性沉淀后的离心步骤从可溶的重组蛋白纯化出剩余的细胞碎片。

[0015] 该方法可通过一系列步骤完成,所述步骤包括在完成细胞培养(即,发酵)后将适当的化学试剂添加到生物反应器。以逐步的方式将这些化学试剂添加到培养物。还添加试剂以便实现该试剂的特定浓度。该方法需要化学试剂在溶液中的存在规定的时间量。

[0016] 该方法不需要从细胞培养物分离细胞。另外,它不需要在添加试剂(“释放试剂”)前除去生长培养基。该方法不利用机械破碎裂解细胞。

[0017] 这样做,该方法降低了制造的复杂性、时间和成本,同时由于减少的 DNA释放而增加了稳健性。

[0018] 本文件提供了用于从表达感兴趣的蛋白的细菌细胞或真菌释放感兴趣的蛋白的方法。该方法包括:(a)提供表达感兴趣的蛋白的细胞的培养物 (例如,表达感兴趣的蛋白的细胞和细胞已被在其中培养的生长培养基); (b)使细胞培养物与无机盐相接触(例如,通过向培养物添加包含无机盐的组合物);(c)使包含添加的无机盐的培养物保持至少10分钟;(d)使包含添加的无机盐的培养物与螯合剂接触(例如,通过向培养物添加包含螯合剂的组合物);(e)使包含添加的无机盐和添加的螯合剂的培养物保持至少10分钟;(f)任选地将包含添加的无机盐和添加的螯合剂的培养物的pH调整至在4和9之间的pH;(g)在pH调整后使包含添加的无机盐和添加的螯合剂的培养物保持至少15分钟;(h)使包含添加的无机盐和添加的螯合剂的培养物与去垢剂接触;(i)使包含添加的无机盐、添加的螯合剂和添加的去垢剂的培养物保持至少1小时;(j)任选地使包含添加的无机盐、添加的螯合剂和添加的去垢剂的培养物的温度降低;(k)使包含添加的无机盐、添加的螯合剂和添加的去垢剂的培养物与沉淀剂接触;(l)使包含添加的无机盐、添加的螯合剂、添加的去垢剂和添加的沉淀剂的培养物保持至少1小时;和(m)使包含添加的无机盐、添加的螯合剂、添加的去垢剂和添加的沉淀剂的培养物经历除去大部分的(例如,至少90%)细胞碎片的方法。该方法不包括选自由以下组成的组的至少两个步骤:(i)机械破碎细胞,(ii)在添加前除去全部或基本上全部的培养基,和(iii)添加消化细胞壁材料的酶。在一些情况下,该方法不包括以下的任何一个:(i)机械破碎细胞,(ii)除去全部或基本上全部的培养基,和(iii)添加消化细胞壁材料的酶。以上方法还可包括除去部分或基本上全部的培养基。

[0019] 在其中使用了无机盐的以上方法中,该无机盐可以是磷酸钠、硫酸铵和氯化钠。在其中使用了去垢剂的以上方法中,该去垢剂可以是Triton、 SDS、CHAPS 3、Nonidet P40、n-辛基葡萄糖苷和吐温-20。以上方法还使用可选自Triton、SDS、CHAPS 3、Nonidet P40、n-辛基葡萄糖苷和吐温-20 的两种去垢剂的混合物。以上方法还使用了沉淀剂,该沉淀剂可以是PEI、和铵盐、和聚乙二醇、TCA和乙醇。

[0020] 在一些情况下，表达期望的蛋白的细胞是大肠杆菌。以上方法使用细菌细胞，其为革兰氏阴性菌。期望的蛋白是细胞内蛋白(即，其不是从细胞分泌的)。感兴趣的蛋白可以是DAS181。

[0021] 在所有以上方法中，保持包含无机盐的培养物的步骤发生至少20分钟。在所有以上方法中，保持包含无机盐和螯合剂的培养物的步骤可以持续至少15分钟至少30分钟、45分钟或1小时或在30min和1小时之间。

[0022] 在所有以上方法中，保持包含无机盐、螯合剂和去垢剂的培养物的步骤可发生至少1小时、至少30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5 小时、6小时、7小时、8小时、小时6小时、7小时、8小时、9小时、 10小时、11小时、12小时或5-13小时。在所有以上方法中，保持包含无机盐、螯合剂、去垢剂和沉淀剂的培养物的步骤可发生至少1小时、至少 30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时或5-13 小时。

[0023] 步骤可在混合物在25-35℃优选地30℃时发生。在添加沉淀剂之前，混合物的温度可被降到低于25℃，例如在25℃和20℃之间或降低到21℃和23℃之间。

[0024] 具体地，本申请提供了以下内容：

[0025] 1.一种用于从表达感兴趣的蛋白的细菌细胞或真菌释放感兴趣的细胞内蛋白的方法，所述方法包括：

[0026] (a)提供表达感兴趣的细胞内蛋白的细胞的培养物；

[0027] (b1)使所述培养物与无机盐接触；保持包含添加的无机盐的所述培养物至少10分钟；使所述包含添加的无机盐的所述培养物与螯合剂接触；或

[0028] (b2)使所述培养物与无机盐和螯合剂接触；

[0029] (c)使包含添加的无机盐和添加的螯合剂的所述培养物保持至少10分钟；

[0030] (d)任选地将所述包含添加的无机盐和添加的螯合剂的所述培养物的 pH调整至在4和9之间的pH；并任选地使所述包含添加的无机盐和添加的螯合剂的所述培养物保持至少15分钟；

[0031] (e)使所述包含添加的无机盐和添加的螯合剂的所述培养物与去垢剂接触；

[0032] (f)使所述包含添加的无机盐、添加的螯合剂和添加的去垢剂的所述培养物保持至少1小时；

[0033] (g)任选地使所述包含添加的无机盐、添加的螯合剂和添加的去垢剂的所述培养物的温度降低；

[0034] (h)使所述包含添加的无机盐、添加的螯合剂和添加的去垢剂的所述培养物与沉淀剂接触；

[0035] (i)使所述包含添加的无机盐、添加的螯合剂、添加的去垢剂和添加的沉淀剂的所述培养物保持至少1小时，以及

[0036] (j)使所述包含添加的无机盐、添加的螯合剂、添加的去垢剂和添加的沉淀剂的所述培养物经历除去大部分的细胞碎片的方法，由此提供包含感兴趣的蛋白的组合物；

[0037] 其中，所述方法不包括选自由以下组成的组的至少两个步骤：(i)机械破碎所述细胞，(ii)除去基本上所有的培养基，和(iii)添加降解细胞壁材料的酶。

[0038] 2.如项目1所述的方法，其中所述方法不包括选自由以下组成的组的任一步骤：

(i)机械破碎所述细胞,(ii)除去基本上所有的培养基,和(iii)添加降解细胞壁材料的酶。

[0039] 3.如项目1所述的方法,其中所述方法确实包括除去基本上所有的培养基。

[0040] 4.如项目1所述的方法,其中所述无机盐选自:磷酸钠、硫酸铵和氯化钠。

[0041] 5.如项目1所述的方法,其中所述去垢剂选自由以下组成的组:Triton、SDS、CHAPS 3、Nonidet P40、n-辛基葡萄糖苷和吐温-20。

[0042] 6.如项目5所述的方法,其中所述去垢剂是选自由以下组成的组的两种去垢剂的混合物:Triton、SDS、CHAPS 3、Nonidet P40、n-辛基葡萄糖苷和吐温-20。

[0043] 7.如项目1所述的方法,其中所述沉淀剂选自由以下组成的组:PEI、和铵盐、和聚乙二醇、TCA和乙醇。

[0044] 8.如项目1所述的方法,其中所述细胞是大肠杆菌(E.coli)。

[0045] 9.如项目1所述的方法,其中所述感兴趣的蛋白是DAS181。

[0046] 10.如项目1-9中的任一项所述的方法,其中步骤(c)是至少20分钟。

[0047] 11.如项目1-10中的任一项所述的方法,其中步骤(d)是至少30分钟、45分钟、或1小时或在30和1小时之间。

[0048] 12.如项目1-11中的任一项所述的方法,其中步骤(i)是至少30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时或2-8 小时。

[0049] 13.如项目1-11中的任一项所述的方法,其中步骤(i)是至少30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、小时 6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时或5-13小时。

[0050] 14.如项目1-3中的任一项所述的方法,其中步骤(g)需要将所述温度降低到低于25℃。

[0051] 15.如项目1-14中的任一项所述的方法,其中步骤(h)在20℃-25℃、21℃-22℃或22℃发生。

[0052] 16.如项目1所述的方法,其中步骤(b1)或(b2)的盐至少在10mM、15 mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、50mM、 55mM或60mM的浓度。

[0053] 17.如步骤1所述的方法,其中所述细菌细胞是革兰氏阴性菌。

[0054] 18.如项目1或项目9所述的方法,所述方法还包括从包含感兴趣的蛋白的组合物纯化感兴趣的蛋白。

附图说明

[0055] 图1是新颖蛋白释放方案的实施方案的流程图。

[0056] 图2是需要匀浆化裂解的蛋白释放方法相比于新颖蛋白释放方法(“去垢剂增溶”)的比较。

[0057] 图3A-3E是匀浆化裂解方案和去垢剂增溶方案的SDS PAGE分析。图 3A和B描述了由匀浆化方案(图3A)和去垢剂增溶方案(图3B)分离的蛋白的考马斯检测。图3C和D描述了由匀浆化方案(图3C)和去垢剂增溶方案 (图3C)分离的蛋白的银检测。图3E是用银检测的SDS-PAGE比较凝胶。在图3A中,泳道1-9分别包含:分子量标志物、澄清的匀浆、SP流-通、SP洗脱物、HIC洗脱物、Post HIC TFF、RPC负载、RPC洗脱物,和DAS181 Ref Std 750-0406-002。在图3B中,泳道1-10分别包含:分子量标志物、PEI澄清的去垢剂、去垢剂SP负载、去垢

剂SP流-通、去垢剂SP洗脱物、去垢剂HIC洗脱物、去垢剂Post-HIC TFF、RPC负载、RPC洗脱物和DAS181 参考标准750-0406-002。在图3C中，泳道1-8分别包含：分子量标志物、澄清的匀浆、SP流-通、SP洗脱物、HIC洗脱物、Post HIC TFF、RPC洗脱物，和DAS181Ref Std 750-0406-002。

[0058] 图4是去垢剂增溶的优化方法和蛋白纯化的步骤的流程图。

[0059] 图5A-5F是运行A和B的蛋白的分析。图A-C分别是运行A的去垢剂增溶产率的考马斯染色、蛋白印迹和银染分析。用于这些分析的泳道1-10 分别为如下：MW标志物、SP洗脱物(Ferm 20110523F2)、HIC FT、UF/DF 1号池、Capto Adhere FT pH 7.7、滴定的Capto Adhere FT pH 5.0、药物物质和DAS181Ref.Std。图D-F分别是运行B的去垢剂增溶产率的考马斯染色、蛋白印迹和银染分析。用于这些分析的泳道1-10分别为如下：MW 标志物、SP洗脱物(Ferm 20110613F2)、HIC FT、UF/DF 1号池、Capto Adhere FT pH 7.7、滴定的Capto Adhere FT pH 5.0、药物物质和DAS181参考标准 Lot 46-012。

[0060] 图6A和6B是DAS181纯度的SDS-PAGE分析。在图6A中显示：泳道1是MW标志物，泳道2是药物物质Ferm 20110523F2，泳道4&5是药物物质Ferm 20110613F2，且泳道6是DAS1812期参考标准Lot 46-012。在图6B中显示蛋白的不同浓度：8-20μg。

[0061] 图7A-7C示出来自以下的DAS181的RP-HPLC比较：整合的运行A、整合的运行B和DAS181参考标准。

[0062] 图8A-8C示出来自以下的DAS181的CEX-HPLC比较：整合的运行A、整合的运行B和DAS181参考标准。

[0063] 图9是经过几周储存的DAS181稳定性的SDS-PAGE分析。

[0064] 详述

[0065] 本文描述的方法通常可被用于从细菌细胞特别是大肠杆菌释放细胞内蛋白。本文的实施例涉及从大肠杆菌释放DAS181(Malakhov等人，Antimicrob.Agents Chemother.，1470-1479(2006))。DAS181是融合蛋白，该融合蛋白包含来自人类双调蛋白的肝素(糖胺聚糖，或GAG)结合结构域，其通过其N-末端与粘放线菌(Actinomyces Viscosus)的催化结构域的C-末端融合(例如，在SEQ ID NO:1(无氨基末端蛋氨酸)和SEQ ID NO:2(包括氨基末端蛋氨酸)中列出的氨基酸序列)。本文描述的基因工程化细胞包含一种或更多种编码DAS181蛋白的核酸。适合体内产生DAS181或重组产生本文描述的任何多肽的细胞可以是细菌或真菌起源的。

[0066] 可使用表达载体实现在细胞(例如，细菌细胞)中蛋白的过表达。表达载体可以是自主的或整合的。可以以表达载体诸如质粒的形式将重组核酸 (例如，编码DAS181的重组核酸)引入到细胞中。重组核酸可以以染色体外形式维持或可将其整合入染色体DNA。表达载体可包含编码在选择条件下细胞存活所需要的蛋白的选择标志物基因以允许检测和/或选择转化了期望的核酸的那些细胞。表达载体可还包括自主复制序列(ARS)。

[0067] 转化的细胞(即，细菌细胞)可通过使用适当的技术来选择，该技术包括但不限于，转化后在需要的生化产物不存在下培养营养缺陷型细胞，选择和检测新表型，或在抗生素的存在下培养，该抗生素在包含在转化子中的抗性基因不存在下对酵母是有毒的。还可通过将表达盒整合入通过例如 DNA印迹或PCR分析来评估的基因组来选择和/或验证转化子。在将载体导入感兴趣的靶细胞前，载体可在如以上所述的细菌细胞诸如大肠杆菌(E.

coli)中生长(例如,扩增)。可通过本领域已知的导致从细菌环境纯化载体 DNA的任何方法从细菌细胞中分离载体DNA。纯化的载体DNA可大量地用苯酚、氯仿和乙醚提取以保证在质粒DNA制剂中不存在大肠杆菌蛋白,由于这些蛋白可对哺乳动物细胞是有毒的。

[0068] 可用于多肽的小规模或大规模产生的表达系统包括但不限于,微生物诸如用包含核酸分子的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如,大肠杆菌),和用包含核酸分子的重组真菌表达载体转化的真菌(例如,酿酒酵母(S.cerevisiae))。

[0069] 通常,对于感兴趣的蛋白通过细菌(例如,大肠杆菌)重组细胞的体内产生,细胞可在包含可同化的(assimilatable)氮源和碳源的水性营养培养基中,通常地在浸没的需氧条件下(震荡培养、浸没培养等)培养。使用培养基中的蛋白组分、掺入培养基的缓冲液或根据需要通过外部添加酸或碱,可将水性培养基维持在4.0-8.0(例如,4.5、5.0、5.5、6.0或7.5)的PH。营养培养基中的适合的碳源可包括:例如,碳水化合物、脂质和有机酸诸如葡萄糖、蔗糖、果糖、甘油、淀粉、植物油、石化衍生的油(petrochemical derived oils)、琥珀酸盐/酯、甲酸盐/酯等等。适合的氮源可包括,例如,酵母提取物、玉米浆、肉提取物、蛋白胨、蔬菜餐、酒糟可溶物(distillers solubles)、干酵母等以及无机氮源诸如硫酸铵、磷酸铵、硝酸盐、尿素、氨基酸等。

[0070] 有利地组合使用的碳源和氮源,不需要以纯的形式使用,由于包含痕量的生长因子和大量矿物营养的低纯材料也适合使用。可将期望的矿物盐诸如磷酸钠或磷酸钾、氯化钠或氯化钾、镁盐、铜盐等添加到培养基。可根据需要以痕量添加消泡剂诸如液体石蜡或植物油,但通常不需要。

[0071] 可在促进最佳生物量和/或酶滴度产率的条件下进行表达感兴趣的蛋白的重组细胞(例如,大肠杆菌细胞)的培养。此类条件包括,例如,分批培养、分批补料(fed-batch)培养或连续培养。另外,条件参数的改变还可促进DAS181蛋白的最佳生物量和/或酶滴度产率。此类条件包括,例如,培养基中的甘油浓度和高pO_2。对于大量生物量的产生,可使用浸没的需氧培养方法,然而少量可在摇瓶中培养。对于大罐中的产生,可使用许多较小的接种罐以使接种物扩大至足以最小化生产容器中的延迟时间的高水平。用于产生生物催化剂的培养基通常在接种细胞前灭菌(例如,通过高压灭菌法)。可通过机械装置在气泡反应器中同时添加无菌空气或通过单独地添加空气实现培养物的通气和搅拌。可在培养期间在例如生物反应器中使用较高pO_2(溶解氧)以促进最佳的生物量。还可用其促进生物量培养物中最佳的活性蛋白表达。实施此类发酵参数,包括较高局部氧分压和逐步地甘油消耗,可导致感兴趣的蛋白的增加的产率。

[0072] 去垢剂增溶方法

[0073] 原位去垢剂透化作用

[0074] 在足够的培养以供期望的蛋白表达后,通过停止向反应器中的进料添加和气流,以及通过降低搅拌速度100至250rpm收获培养物。将温度设定在15℃至45℃的范围以准备透化作用步骤。在一些实施方案中,可将温度设定在30℃。这在本公开内容中还被称为预处理步骤。可将无机盐(例如,磷酸钠、硫酸铵和氯化钠)添加至在10-100mM范围的最终浓度。在一些实施方案中,无机盐的最终浓度为50mM。允许将溶液混合至少10 分钟或至少20分钟。添加螯合剂诸如乙二胺四乙酸(EDTA)至在50-200mM 的范围的最终浓度并混合至少10分钟或至少20分钟。在一些实施方案中,将EDTA添加至100mM的最终浓度(例如,50nM-

250nM)。随后可将 pH调整至5.0-6.0(例如,使用磷酸)。在一些实施方案中,将pH调整至6。边混合(例如,以400-450rpm的混合速度)边将材料孵育至少10分钟(例如,在30分钟至180分钟或更长的范围的时间量)。在该方法的一些实施方案中,将材料孵育60分钟。将去垢剂(例如,Triton、SDS、CHAPS 3、Nonidet P40、n-辛基葡糖苷和吐温-20)或去垢剂的组合例如十二烷基磺酸钠(SDS) Triton-X 100添加至混合物。Triton-X 100可在2-15%的范围与0.01-1% SDS一起组合使用。在一些实施方案中,随后将10%SDS溶液添加至0.1%的最终浓度并同时将Triton-X 100添加至7%的最终浓度。可将溶液在 15-45℃的范围的温度以中等速度混合1-5小时的范围的时间量。在一些实施方案中,溶液在30℃以中等速度混合3小时。

[0075] 澄清

[0076] 在去垢剂组合中孵育后,将混合物温度降低至22℃。随后将百分之十 (10%)PEI、pH 6.0储备溶液添加至0.5%的最终浓度。可在22℃下将溶液混合范围在6-24小时的时间量。在一些实施方案中,在22℃下将溶液混合6-12小时。在该方法的另一个实施方案中,在22℃下将溶液混合6-8 小时的目标。随后通过使用Sharples AS-14(进料流速(feedflow rate):1 L/min)的连续流动离心使混合物澄清。在T=0下测量混合物的浊度 (OD600nm)。在开始蛋白纯化过程前,混合物可任优选地在环境温度下保持过夜。

[0077] 在以上去垢剂增溶方法后,产物可经历进一步的纯化。

实施例

[0078] 将在以下实施例中进一步描述本发明,该实施例不限制权利要求书中描述的本发明的范围。

[0079] 本发明是无需机械破碎细胞或通过外源添加的酶酶促降解细胞壁的方法而进行的新颖蛋白纯化方案。完成它还无需从细胞培养物中分离细胞且另外不需要从培养基取出细胞。

[0080] 优化本发明新颖增溶方案以出产高质量的和稳定的感兴趣的蛋白 DAS181。本文定义了该新颖蛋白纯化的优化。本方案还是相比于本领域已知的蛋白纯化的普通方式即匀浆化,具有益处的方案。比较感兴趣的蛋白DAS181通过匀浆化纯化与通过新颖增溶方案纯化后的质量、稳定性和完整性。本发明蛋白纯化方案在指定的时间窗口以指定浓度利用试剂。在下面讨论这些参数的优化。

[0081] 实施例1

[0082] 与去垢剂增溶相比由匀浆化产生的蛋白产率和质量

[0083] 进行了广泛的研究以优化用于从细胞原位释放感兴趣的蛋白DAS181 的增溶,作为包括机械匀质化的方案的改进的替代。与匀浆化比较增溶将通过允许从细胞释放DAS181而没有细胞分离、细胞洗涤、重悬和匀浆化的步骤来减少处理时间。实施例1的细节描述了与匀浆化方法比较的增溶方法和关于蛋白产率与纯化的蛋白的质量的随后的结果。在图2中展示了描述增溶和匀浆化两者的方法的流程图。

[0084] 方法

[0085] 在诱导24小时后收获发酵物20100201F2(F2)和20100201F3(F3)。将发酵物混合并分成两个等分试样。每个等分试样经历增溶方法或匀质化方法进行。

[0086] 通过匀浆化方法制备:将一个等分试样(A)离心以除去培养基。沉淀的细胞在包含50mM磷酸钾和200mM NaCl,pH 8的缓冲液中悬浮,并随后在冰上以15,000psi经历两次匀浆化。然后在环境温度下保持匀浆直到进一步处理。随后用聚乙烯亚胺(PEI;储备溶液10%PEI,pH 8)处理匀浆至 0.5%的最终浓度并保持在环境温度下。

[0087] 通过增溶方法制备:将第二个等分试样(B)原样返回至培养箱用于在 30℃下去垢剂增溶。在缓慢搅拌下将七水合磷酸氢二钠与1M EDTA(在 pH8.7下无酸)分别添加至50mM和100mM的最终浓度。用50%HCl将 pH调整至6.0并增加搅拌。允许孵育混合物一小时,然后将SDS和Triton X-100分别添加至0.3%和5%的最终浓度。去垢剂增溶6小时后,将溶解裂解物(solubilysate)的温度降至22℃,在此后,将10%PEI,pH 6添加至 0.5%的最终浓度。

[0088] 下一步,等同地处理两个等分试样。边搅拌边孵育等分试样A和B过夜。随后使用50%HCl将匀浆滴定至pH 6并允许摇动大约5小时。将两个等分试样离心并使用进一步的纯化方法过滤上清液。用H2O将澄清的去垢剂溶解的DAS181 1:1稀释并经历额外的纯化方法。将匀浆纯化,而无需负载进一步纯化的产物的稀释。样品在每个步骤经历OD600nm和DTM CEX-HPLC的测量以推断产率和质量。

[0089] 利用DAS181参考材料作为标准用于下面的测定。使用常规的均质蛋白纯化方法纯化Das181参考材料。纯化的DAS181以其活性形式存在。

[0090] 结果

[0091] 在进一步纯化之前和之后确定PEI处理后的离心的裂解物的浊度。在连续流动离心后,发现两个裂解物浊度相似,OD600nm为大约0.9。在进一步纯化后,观察到澄清的匀浆的浊度是0.1,而澄清的去垢剂材料的浊度是0.2。在匀浆材料中观察到的降低的浊度归因于与在增溶方法的去垢剂步骤中的pH 6相比较,其在pH 8进行PEI步骤。另外,由于匀浆材料需要在离心前滴定至pH 6,该材料随时间较不稳定。在RT和4℃下保持的澄清的匀浆材料24小时后浊度从0.1增加到0.2,而澄清的去垢剂材料的浊度保持不变。

[0092] 对于如在表1中所示,两种裂解方法在每个过程步骤的产率是非常相似的。去垢剂增溶步骤导致83%全部细胞蛋白量被释放,然而匀浆化步骤产生了92%。然而,在预-匀浆化细胞离心步骤中观察到了损耗。因此,从发酵到匀浆化的产率是85%。PEI沉淀后与匀浆的每个柱步骤后的产率相似。匀浆化的总产率是48%,而去垢剂增溶的产率是44%。

[0093] 表1:来自匀浆化和新的增溶方法的蛋白产率的比较

[0094]

	匀浆化		增溶	
处理中间体	步骤产率	总产率	步骤产率	总产率
收获	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
细胞沉淀	92.8%	92.8%		
裂解物	91.7%	85.1%	83.3%	83.3%
PEI澄清的裂解物	89.6%	76.3%	90.5%	75.3%
过滤的裂解物	97.8%	74.6%	97.2%	73.2%
SP负载	100.0%	74.6%	95.0%	69.6%
SP流-通	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
SP洗脱物	107.6%	80.3%	107.8%	75.0%
HIC FT池	86.3%	69.3%	86.0%	64.5%
Post-HIC TFF	98.4%	65.0%	96.3%	59.8%
RPC FT池	98.2%	48.3%	75.0%	43.7%

[0095] 进行进一步纯化并在表2中显示了产物质量结果的总结。显示出匀浆化和去垢剂

增溶的最终产物分别是99.9％和99.8％单体。匀浆的纯度是 97.9％，而去垢剂池的纯度是98.4％。进一步纯化显示了匀浆RT FT池是 6.5％峰F，12.6脱酰胺的(峰C)，和81.0％主峰(峰A)。去垢剂池是7.3％峰F，8.2％脱酰胺的(峰C)，和84.5％主峰(峰A)。脱氨基作用的差异可能是由于去垢剂方法在pH 6下发生，然而匀浆化在pH 8下发生。

[0096] 表2:在匀浆化和新方法‘增溶’之间的DAS181质量总结比较

[0097]

进一步的蛋白纯化方法:	匀浆			溶解裂解物		
	SP洗脱物	HIC FT	RP FT	SP洗脱物	HIC FT	RP FT
1	6.2%	6.1%	6.5%	6.2%	6.5%	7.3%
2	11.4%	12.0%	12.6%	6.9%	7.5%	8.2%
3	82.4%	81.9%	81.0%	86.9%	86.0%	84.5%
4	95.1%	96.4%	97.9%	95.9%	97.7%	98.4%
5	97.5%	98.8%	99.9%	97.8%	99.4%	99.8%
6	53800.0	1700.0	227.0	25700.0	39.0	BLQ

[0098] 还对来自每种裂解方法的柱级分进行使用进一步纯化的分析，并概括于表2中。匀浆SP洗脱物包含超过去垢剂SP洗脱物几乎两倍量的HCP。进一步纯化后的匀浆包含超过40倍的HCP量。进一步外纯化后的匀浆分别包含227ng/mg HCP和≤16ng/mg(BLQ)。

[0099] SDS-PAGE分析表明从匀浆化产生的SP洗脱物表现略微不如去垢剂 SP洗脱物纯(图3A-3C)。总体来说，从两种裂解方法产生的样品是相似的。来自匀浆化和去垢剂增溶的终池分别与在图3A、3B和3C的泳道9、10 和8中所呈现的DAS181参考标准相一致。

[0100] 结论是，源于去垢剂增溶方法和匀浆化的总产率和产物质量相当，不同之处是源于匀浆化方法的裂解物中宿主细胞杂质的存在。这些观察表明减少的处理时间、增强的处理稳健性和可能减少的宿主细胞杂质暗示去垢剂增溶是匀浆化蛋白纯化的可行的替代。这些结果证明了去垢剂增溶方法的进一步测试和优化是合理的。

[0101] 实施例2

[0102] 蛋白表达与纯化的去垢剂增溶的优化

[0103] 新颖去垢剂增溶方案的优化保证DAS181药物物质纯度是足够的和可重复的。使用离液剂、胍代替NaCl做出了更高效率地SP捕获柱的清洗以保证足够的再生。另外，通过在负载琼脂糖树脂之前增加离心上清液的稀释改进SP洗脱物中的DAS181回收。用增加负载容量进一步优化利用 Hexyl-650C树脂的疏水相互作用色谱。使用多通道强阴离子交换树脂的单色谱操作替代过滤和精制(polishing)步骤。

[0104] 方法

[0105] 诱导24小时后收获发酵样品20110523F2和20110613F2。将搅拌设定在250rpm。将七水合磷酸氢二钠与在pH 8.7下无酸的1M EDTA添加至 50mM和100mM的最终浓度。将搅拌增加至350rpm并且通过添加磷酸将pH调整至6.0。将混合物孵育一小时，然后将搅拌增加至400rpm并将 SDS和Triton X-100分别添加至0.1％和7％的最终浓度。在去垢剂透化作用三小时后，将透化裂解物(permeabilysate)的温度降低至22℃。将百分之十(10％)PEI，pH 6添加至0.5％的最终浓度。将材料孵育6小时然后分离。使用进一步纯化方法过滤所得的上清液。将澄清的去污剂透化裂解物以 125％体积稀释至最终2M尿素浓度。

[0106] 结果

[0107] 最终的优化的回收和纯化过程总结于图4中。平行进行和分析新颖去垢剂方案的

两个独立的运行(运行A和运行B)以推断方案的优化。通过来自运行A(图5A-5C)和运行B(图5D-5F)的纯化中间体的考马斯蓝、银染和蛋白印迹分析的SDS-PAGE显示了随着纯化进行纯度逐步地增加。从运行 A和运行B纯化的最终DAS181药物物质与通过用考马斯蓝的SDS-PAGE 检测的DAS181参考标准相当。然而,银染检测揭示了来自运行A和B的样品的主带下面的几条代表杂质的轻微染色的带。相反地,运行A和B比参考标准具有更低量的高分子量杂质。这些带通过考马斯染色检测均不可见。增加SDS-PAGE/考马斯蓝分析的蛋白负载(图6A)揭示了来自运行A 和B的药物物质与参考标准相当。揭示了一条在50kDa附近的主DAS181带,然而对比-增强特写(close-up)揭示了紧接着每个负载的样品的主带下面的次带。这可能是过负载凝胶的伪影(artifact)。负载不同数量的参考标准(8 ng至20μg)的不同的凝胶证明用胶体蓝染色的SDS PAGE可检测到低至20 ng的蛋白负载(图6B)。负载20μg来自运行A和B的药物物质的泳道未显示用胶体蓝检测的其他可见带(图5)。因此,由于达到20ng水平的带可通过胶体考马斯蓝染色而可视化,使用银染在药物物质泳道中检测到的次杂质带占少于0.1%的样品负载(图5A-5F)。

[0108] 进一步纯化后的聚集分析揭示了来自运行A和B的药物物质分别为 99.8%和99.9%单体(表3)。

[0109] 表3:来自替代性的进一步纯化的产物的分析比较

[0110]

样品	SEC-HPLC (%单体)	
	3号运行20110523F2	4号运行20110613F2
SP洗脱物	99.6%	99.7%
HIC FT	99.8%	99.8%
UF/DF 1号池	99.7%	99.8%
Capto Adhere FT pH 7.7	99.7%	99.7%
滴定的 Capto Adhere FT pH 5.0	99.8%	99.9%
药物物质	**99.8%**	**99.9%**

[0111] 通过进一步纯化的纯度分析确定了来自运行A和B的最终药物物质分别为97.1%和96.7%纯(图4)。

[0112] 表4:来自替代性的进一步纯化的产物的分析比较

[0113]

样品	RP-HPLC (%纯度)	
	3号运行20110523F2	4号运行20110613F2
SP洗脱物	94.5%	94.5%
HIC FT	94.8%	93.4%
UF/DF 1号池	93.9%	93.9%
Capto Adhere FT pH 7.7	97.8%	96.8%
滴定的 Capto Adhere FT pH 5.0	97.6%	96.6%
药物物质	**97.1%**	**96.7%**
DAS181 2期参考标准 Lot 46-012	94.2%	94.5%

[0114] 用于运行A和B的优化的过程参数导致来自进一步纯化杂质峰的减小的峰面积和样品量(图7A-7C)。另外,来自1号至4号运行的药物物质样品的主DAS181峰的肩落(shoulder off)不如参考标准明显。

[0115] 通过进一步纯化方法获得的DAS181纯度和变体的分析显示了来自小规模(bench-

scale)的整合的运行A和B的最终药物物质的色谱曲线与DAS181参考标准相当(图8),不同之处是脱酰胺作用中的差异。在来自运行A和B的药物物质中观察到了脱酰胺的DAS181(峰C)的增加(29.6± 2.4%,与在13.2±0.1%的参考标准相比)。还观察到了DAS181的相应减少(峰A)。确定了来自运行A和B的峰A分别是62.3%和65.4%(表5)。

[0116] 表5:CEX-HPLC分析比较

[0117]

CEX-HPLC (%峰面积)					
3号运行Ferm 20110523F2					
样品	A	C	F	1	4
SP洗脱物	76.7%	17.2%	3.0%	1.8%	1.3%
HIC FT	75.9%	17.9%	3.0%	1.8%	1.3%
UF/DF 1号池	76.7%	17.3%	3.0%	1.8%	1.2%
Capto Adhere FT pH 7.7	60.9%	33.5%	3.4%	1.4%	0.8%
滴定的 Capto Adhere FT pH 5.0	63.7%	30.8%	3.2%	1.6%	0.8%
药物物质	**62.3%**	**31.9%**	**3.3%**	**1.6%**	**0.9%**
DAS181 2期参考标准 Lot 46-012	75.1%	13.3%	5.9%	4.5%	1.1%

[0118]

4号运行Ferm 20110613F2					
样品	A	C	F	1	4
SP洗脱物	75.8%	17.4%	5.2%	0.7%	0.9%
IIIC FT	76.1%	16.6%	5.3%	1.0%	0.9%
UF/DF 1号池	76.6%	16.3%	5.3%	1.0%	0.8%
Capto Adhere FT pH 7.7	64.0%	28.6%	5.7%	1.1%	0.7%
滴定的 Capto Adhere FT pH 5.0	63.0%	26.5%	5.4%	1.1%	4.1%
药物物质	**65.4%**	**27.2%**	**5.7%**	**1.2%**	**0.5%**
DAS181 2期参考标准 Lot 46-012	75.9%	13.1%	6.1%	4.1%	0.8%
DAS181 3期参考标准 Lot 750-0406-002 (分析的 19 Aug 10)	46.9%	49.2%	ND	1.0%	1.5%

[0119]

[0120] 这些值比DAS181参考标准略低,其具有75.5±0.4%峰A。DAS181 脱酰胺作用中的增加归因于用于进一步纯化方法特别需要的高pH环境。当pH从初始pH 5.0持续6-7小时保持在7.7时峰C的面积百分比增加了两倍。由于许多1期过程步骤在pH 8.0下进行,用于1期临床试验的药物物质为~49%(表5,图8A-8C)。

[0121] 代表错误折叠的DAS181的峰1的面积在运行A和B中比在参考标准中更少。运行A和B药物物质的峰4和峰F的面积百分比与参考标准一致。

[0122] 运行A和B中产生的最终药物物质的进一步纯化的分析分别测量为 15ng/mg和33ng/mg(表6)。这些值低于或接近该测定的定量限度(16 ng/mg)。最终药物物质的进一步纯化的产物水平被确定为与在替代性纯化的产物中所发现的水平几乎相同。

[0123] 表6:进一步纯化的产物的ELISA分析比较

[0124]

	HCP (ng HCP/mg DAS181)	
样品	3号运行20110523F2	4号运行20110613F2
SP洗脱物	22,688	19,638
HIC FT	161	161
UF/DF 1号池	162	150
Capto Adhere负载	159	121
Capto Adhere FT pH 7.7	41	37
滴定的 Capto Adhere FT pH 5.0	176	1,723
药物物质	**15**	**33**

[0125] 唾液酸酶比活性的分析显示了在运行A和B中产生的最终药物物质分别为827U/mg和847U/mg(表7)。唾液酸酶比活性与与样品一起运行用于质量控制的DAS181参照标准(826U/mg)相当。

[0126] 表7:唾液酸酶活性分析比较

[0127]

	比活性(U/ mg DAS181)	
样品	3号运行20110523F2	4号运行20110613F2
SP洗脱物	617	694
HIC FT	608	718
UF/DF 1号池	677	669
Capto Adhere负载	724	757
Capto Adhere FT pH 7.7	737	656
滴定的 Capto Adhere FT pH 5.0	574	609
药物物质	**827**	**847**

[0128] 小规模整合的运行A和B中产生的最终药物物质的内毒素分析分别测量为0.018EU/mg和0.043EU/mg(表8)。DAS181药物物质的内毒素规格为0.5EU/mg。从两个运行产生的药物物质的内毒素水平远低于该最大值。运行A和B分别仅为规格限度的3.5％和8.7％。

[0129] 表8:LAL显色的内毒素分析比较

[0130]

	内毒素 (EU/mg DAS181)	
样品	3号运行 20110523F2	4号运行 20110613F2
SP洗脱物	1.368	0.240
HIC FT	0.093	0.126
UF/DF 1号池	0.003	0.003
Capto Adhere 负载*	0.004	0.006
Capto Adhere FT pH 7.7	0.006	0.006
滴定的Capto Adhere FT pH 5.0	0.048	0.010
药物物质	**0.018**	**0.043**

[0131] *3号运行显示了Capto Adhere负载调节缓冲液的内毒素测量。

[0132] 以小规模整合的运行A和B获得的DAS181纯化回收产率分别为 45.9％和55.0％(表89。总产率大大地受通过细胞透化作用和澄清回收的DAS181释放的性能的影响,且在色谱操作期间损失最小量的DAS181材料。预计的(projected)步骤产率不满足初级回收,但高于纯化操作所预计的。总计,初级回收后,DAS181回收率减少了3.9±1.5％。

[0133] 表9:整合的运行A和B DAS181回收产率与预计步骤产率

[0134]

样品	预计步骤产率	3号运行20110523F2		4号运行20110613F2	
		步骤产率	总产率	步骤产率	总产率
收获	70.8%	100%	100.0%	100%	100.0%
去垢剂透化裂解物		39.6%	30.6%	45.2%	45.2%
PEI透化裂解物		171.5%	67.9%	194.1%	87.8%
澄清的透化裂解物		72.8%	49.5%	71.8%	63.0%
D0HC-过滤的透化裂解物		97.7%	48.3%	95.9%	60.4%
SP负载(125%稀释,2 M尿素)	95.0%	-	48.3%	-	60.4%
FT		0.6%	0.3%	0.0%	0.0%
UTSP洗涤		2.1%	1.0%	0.3%	0.2%
SP洗脱物		112.3%	54.2%	112.3%	67.9%
HIC负载	95.0%	-	54.2%	-	67.9%
HIC FT		105.9%	57.5%	105.9%	71.8%
UF/DF 1号池pH 5.0	95.0%	87.8%	50.4%	88.5%	63.5%
滴定的UF/DF1号池 pH 7.7	99.0%	99.5%	50.2%	101.3%	64.3%
Capto Adhere负载 pH 7.7	99.0%	-	50.2%	-	64.3%
Capto Adhere FT pH 7.7		94.5%	47.4%	91.6%	58.9%
滴定的 Capto Adhere FT pH 5.0	99.0%	97.7%	46.3%	97.6%	57.4%
药物物质(UF/DF 2号池)	90.0%	99.3%	**45.9%**	95.7%	**55.0%**

[0135] 运行A和B的进一步纯化的产物的回收率为93.1±1.5%。这是相对于1号和2号运行中使用的替代性进一步纯化的产物的产物(产生了89.9 ±2.4%的回收率)的改进。UF/DF 1号操作的产率低于所有小规模整合的运行预期的产率～88-90%。对于全部色谱操作,预计的步骤产率都是领先的。

[0136] 结论是在纯度、纯化回收产率和活性方面,用改进的参数优化的所推荐的DAS181 3期纯化过程产生了与DAS181参考相当或在一些情况下好于DAS181参考的药物物质。用Capto Adhere色谱代替RP色谱校正了以前所经历的低RP-HPLC纯度问题。

[0137] 实施例3

[0138] 优化用于去垢剂增溶蛋白纯化的试剂的参数

[0139] 测定和比较去垢剂增溶方案的不同试剂的不同参数用于基于蛋白产率的测定的优化。首先,选择评价多种Triton浓度与有限范围的SDS浓度组合用于DAS181回收产率。另外,磷酸钠与EDTA的多种组合在pH 6 下预处理对通过使用7%Triton X-100和0.1%SDS的去垢剂透化作用的 DAS181回收的影响。另外,确定PEI处理的持续时间是否影响在室温下保持时间延长多达5天期间的DAS181的特性。最后,评估在4℃下储存的DAS181的澄清的去垢剂透化裂解物的稳定性并用于在大规模生产的SP 色谱之前确定可允许的保持时间。

[0140] 方法

[0141] 去垢剂浓度分析:将发酵物等分并经历去垢剂增溶纯化。

[0142] 以不同浓度添加去垢剂并在30℃下搅拌6小时。使上清液经历阳离子交换HPLC。确定峰A、C和F的相对峰面积(总峰面积的%)。通过ECX 总峰面积与已知浓度的标准的比较确定DAS181浓度,并将该浓度标准化为按通过唾液酸酶测定所确定的发酵收获产率以产生回收率(收获的%)。通过添加10%PEI(在50mM磷酸钾、200mM NaCl中,最终pH 6.0)澄清选择去垢剂溶解的样品至达到0.48%的最终PEI浓度。使上清液经历浊度测量和进一步的纯化。

[0143] 磷酸钠和EDTA预处理分析:

[0144] 诱导24小时后收获发酵物。以不同的浓度组合添加七水合磷酸氢二钠和在pH 8.7下的无酸EDTA。使样品经历去垢剂增溶方案。将上清液经历阳离子交换HPLC。确定峰A、C和F

的相对峰面积(总峰面积的%)。通过总峰面积与已知浓度的标准的比较确定DAS181浓度，并将该浓度标准化为发酵收获产率以产生回收率(收获的%)。

[0145] PEI澄清的透化裂解物浓度的评价：

[0146] 诱导24小时后收获发酵物。使样品经历去垢剂增溶方案。添加PEI 至0.5%的最终浓度。以不同的时间间隔从发酵罐取出样品。使上清经历 OD测量和进一步的纯化方法。

[0147] PEI澄清的透化裂解物储存时间的评价：在本研究中使用的起始材料是来自发酵运行的进一步纯化的透化裂解物。这些样品经历进一步的纯化方法。

[0148] 结果

[0149] 去垢剂浓度分析：在去垢剂增溶方案期间以不同的浓度组合添加去垢剂Triton和SDS。在表8中总结了DAS181产率的结果。

[0150] 表8：用Triton和SDS的不同的浓度组合处理后的DAS181释放

[0151]

%Triton	%SDS									平均值	标准差
	0	0.1	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5		
1	69.8%	59.2%	56.4%	51.1%	59.7%	52.7%	50.1%	50.8%	55.1%	56.1%	6.3%
2	67.7%	62.0%	60.6%	65.4%	61.3%	59.9%	60.1%	65.0%	64.8%	63.0%	2.8%
3	71.5%	66.8%	61.98	63.8%	62.1%	62.6%	65.7%	62.8%	62.9%	64.5%	3.1%
4	64.4%	68.7%	61.4%	65.7%	70.7%	56.8%	56.3%	57.4%	61.1%	62.5%	5.2%
4.5	77.2%	67.2%	60.1%	61.4%	65.8%	59.2%	72.6%	70.8%	73.1%	67.5%	6.4%
5	72.3%	64.6%	65.9%	67.1%	71.4%	67.8%	69.5%	68.9%	67.6%	68.3%	2.4%
5.5	61.3%	71.9%	74.2%	70.5%	63.9%	66.2%	66.7%	64.1%	65.3%	67.2%	4.2%
6	64. %	73.3%	74.5%	64.7%	64.7%	65.6%	74.1%	61.2%	62.7%	67.3%	5.2%
7	63.1%	79.8%	72.3%	74.9%	67.6%	71.44	71.1%	69.5%	66.7%	70.7%	4.9%
8	74.3%	74.6%	75.1%	75.9%	72.1%	73.7%	71.0%	72.4%	72.3%	73.4%	1.6%

[0152]

%Triton	%SDS								平均值	标准差
	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.5		
5	80.5%	76.0%	74.0%	75.6%	91.5%	76.5%	54.4%	70.3%	74.8%	10.4%
6	77.9%	78.1%	77.4%	75.7%	73.7%	77.6%	71.4%	69.5%	75.2%	3.3%
7	76.6%	76.8%	76.4%	73.2%	72.9%	71.4%	74.5%	70.6%	74.0%	2.4%
8	75.7%	73.2%	77.1%	73.8%	72.1%	73.8%	71.2%	73.3%	73.8%	1.9%
9	77.3%	79.6%	72.2%	74.0%	75.1%	74.7%	76.3%	75.6%	75.6%	2.2%
10	78.1%	75.9%	77.3%	75.5%	69.4%	68.2%	71.7%	71.7%	73.5%	3.7%
11	69.0%	70.2%	66.7%	69.7%	72.4%	70.7%	71.8%	67.4%	69.7%	2.0%
12	73.8%	68.3%	71.7%	73.4%	69.1%	67.5%	67.8%	69.5%	70.1%	2.5%
13	71.9%	71.8%	69.2%	65.0%	70.4%	69.3%	66.2%	65.5%	68.7%	2.8%
14	68.7%	62.2%	58.3%	65.0%	62.6%	68.7%	67.8%	61.3%	64.3%	3.8%
15	69.8%	66.6%	68.1%	66.1%	67.7%	66.1%	63.9%	60.4%	66.1%	2.9%

[0153] 随着Triton X-100浓度从1%增加到8%，不存在随SDS浓度变化的 DAS181产率的明显趋势，表明尽管SDS自身是关键因素，SDS并不作为其浓度因素影响产率。在8%Triton X-100下，回收率存在明显增加，标准偏差较小，跨越所有SDS浓度的平均产量回收率为73%。因此研究了更高的浓度。注意到了来自5-9%Triton X-100的稳定的产率。在浓度大于9% Triton X-100下产率开始降低。还注意到在较高SDS浓度下DAS181产率降低的趋势。在取样中观察到包含>9%Triton X-100的去垢剂处理比具有较低Triton X-100浓度的样品更粘。

[0154] 尽管在测定中存在变化，用PEI处理的样品显示了在5-9%的Triton X-100浓度下的一致产率。用10%及更高的Triton X-100观察到了产率轻微的下降。从利用增加的

Triton X-100浓度的方案分离的样品中观察到了整体增加的浊度。(表10)。

[0155] 表10:用于不同浓度的去垢剂组合在PEI处理后的DAS回收率

[0156]

PEI澄清的样品		
样品	%回收率	$O.D_{600nm}$
5.0 % Triton / 0.15 % SDS	66.3	0.216
6.0 % Triton / 0.15 % SDS	62.3	0.225
7.0 % Triton / 0.15 % SDS	60.7	0.243
8.0 % Triton / 0.15 % SDS	59.7	0.237
9.0 % Triton / 0.15 % SDS	64.2	0.332
10.0 % Triton / 0.15 % SDS	58.7	0.399
11.0 % Triton / 0.15 % SDS	56.9	0.415
12.0 % Triton / 0.15 % SDS	57.3	0.531
13.0 % Triton / 0.15 % SDS	57.7	0.533
14.0 % Triton / 0.15 % SDS	54.1	0.732
15.0 % Triton / 0.15 % SDS	54.5	0.763

[0157] 结论是最佳的Triton X-100浓度为在5-8%之间,证明过程对Triton浓度耐受。DAS181产率从5%到10%Triton X-100是一致的,而浊度从5%到8%Triton X-100是一致的。这些数据支持Triton X-100以5-8%的范围与0.05-0.2%SDS组合使用。

[0158] 磷酸钠与EDTA预处理分析:

[0159] 数据显示了,随着七水合磷酸氢二钠与EDTA组合浓度增加,DAS181 释放总体增加(表11)。另外,在pH 6透化作用前未接受预处理的对照样品中观察到很少乃至没有的DAS181释放。在pH 5下用选择的50mM磷酸钠和100mM EDTA的预处理浓度的预处理具有与在pH 6下的相同条件下大约相同的DAS181回收百分比(表11)。

[0160] 表11:不同的去垢剂透化剂对DAS181回收率的影响

[0161]

样品	NaPi(mM)	EDTA (mM)	%回收率(pH 6)		
			30 min	60 min	180 min
1	10	75	47.6%	49.4%	41.7%
2	50	75	50.6%	49.2%	52.5%
3	75	75	59.4%	58.8%	60.2%
4	25	90	54.4%	56.4%	55.4%
5	50	90	59.5%	55.2%	59.6%
6	75	90	57.5%	56.4%	63.2%
7	10	100	53.8%	52.1%	56.8%
8	25	100	55.7%	56.0%	61.5%
9	50	100	60.0%	58.3%	68.3%
10	75	100	59.3%	59.3%	68.1%
11	100	100	60.8%	62.7%	65.4%
12	25	125	58.9%	54.8%	58.8%
13	50	125	60.6%	60.6%	59.6%
14	75	125	60.1%	61.1%	58.8%
15	10	200	64.9%	64.3%	64.9%
16	50	200	62.9%	67.3%	65.4%
17	100	200	61.9%	87.6%	63.2%
18	0	0	2.3%	2.2%	0.0%
19 (pH 5.0)	50	100	58.5%	63.3%	59.6%
20 (pH 8.0)	50	100	53.2%	61.3%	54.5%

[0162] 结论是,磷酸钠与EDTA的预处理组合是允许释放DAS181的 pDAS181大肠杆菌的有效的Triton X-100和SDS透化作用所需要的。总体上,这些观察表明了去垢剂透化作用在宽范围的磷酸钠及EDTA浓度、pH 条件及孵育时间内是稳健的。选择在pH 6下50mM磷酸钠及100mM EDTA的组合作为最佳的预处理浓度。

[0163] PEI澄清的透化裂解物的评价:

[0164] 在室温下保持的来自PEI处理的澄清的上清液随延长的保持时间浊度增加(表12)。在具有最短的PEI处理时间的样品中浊度的增加最大,且在具有较长的PEI处理时间的样品中浊度变化最小;确认了较长的PEI处理时间导致具有减少的沉淀形成的澄清的材料。PEI处理>7小时导致24小时内最小的浊度增加,且PEI处理>20小时导致直至为120小时的测量最长持续时间内最好的稳定性(OD600nm<2.0)。PEI处理<6小时导致在120 小时浊度为OD600nm>3.0,且当与PEI处理>7小时相比时在24小时浊度轻微地增加。

[0165] 在PEI处理和离心后立即确定DAS181回收率。回收率范围为从81%到95%(表4和图2)。大多数样品点具有在83%到89%之间的一致回收率。通过快速CEX-HPLC测定测量的DAS181变体的比率(峰A、C和F)在测定误差内是恒定的(表13)。对所有PEI处理,主DAS181峰(A)在79.93%和81.63%之间。峰C在10.20%和12.06%之间,且峰F范围在7.81%和8.91%之间。这些数据显示长PEI处理时间不对DAS181产物质量产生不利影响。

[0166] 表12:PEI处理持续时间和澄清后保持时间对透化裂解物浊度的影响

[0167]

PEI处理后保持.(小时)	0.5% PEI处理(小时)													
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	20	24
0	0.20	0.22	0.24	0.27	0.27	0.27	0.28	0.33	0.29	0.27	0.26	0.27	0.32	0.35
24	0.91	0.92	0.90	0.95	0.90	0.93	0.80	0.75	0.74	0.74	0.69	0.71	0.69	ND
48	2.99	2.81	2.23	2.42	1.62	2.45	2.12	ND	ND	ND	ND	ND	1.72	1.68
120	3.07	3.53	2.89	3.14	3.25	3.23	3.00	ND	ND	ND	ND	ND	1.90	1.90

[0168] ND＝未确定

[0169] 表13:PEI处理后立即得到的DAS181回收率及DAS181变体水平

[0170]

测量的参数	0.5% PEI处理(小时)													
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	20	24
DAS181%回收	81%	86%	88%	95%	83%	84%	86%	87%	88%	85%	87%	87%	87%	88%
峰A	81.43%	80.49%	81.02%	80.60%	80.00%	81.08%	80.31%	80.38%	81.47%	81.49%	81.49%	80.89%	79.93%	81.63%
峰C	10.20%	10.77%	10.33%	10.73%	11.21%	10.27%	10.79%	10.86%	10.37%	10.49%	10.41%	10.67%	12.08%	10.55%
峰F	8.37%	8.74%	8.65%	8.67%	8.79%	8.65%	8.91%	8.76%	8.16%	8.02%	8.10%	8.44%	8.01%	7.81%

[0171] 结论是,在室温下24小时的保持时间后,澄清的透化裂解物浊度在所有处理时间保持低,但对于时间≥6小时是最低的。在48小时保持后,较长PEI处理的浊度增加是最少的。DAS181变体的比率不随PEI处理持续时间而变化。这些数据表明超过6小时的PEI处理时间允许至少24小时的良好的蛋白稳定性。该研究还表明PEI澄清的上清液可保持至少24 小时而不影响过滤性。

[0172] PEI澄清的透化裂解物储存时间的评价:

[0173] 额外纯化的澄清的去垢剂透化裂解物的浊度在4℃下储存1周后不增加(表14)。浊度从1周到2周增加了46%且从2周到3周约7%。

[0174] 表14:澄清的去垢剂渗透裂解物的浊度

[0175]

澄清的去垢剂透化裂解物	浊度(OD_{600})
T＝0	0.66
在4℃下1周	0.68
在4℃下2周	1.25
在4℃下3周	1.34

[0176] SP FF色谱回收率如每个运行的预期一样,在针对FT和UTSP洗涤的 DAS181的损失中具有一些可变性(表15)。在进一步纯化后观察到大约 5-6%的损失,而在进一步纯化后几乎没有观察到DAS181。

[0177] 表15:来自进一步纯化的产物的分析比较的产率和质量平衡

[0178]

澄清的去垢剂透化裂解物	流-通(FT)	UTSP洗涤	EP洗脱物	质量平衡
T=0	0.6%	2.1%	112.3%	114.8%
在4℃下1周	5.5%	3.8%	97.2%	106.5%
在4℃下2周	6.0%	3.5%	96.3%	105.8%
在4℃下3周	4.7%	0.2%	104.4%	109.3%

[0179] 通过另外的、替代性纯化方法的纯度分析显示了保持在4℃下1-3周后制备的SP洗脱物与新鲜原料制备的SP洗脱物相似(表16)。观察到了通过另进一步纯化的相对高的纯度。

[0180] 表16:进一步纯化后澄清的去垢剂透化裂解物稳定性总结

[0181]

澄清的去垢剂透化裂解物	EP洗脱物		
	RP-HPLC纯度	SEC-HPLC(%单体)	HCP(ng/mg)
T=0	94.5%	99.8%	22,688
在4℃下1周	95.5%	99.7%	9,692
在4℃下2周	94.4%	99.7%	8,950
在4℃下3周	94.4%	99.8%	12,120

[0182] 进一步纯化后的结果揭示了如通过储存2周后产生的SP洗脱物中的增加的峰C百分比观察到的DAS181的脱氨基作用的轻微增加(表16)。该脱氨基作用的程度与进一步纯化的最近的小规模整合的运行样品一致,所述进一步纯化可全部被有效地认为是用于澄清的去垢剂透化裂解物储存的T=0样品。SDS-PAGE分析显示了在替代性进一步纯化的产物之间的一致的稳定性(图9)。在4℃下储存1、2和3周后进一步纯化的样品杂质带强度呈现接近相同。T=0样品杂质呈现比其他样品更强,其可能是由于样品负载轻微较重。

[0183] 确定了从在4℃下保持多达3周的原料产生进一步纯化的样品的纯度没有减少。然而,CEXHPLC分析未显示储存2周后的脱酰胺作用(峰C) 的轻微增加。澄清的去垢剂透化裂解物在4℃下稳定多达一周,如通过获得的进一步纯化的样品的纯度所示。

[0184] DAS181序列

[0185] DAS181(无氨基末端Met)

[0186]

GDHPQATPAPAPDASTELPASMSQAQHLAANTATDNYRIPAITTAPNGDLLISYDERPKDNGNG
GSDAPNPNHIVQRRSTDGGKTWSAPTYIHQGTETGKKVGYSDPSYVVDHQTGTIFNFHVKSYDQ
GWGGSRGGTDPENRGIIQAEVSTSTDNGWTWTHRTITADITKDKPWTARFAASGQGIQIQHGPH
AGRLVQQYTIRTAGGAVQAVSVYSDDHGKTWQAGTPIGTGMDENKVVELSDGSLMLNSRASDGS
GFRKVAHSTDGGQTWSEPVSDKNLPDSVDNAQIIRAFPNAAPDDPRAKVLLLSHSPNPRPWSRD
RGTISMSCDDGASWTTSKVFHEPFVGYTTIAVQSDGSIGLLSEDAHNGADYGGIWYRNFTMNWL
GEQCGQKPAKRKKKGGKNGKNRRNRKKKNP (SEQ ID NO:1)

[0187] DAS181(具有氨基末端Met)

[0188]

MGDHPQATPAPAPDASTELPASMSQAQHLAANTATDNYRIPAITTAPNGDLLISYDERPKDNGN
GGSDAPNPNHIVQRRSTDGGKTWSAPTYIHQGTETGKKVGYSDPSYVVDHQTGTIFNFHVKSYD
QGWGGSRGGTDPENRGIIQAEVSTSTDNGWTWTHRTITADITKDKPWTARFAASGQGIQIQHGP
HAGRLVQQYTIRTAGGAVQAVSVYSDDHGKTWQAGTPIGTGMDENKVVELSDGSLMLNSRASDG
SGFRKVAHSTDGGQTWSEPVSDKNLPDSVDNAQIIRAFPNAAPDDPRAKVLLLSHSPNPRPWSR
DRGTISMSCDDGASWTTSKVFHEPFVGYTTIAVQSDGSIGLLSEDAHNGADYGGIWYRNFTMNW
LGEQCGQKPAKRKKKGGKNGKNRRNRKKKNP (SEQ ID NO:2)

[0189] 其他实施方案

[0190] 应当理解，虽然本发明结合其详细的描述被描述，前述的描述意图是说明而非限制本发明的范围，本发明的范围由所附权利要求书的范围限定。其他方面、优势、和修改在以下权利要求书的范围内。

序列表

<110> 安迅生物制药公司

<120> 蛋白纯化的新颖方法

<130> 21865-0016WO1

<140> PCT/US2014/027436

<141> 2014-03-14

<150> US 61/800,345

<151> 2013-03-15

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 414

<212> PRT

<213> DAS 181(无氨基末端Met)

<400> 1

Gly Asp His Pro Gln Ala Thr Pro Ala Pro Ala Pro Asp Ala Ser Thr
1 5 10 15
Glu Leu Pro Ala Ser Met Ser Gln Ala Gln His Leu Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Ala Thr Asp Asn Tyr Arg Ile Pro Ala Ile Thr Thr Ala Pro Asn Gly
35 40 45
Asp Leu Leu Ile Ser Tyr Asp Glu Arg Pro Lys Asp Asn Gly Asn Gly
50 55 60
Gly Ser Asp Ala Pro Asn Pro Asn His Ile Val Gln Arg Arg Ser Thr
65 70 75 80
Asp Gly Gly Lys Thr Trp Ser Ala Pro Thr Tyr Ile His Gln Gly Thr
85 90 95
Glu Thr Gly Lys Lys Val Gly Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Val Val Asp
100 105 110
His Gln Thr Gly Thr Ile Phe Asn Phe His Val Lys Ser Tyr Asp Gln
115 120 125
Gly Trp Gly Gly Ser Arg Gly Gly Thr Asp Pro Glu Asn Arg Gly Ile
130 135 140
Ile Gln Ala Glu Val Ser Thr Ser Thr Asp Asn Gly Trp Thr Trp Thr
145 150 155 160
His Arg Thr Ile Thr Ala Asp Ile Thr Lys Asp Lys Pro Trp Thr Ala
165 170 175
Arg Phe Ala Ala Ser Gly Gln Gly Ile Gln Ile Gln His Gly Pro His

180 185 190

Ala Gly Arg Leu Val Gln Gln Tyr Thr Ile Arg Thr Ala Gly Gly Ala
195 200 205

Val Gln Ala Val Ser Val Tyr Ser Asp Asp His Gly Lys Thr Trp Gln
210 215 220

Ala Gly Thr Pro Ile Gly Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val Val Glu
225 230 235 240

Leu Ser Asp Gly Ser Leu Met Leu Asn Ser Arg Ala Ser Asp Gly Ser
245 250 255

Gly Phe Arg Lys Val Ala His Ser Thr Asp Gly Gly Gln Thr Trp Ser
260 265 270

Glu Pro Val Ser Asp Lys Asn Leu Pro Asp Ser Val Asp Asn Ala Gln
275 280 285

Ile Ile Arg Ala Phe Pro Asn Ala Ala Pro Asp Asp Pro Arg Ala Lys
290 295 300

Val Leu Leu Leu Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Pro Trp Ser Arg Asp
305 310 315 320

Arg Gly Thr Ile Ser Met Ser Cys Asp Asp Gly Ala Ser Trp Thr Thr
325 330 335

Ser Lys Val Phe His Glu Pro Phe Val Gly Tyr Thr Thr Ile Ala Val
340 345 350

Gln Ser Asp Gly Ser Ile Gly Leu Leu Ser Glu Asp Ala His Asn Gly
355 360 365

Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg Asn Phe Thr Met Asn Trp Leu
370 375 380

Gly Glu Gln Cys Gly Gln Lys Pro Ala Lys Arg Lys Lys Lys Gly Gly
385 390 395 400

Lys Asn Gly Lys Asn Arg Arg Asn Arg Lys Lys Lys Asn Pro
405 410

<210> 2

<211> 415

<212> PRT

<213> DAS 181(带氨基末端Met)

<400> 2

Met Gly Asp His Pro Gln Ala Thr Pro Ala Pro Ala Pro Asp Ala Ser
1 5 10 15

Thr Glu Leu Pro Ala Ser Met Ser Gln Ala Gln His Leu Ala Ala Asn
20 25 30

Thr Ala Thr Asp Asn Tyr Arg Ile Pro Ala Ile Thr Thr Ala Pro Asn

35 40 45

Gly Asp Leu Leu Ile Ser Tyr Asp Glu Arg Pro Lys Asp Asn Gly Asn
50 55 60

Gly Gly Ser Asp Ala Pro Asn Pro Asn His Ile Val Gln Arg Arg Ser
65 70 75 80

Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp Ser Ala Pro Thr Tyr Ile His Gln Gly
85 90 95

Thr Glu Thr Gly Lys Lys Val Gly Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Val Val
100 105 110

Asp His Gln Thr Gly Thr Ile Phe Asn Phe His Val Lys Ser Tyr Asp
115 120 125

Gln Gly Trp Gly Gly Ser Arg Gly Gly Thr Asp Pro Glu Asn Arg Gly
130 135 140

Ile Ile Gln Ala Glu Val Ser Thr Ser Thr Asp Asn Gly Trp Thr Trp
145 150 155 160

Thr His Arg Thr Ile Thr Ala Asp Ile Thr Lys Asp Lys Pro Trp Thr
165 170 175

Ala Arg Phe Ala Ala Ser Gly Gln Gly Ile Gln Ile Gln His Gly Pro
180 185 190

His Ala Gly Arg Leu Val Gln Gln Tyr Thr Ile Arg Thr Ala Gly Gly
195 200 205

Ala Val Gln Ala Val Ser Val Tyr Ser Asp Asp His Gly Lys Thr Trp
210 215 220

Gln Ala Gly Thr Pro Ile Gly Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val Val
225 230 235 240

Glu Leu Ser Asp Gly Ser Leu Met Leu Asn Ser Arg Ala Ser Asp Gly
245 250 255

Ser Gly Phe Arg Lys Val Ala His Ser Thr Asp Gly Gly Gln Thr Trp
260 265 270

Ser Glu Pro Val Ser Asp Lys Asn Leu Pro Asp Ser Val Asp Asn Ala
275 280 285

Gln Ile Ile Arg Ala Phe Pro Asn Ala Ala Pro Asp Asp Pro Arg Ala
290 295 300

Lys Val Leu Leu Leu Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Pro Trp Ser Arg
305 310 315 320

Asp Arg Gly Thr Ile Ser Met Ser Cys Asp Asp Gly Ala Ser Trp Thr
325 330 335

Thr Ser Lys Val Phe His Glu Pro Phe Val Gly Tyr Thr Thr Ile Ala
340 345 350

Val Gln Ser Asp Gly Ser Ile Gly Leu Leu Ser Glu Asp Ala His Asn
355 360 365
Gly Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg Asn Phe Thr Met Asn Trp
370 375 380
Leu Gly Glu Gln Cys Gly Gln Lys Pro Ala Lys Arg Lys Lys Lys Gly
385 390 395 400
Gly Lys Asn Gly Lys Asn Arg Arg Asn Arg Lys Lys Lys Asn Pro
405 410 415

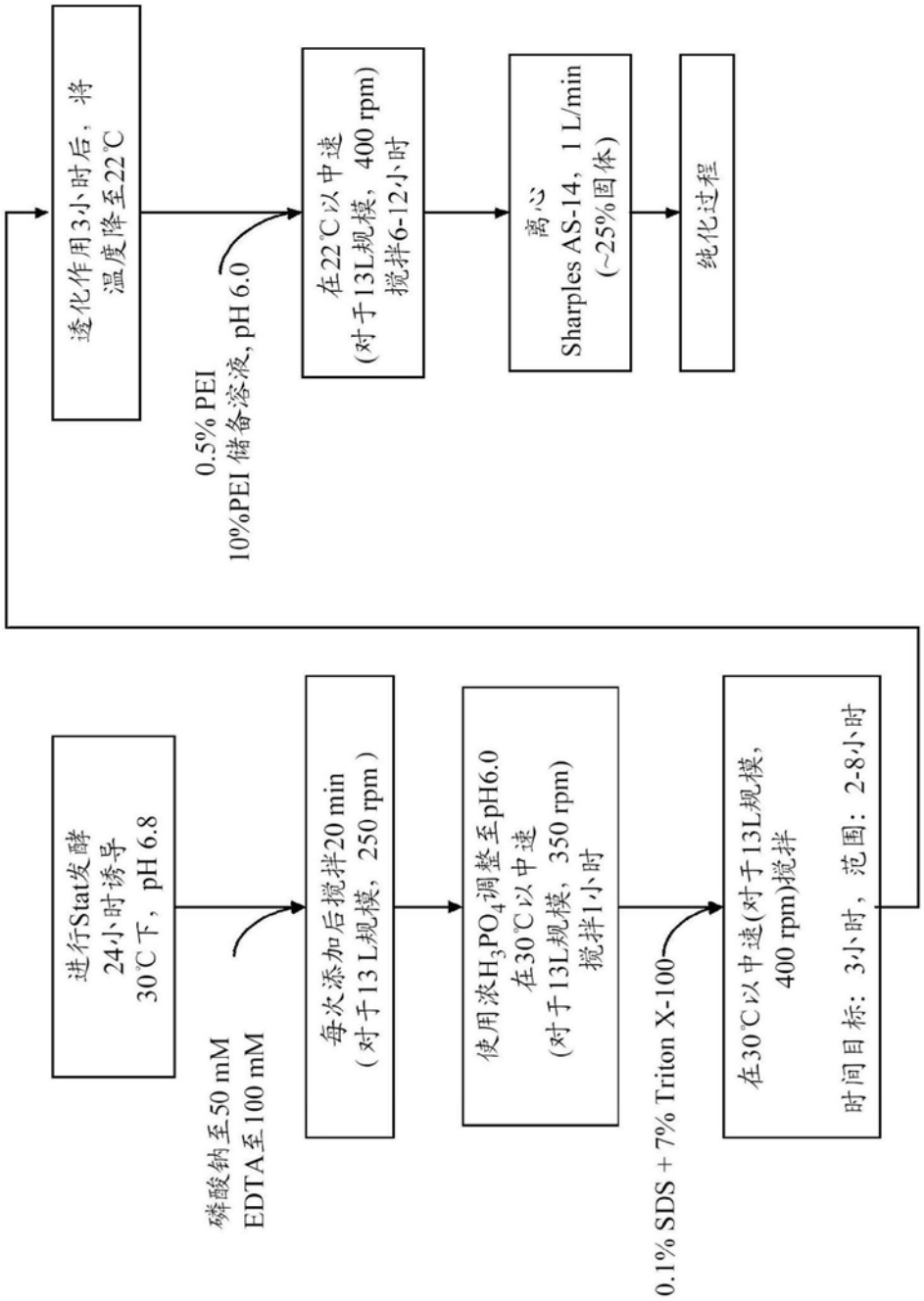

进行Stat发酵
24小时诱导
30℃下，pH 6.8
磷酸钠至50 mM
EDTA至100 mM
每次添加后搅拌20 min
（对于13 L规模，250 rpm）
使用浓H_3PO_4调整至pH6.0
在30℃以中速
(对于13L规模，350 rpm)
搅拌1小时
0.1% SDS + 7% Triton X-100
在30℃以中速(对于13L规模，
400 rpm)搅拌
时间目标：3小时，范围：2-8小时
透化作用3小时后，将
温度降至22℃
0.5% PEI
10%PEI 储备溶液, pH 6.0
在22℃以中速
(对于13L规模，400 rpm)
搅拌6-12小时
离心
Sharples AS-14，1 L/min
(~25%固体)
纯化过程

图1

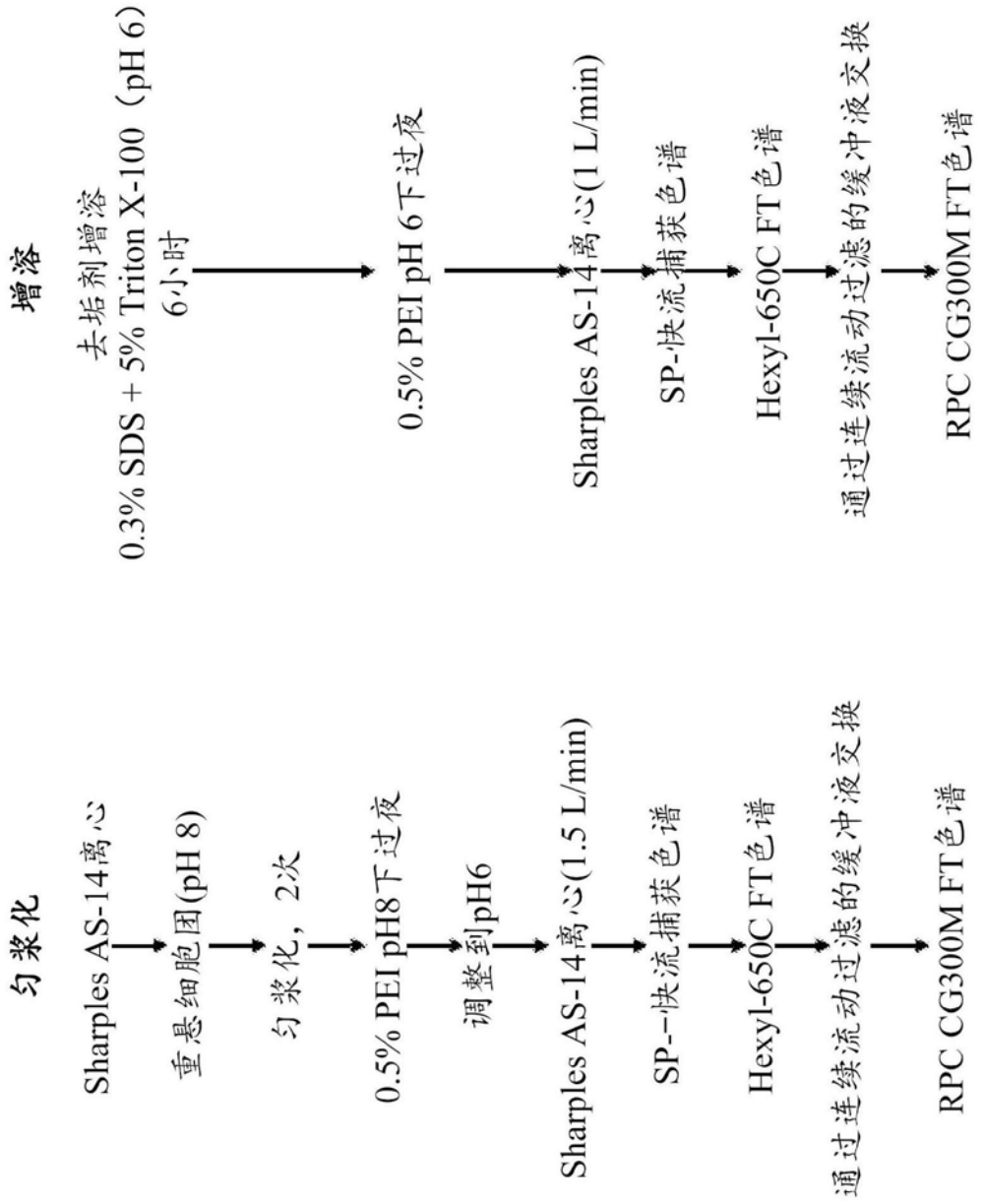

匀浆化
Sharples AS-14离心
重悬细胞团(pH 8)
匀浆化，2次
0.5% PEI pH8下过夜
调整到pH6
Sharples AS-14离心(1.5 L/min)
SP-快流捕获色谱
Hexyl-650C FT色谱
通过连续流动过滤的缓冲液交换
RPC CG300M FT色谱
增溶
去垢剂增溶
0.3% SDS + 5% Triton X-100（pH 6）
6小时
0.5% PEI pH 6下过夜
Sharples AS-14离心(1 L/min)
SP-快流捕获色谱
Hexyl-650C FT色谱
通过连续流动过滤的缓冲液交换
RPC CG300M FT色谱

图2

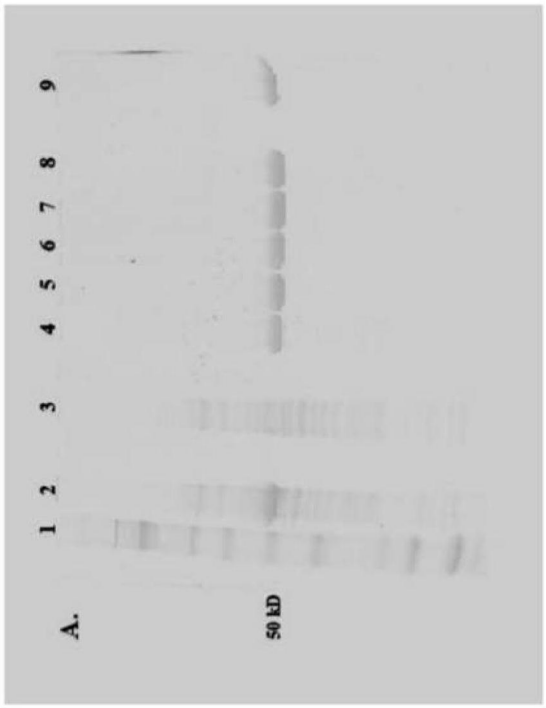


图3A

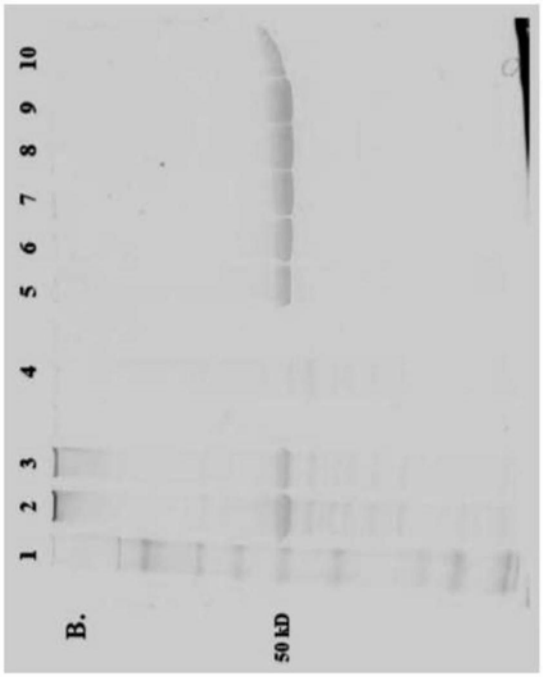


图3B

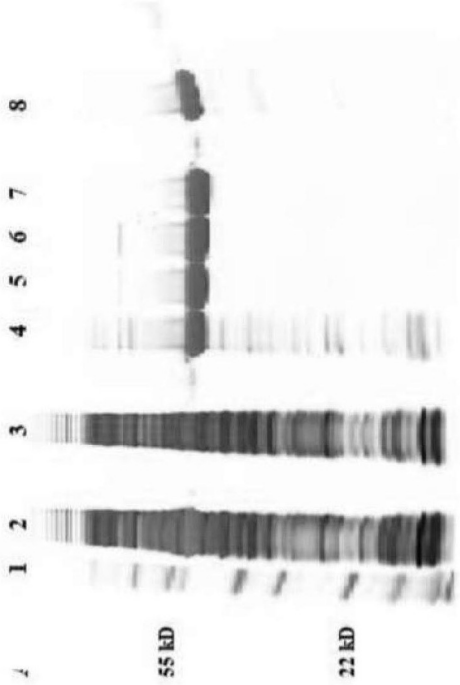


图3C

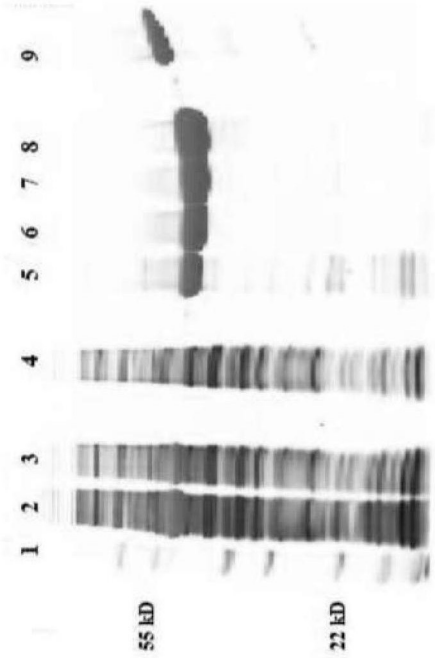


图3D

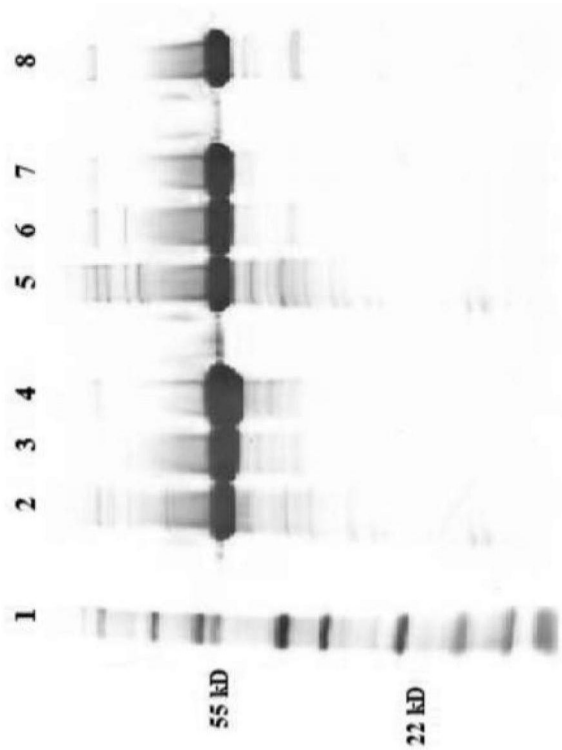


图3E

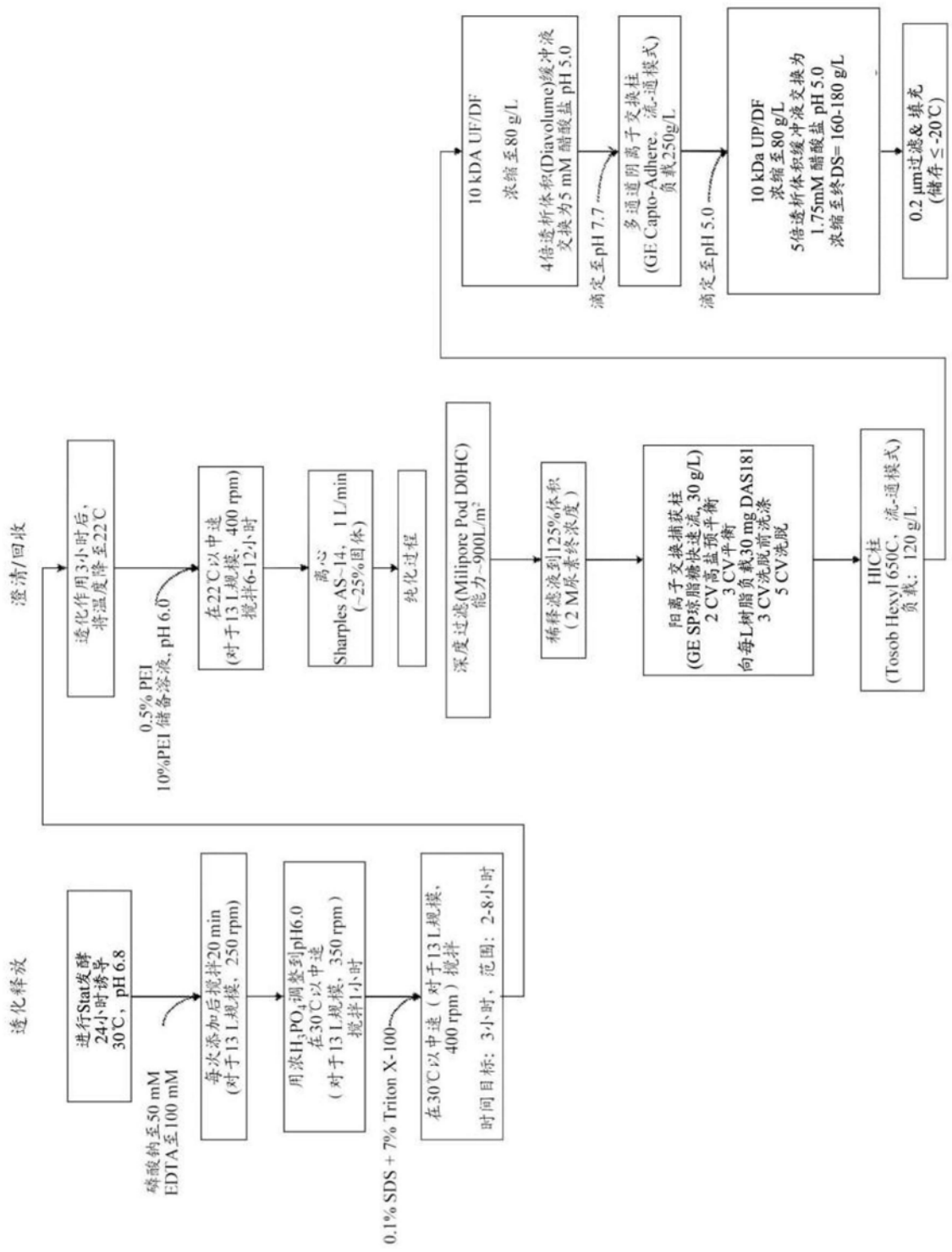

澄清/回收
透化释放
进行Stat发酵
24小时诱导
30℃，pH 6.8
磷酸钠至50 mM
EDTA至100 mM
每次添加后搅拌20 min
(对于13 L规模，250 rpm)
用浓H_3PO_4调整到pH6.0
在30℃以中速
(对于13 L规模，350 rpm)
搅拌1小时
0.1% SDS + 7% Triton X-100
在30℃以中速（对于13 L规模，
400 rpm）搅拌
时间目标：3小时，范围：2-8小时
透化作用3小时后，
将温度降至22℃
0.5% PEI
10%PEI储备溶液，pH 6.0
在22℃以中速
(对于13 L规模，400 rpm)
搅拌6-12小时
离心
Sharples AS~14，1 L/min
(~25%固体)
纯化过程
深度过滤(Millipore Pod D0HC)
能力~900L/m²
稀释滤液到125%体积
(2 M尿素终浓度)
阳离子交换捕获柱
(GE SP琼脂糖快速流，30 g/L)
2 CV高盐预平衡
3 CV平衡
向每L树脂负载30 mg DAS181
3 CV洗脱前洗涤
5 CV洗脱
HIC柱
(Tosoh Hexyl 650C，流-通模式)
负载：120 g/L
10 kDA UF/DF
浓缩至80 g/L
4倍透析体积(Diavolume)缓冲液
交换为5 mM 醋酸盐 pH 5.0
滴定至pH 7.7
多通道阴离子交换柱
(GE Capto-Adhere，流-通模式)
负载250g/L
滴定至pH 5.0
10 kDa UP/DF
浓缩至80 g/L
5倍透析体积缓冲液交换为
1.75mM 醋酸盐 pH 5.0
浓缩至终DS= 160-180 g/L
0.2 μm过滤& 填充
(储存≤-20℃)

图4

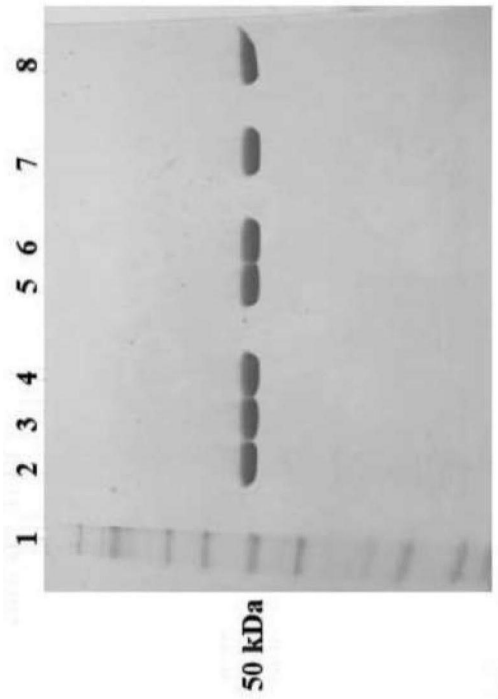


图5A

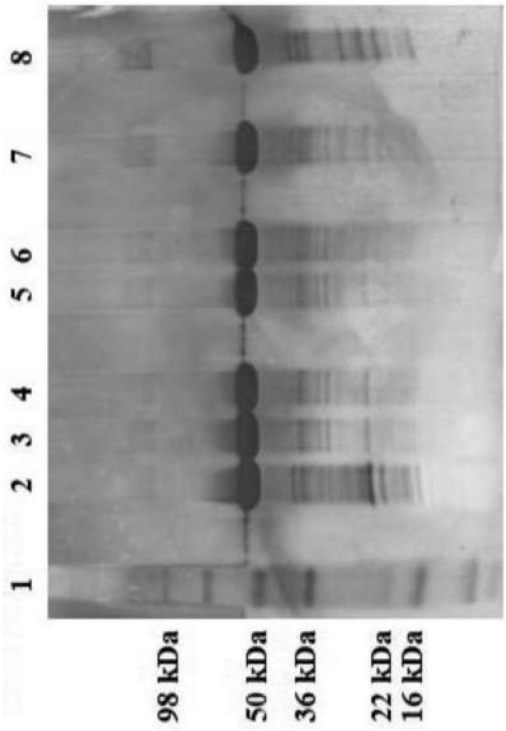


图5B

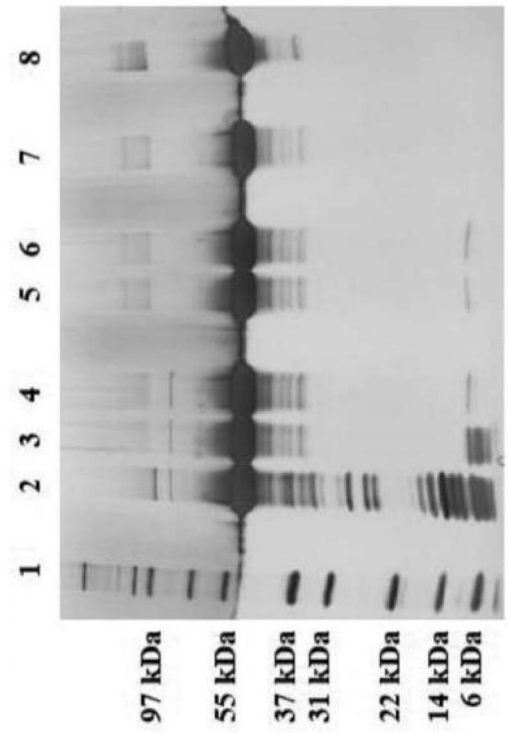

1
2
3
4
5
6
7
8
97 kDa
55 kDa
37 kDa
31 kDa
22 kDa
14 kDa
6 kDa

图5C

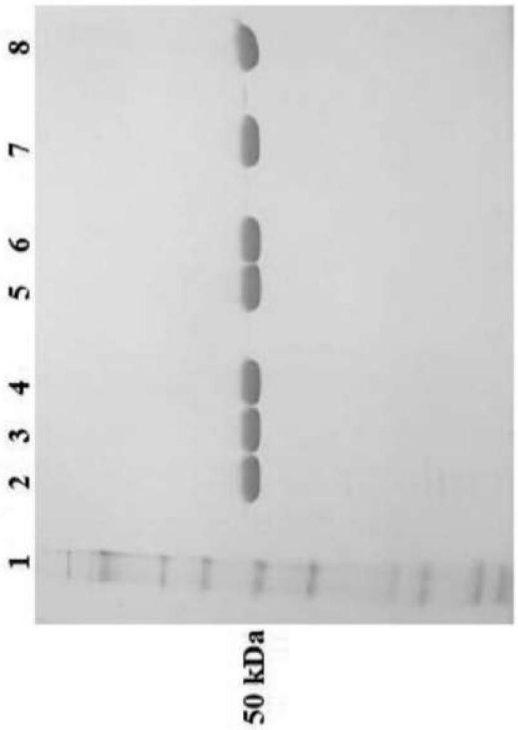

1
2
3
4
5
6
7
8
50 kDa

图5D

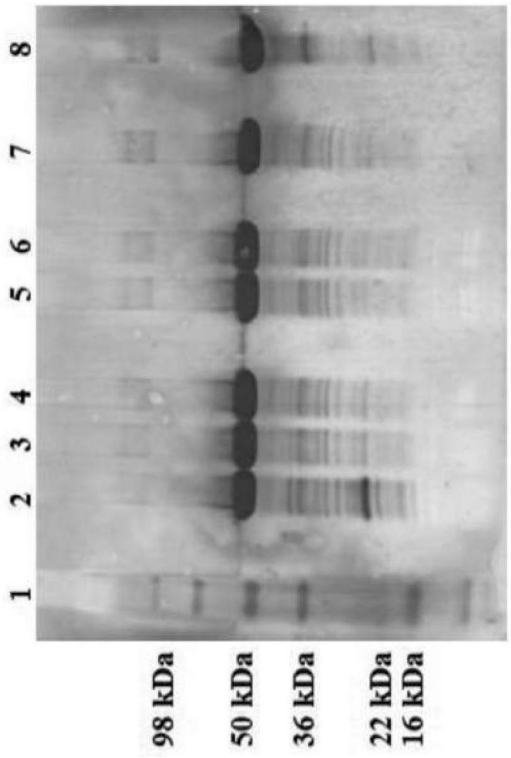

1
2
3
4
5
6
7
8
98 kDa
50 kDa
36 kDa
22 kDa
16 kDa

图5E

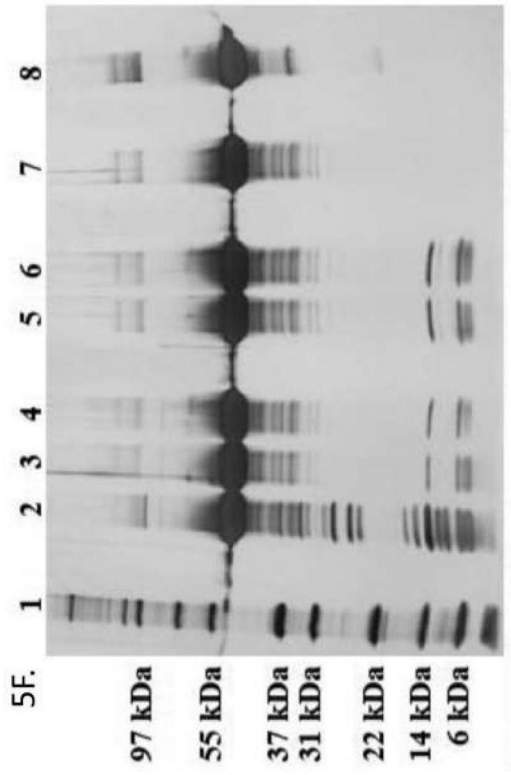

5F.
1
2
3
4
5
6
7
8
97 kDa
55 kDa
37 kDa
31 kDa
22 kDa
14 kDa
6 kDa

图5F

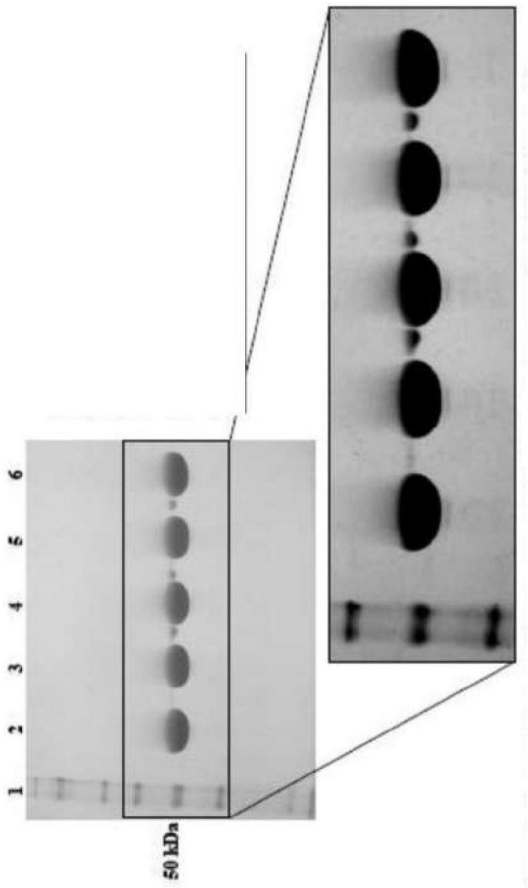


图6A

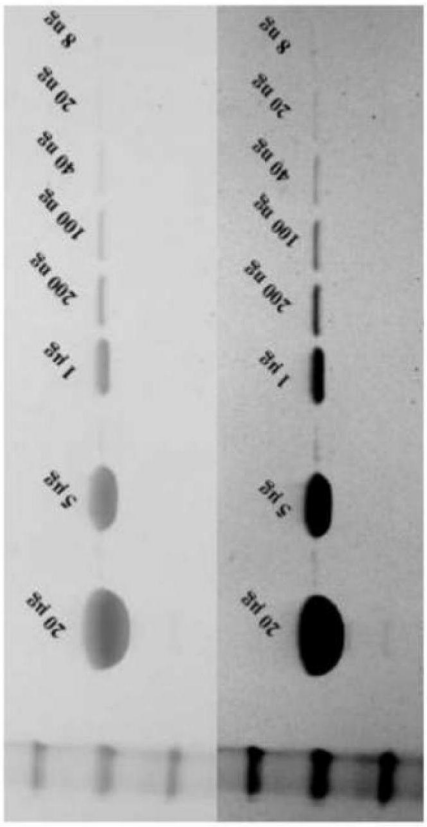

8 nt
20 nt
40 nt
100 nt
200 nt
1 μg
5 μg
20 μg
8 nt
20 nt
40 nt
100 nt
200 nt
1 μg
5 μg
20 μg

图6B

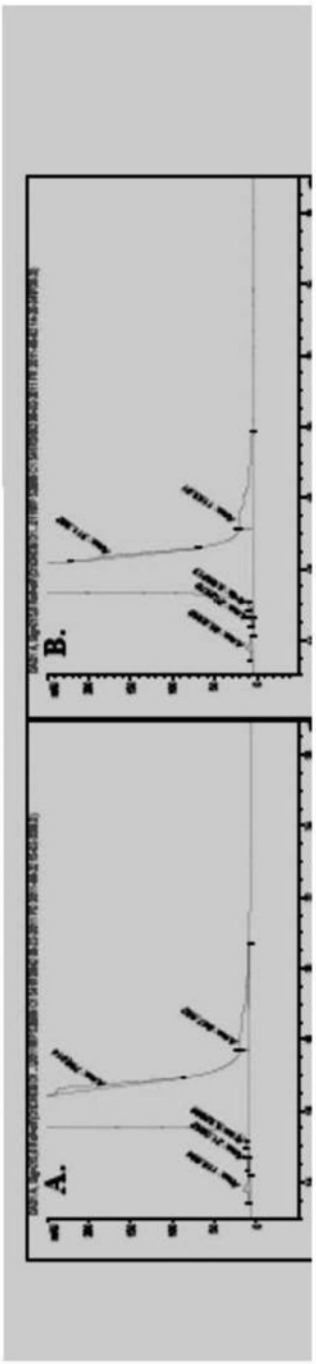


图7B

图7A

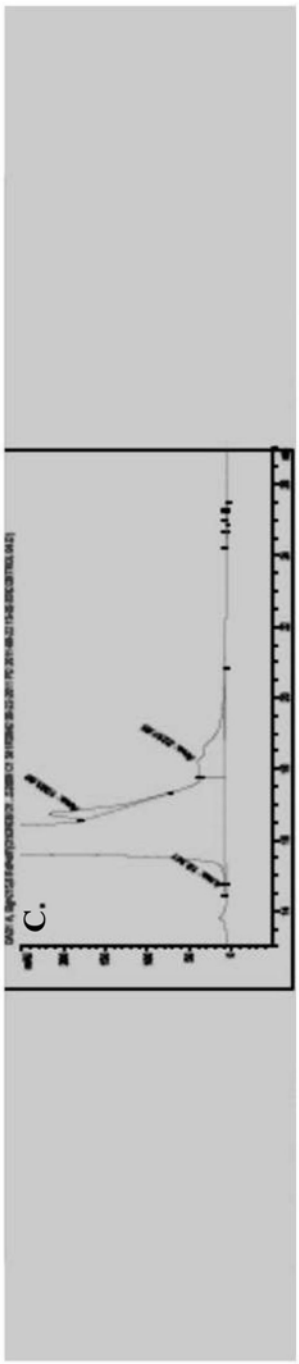


图7C

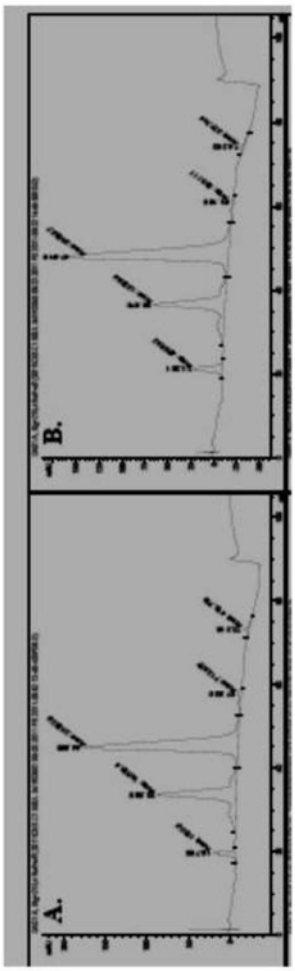


图8B

图8A

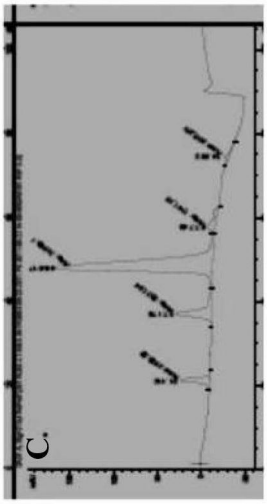


图8C

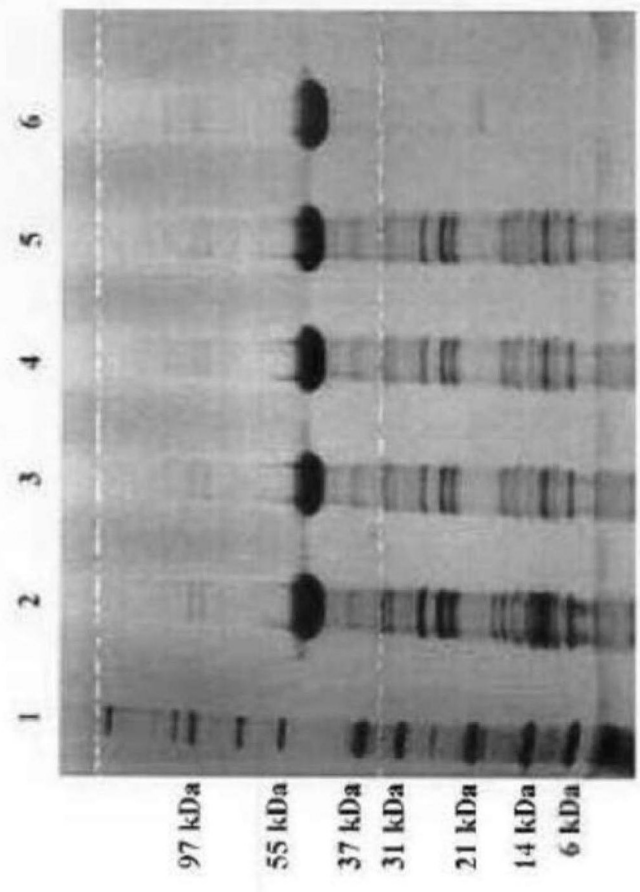


图9