



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105636686 B

(45)授权公告日 2018.08.17

(21)申请号 201480055824.7

B01D 15/38(2006.01)

(续)

(22)申请日 2014.10.09

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105636686 A

(43)申请公布日 2016.06.01

(30)优先权数据

PCT/GB2013/052626 2013.10.09 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.04.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2014/000401 2014.10.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/052465 EN 2015.04.16

(73)专利权人 纯化迪发有限公司

地址 英国赫特福德郡

(72)发明人 奥利弗·哈迪克

丹尼尔·吉尔伯特·布雷斯韦尔

(续)

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 徐厚才 杨思捷

(51)Int.Cl.

B01J 20/24(2006.01)

B01D 15/36(2006.01)

CN 102139187 A,2011.08.03,

CN 1195040 A,1998.10.07,

CN 101338457 A,2009.01.07,

CN 1127674 A,1996.07.31,

CN 1141598 A,1997.01.29,

CN 1741845 A,2006.03.01,

CN 1071600 A,1993.05.05,

WO 2013068741 A1,2013.05.16,

Antonio Norio Nakagaito等.Production

of microfibrillated cellulose (MFC)-
reinforced polylactic acid (PLA)

nanocomposites from sheets obtained by a
papermaking-like process.《COMPOSITES
SCIENCE AND TECHNOLOGY》.2009,第69卷

Lifeng Zhang等.Fabrication and
bioseparation studies of adsorptive
membranes/felts made from electrospun
cellulose acetate nanofibers.《JOURNAL OF
MEMBRANE SCIENCE》.2008,第319卷

Zuwei Ma等.Electrospun cellulose
nanofiber as affinity membrane.《JOURNAL
OF MEMBRANE SCIENCE》.2005,第265卷

审查员 林小花

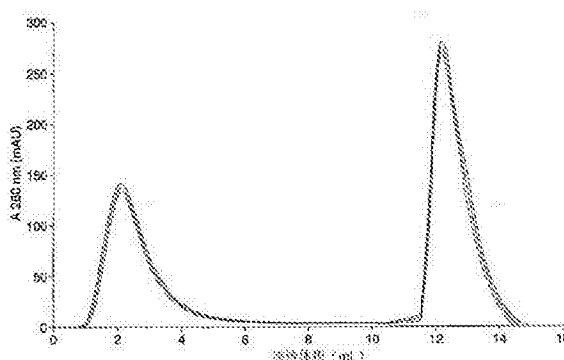
权利要求书2页 说明书29页 附图12页

(54)发明名称

色谱介质

(57)摘要

本发明提供了一种制备官能化的聚合物色
谱介质的方法,该方法包括:(I)提供两个或更多
的非织造片材,一个堆叠在另一个之上,每个所
述片材包括一个或多个聚合物纳米纤维,(II)同
时加热和压制堆叠的片材,使相邻片材的纳米纤
维之间的接触点熔合,和(III)将压制和加热的
产物与试剂相接触,使步骤(II)的产物官能化为
色谱介质。



[转续页]

[接上页]

(72)发明人 斯图尔特·多兹

B01J 20/285(2006.01)

(51)Int.Cl.

B01J 20/30(2006.01)

B01J 20/28(2006.01)

C07K 1/18(2006.01)

C07K 1/22(2006.01)

1. 一种制备官能化的聚合物色谱介质的方法,该方法包括
 - (I) 提供两个或更多个非织造片材,一个片材堆叠在另一个之上,每个所述片材包括一个或多个聚合物纳米纤维,其中所述聚合物纳米纤维的平均直径为10 nm至1000 nm,
 - (II) 同时加热和压制堆叠的片材,使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合,和
 - (III) 将经压制和加热的产物与试剂接触,该试剂使步骤(II)的产物官能化为色谱介质。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,在步骤(I)中,两个至三十个所述片材被一个堆叠在另一个之上。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中,在步骤(I)中,五至二十五个所述片材被一个堆叠在另一个之上。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中,在步骤(II)中,施加于堆叠的片材的压力为0.01至5 MPa。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中,在步骤(II)中,施加于堆叠的片材的压力大于1 kPa。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中,在步骤(II)中,施加于堆叠的片材的压力不大于500 kPa。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中每个非织造片材由单个聚合物纳米纤维构成,或包括2、3、4、5、6、7、8、9或10个聚合物纳米纤维。
8. 根据权利要求1所述方法,其中所述聚合物选自于纤维素、醋酸纤维素、聚砜、聚酰胺、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚丙烯腈、聚苯乙烯、聚环氧乙烷以及它们的混合物。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述纳米纤维是醋酸纤维素纳米纤维,并且经压制和加热的产物在步骤(II)和(III)之间被处理,以使醋酸纤维素转变为纤维素。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中,在步骤(II)中,堆叠的片材被在190至220℃加热。
11. 根据权利要求1所述的方法,步骤(III)包括将经压制和加热的产物以分批方式与试剂至少接触2次,该试剂使该经压制和加热的产物被官能化为色谱介质。
12. 根据权利要求11所述的方法,每个以分批方式与试剂接触的步骤包括:(a) 与试剂接触,(b) 将步骤(a)的产物与试剂分离,(c) 任选地使用碱水溶液处理步骤(b)的产物,和(d) 任选地用水洗涤步骤(b)的产物或用水洗涤任选的步骤(c)的产物。
13. 根据权利要求11所述的方法,分批官能化进行2~4次。
14. 根据权利要求1所述的方法,步骤(III)包括将经压制和加热的产物放置于支架中,和(IV)使试剂流经支架,以使试剂在流动过程中与经压制和加热的产物接触,这使步骤(II)的产物官能化为色谱介质。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中步骤(IV)包括
 - 在压力下使试剂流经支架;和/或
 - 使用泵使试剂流经支架;和/或
 - 以循环的方式使试剂流经支架;和/或
 - 使试剂流经支架并持续1至20分钟。
16. 根据权利要求1所述的方法,其中试剂官能化经压制和加热的产物,使得所得的官

能化的色谱介质适用于选自以下的色谱法：离子交换色谱法、亲和捕获色谱法、疏水相互作用色谱法和混合模式色谱法。

17. 根据权利要求16所述的方法，其中

- 色谱法是阳离子交换法，试剂以羧酸盐基、磺酸盐基或磷酸盐基官能化色谱介质；
- 色谱法是一种阴离子交换法，试剂以季氨基或二乙胺基官能化色谱介质；
- 色谱法是一种亲和捕获色谱法，试剂以蛋白质、肽、抗体或抗体的片段、染料、组氨酸、或含有金属阳离子的基团官能化色谱介质；
- 色谱法是一种疏水相互作用色谱法，试剂以丙基、丁基、苯基、或辛基官能化色谱介质；或者
- 色谱法是一个混合模式色谱法，试剂以4-巯基乙基吡啶、辛胺基、N-苄基甲基乙醇胺或N-苯甲酰基同型半胱氨酸基官能化色谱介质。

18. 根据权利要求1所述的方法，其中试剂官能化色谱介质上的羟基、氨基或羧酸基。

19. 根据权利要求1所述的方法，其中，在与试剂接触的步骤之前，经压制和加热的产物被处理以使聚合物上的任何官能团脱保护或活化。

20. 根据权利要求1所述的方法，其中

- 在步骤(I)中，五至二十五个所述片材被一个堆叠在另一个之上，每个所述片材包括1、2或3个聚合物纳米纤维，并且每个片材的厚度为5至40 μm ；和/或
- 在步骤(II)中，施加的温度低于聚合物的熔点，压力为0.01至5MPa，施加1至120分钟，从而获得的经压制和加热的产物具有的平均密度为250至750 kg/m^3 ，厚度为0.05至10 mm。

21. 根据权利要求1所述的方法，其中

- 在步骤(I)中，五至二十五个所述片材被一个堆叠在另一个之上，每个所述片材包括单个聚合物纳米纤维，并且每个片材的厚度为5至120 μm ，面密度为1至40 g/m^2 ；和/或
- 在步骤(II)中，施加的温度低于聚合物的熔点，压力为1至500 kPa，施加1至30分钟，从而获得的经压制和加热的产物具有的平均密度为200至1000 kg/m^3 ，厚度为0.05至10 mm。

22. 能够根据前述权利要求中任一项所述的方法获得的官能化的色谱介质。

23. 一种制备色谱分析小柱的方法，所述方法包括实施权利要求1至21中任一项所述的方法，以及将由此获得的产物加入色谱分析小柱中。

24. 一种色谱分析小柱，其包含一种或多种权利要求22所述的官能化的色谱介质。

25. 权利要求22的官能化的色谱介质在色谱法中的应用。

26. 一种从流动相中分离一种或多种生物分子的方法，所述方法包括将在流动相中的一种或多种生物分子与权利要求22的官能化的色谱介质接触。

27. 根据权利要求26所述的方法，它是一种离子交换色谱方法、亲和捕获色谱方法或疏水相互作用色谱方法。

色谱介质

技术领域

[0001] 本发明涉及一种官能化的色谱介质,它适合于从流动相中分离生物分子。

背景技术

[0002] 生物技术行业在全球医药行业中增长最快,在2002年生物技术行业市场占有率为10%,而到2012年已占据市场销售总额的20%(\$ 1530亿)。预计到2018年销售额将从2012年的\$ 1530亿增加到\$ 2150亿,实现41%的增长。目前在市场上大约有200种单克隆抗体(MAb)的产品和超过1000种临床试验,可见对于生物技术领域的技术进步的需要是显而易见的。在过去十多年里,典型的生物分子的发酵效价(fermentation titres)已经从0.5 g / L 增长到 50 g / L,尽管下游纯化技术也获得了一些研究和发展,但该领域的进步未能匹配上游的研发。在经济学方面,严重依赖于结合/洗脱的色谱单元操作对于生物分子(如单克隆抗体)的下游加工的进步是关键的。色谱在生物分子的下游加工成本中占非常重要部分,它反过来也影响生物分子本身的总成本。

[0003] 从历史上看,传统的填充床色谱法一直是一个非常强大的分离工具。然而,越来越明显的是,从根本上说,必须采用新的系统以允许生物分子在制备后可被有效且经济地回收。

[0004] 已经看到发展的一个领域是新配体的合成,以取代目前昂贵的亲和配体。

[0005] 已经探索的另一条路线是对传统的支撑结构(如多孔珠填充床吸附剂)的改性。这通常是为了解决与这样的吸附剂相关的缺陷,特别是与压降和驻留时间相关的问题。这些缺陷通常导致低效的分离。开发允许不受流量约束地操作的新型吸附剂结构,具有增加生产量的优势,但通常只在小规模上被证明是有用的。吸附剂积垢的问题很常见,这往往使色谱分离技术要进行后期抛光操作。在考虑吸附剂孔径大小时必须权衡它的积垢和捕获能力。具有锐穿透曲线的良好分离需要小孔隙,但它会导致积垢增加。相反,大孔隙吸附剂(10 μm - 150+ μm)可能能够更好地处理积垢,但小的目标生物分子可能穿过这样的吸附剂而未被结合。

[0006] 最近,有报道称,污染物捕获模式的膜色谱可作为潜在可行的替代方案。

[0007] 另一个研究焦点是整体式结构的开发,已经证明能够很好地分离大的生物分子(例如质粒和病毒),这是由于其表面上存在相对较大的孔隙。目前行业倾向于使用一次性系统的趋势有利于膜色谱的发展,因为一次性膜比一次性填充床柱更经济。

[0008] 另一个开发路线是进行连续处理。连续处理的开发可能使得在许多系统中实现高效率。因此,连续操作提供了实时过程监控和自动化控制的机会,潜在的好处包括可预测产品规格、降低劳动力成本、以及与其他连续过程的整合。然而,迄今为止很少有真正能实现连续色谱操作的技术。

[0009] 因此,应当理解,存在多种不同的研究途径,以改进回收生物分子的方法。

[0010] 电纺聚合物纳米纤维具有的性质为解决在下游生物加工时用到的传统支撑基质上观察到的问题提供了一种可能的解决方案。它们的性质容易导致自身结合支撑表面,从

而具有高容量和高传质速率操作的潜力,因此实现与具有高孔隙度和相对较小的表面孔径的系统的 不受流量约束的结合。

[0011] 包含具有二乙氨基乙基 (DEAE) 官能的电纺聚合物纳米纤维的吸附剂小柱 (adsorbent cartridge) 已有报道,其结合能力大约只有典型填充床系统的10%,但是流速却是典型填充床的约50倍。这样的纳米纤维系统呈现的表面积与体积比与多孔串珠系统相似。然而,现有的这种纳米纤维系统的结合能力稍低于典型的填充床系统。当相同的膜被多次使用时,已知的纳米纤维系统也显示出差的重复性。这限制了它们在回收生物分子方面的应用。

[0012] 因此,此前还不可能制备出这样的纳米纤维系统,即,它的结合能力超过传统填充床的约10%,同时保持这类纳米纤维系统相关的孔隙率和强健的可再生操作。

[0013] 通过电纺丝生产的纳米纤维吸附剂系统的厚度在制造时受到限制,因为纳米纤维沉积到一个接地的收集表面 (earthed collector surface),随着沉积的增加,而产生一个较不接地的表面。因此,所沉积的纤维中的残余电荷,使得该区域难以继续沉积,导致纤维在收集表面进一步扩散。这导致由电纺丝生产的纳米纤维垫的厚度被限制到约100-200 μm 。这些纳米纤维垫的有限厚度使得整个垫子在物理强度方面具有固有的限制,这限制了材料在工艺应用(例如色谱)上的实用性。

[0014] 一种已知的纳米纤维吸附剂系统的描述参见Ma, et al, Journal of Membrane Science 265 (2005) 115-123。这篇文献描述了一种用于生产纤维素纳米纤维膜的方法,它涉及热处理由醋酸纤维素纳米纤维构成的单层非织造纤维网;使用NaOH处理加热的醋酸纤维素网;以及使用汽巴蓝 (Cibacron Blue) 官能化所产生的纤维素纤维。多个膜可被堆叠在一起,边缘被胶粘在一起,并将该堆叠体放在一个过滤支架中。

[0015] 发明概述

[0016] 从最广泛的意义上说,本发明提供了制备官能化的色谱介质的方法,该方法包括通过物理的和化学的加工步骤的结合来处理一个或多个聚合物纳米纤维,从而产生适合于在色谱法中作为色谱介质的官能化产品。

[0017] 现已发现,一个特定系列的物理和化学加工步骤大大增加了纳米纤维吸附剂系统的结合能力,在常规的操作条件下,通常增加所述结合能力超过250%。还已发现,某些特定的物理加工步骤可提高纳米纤维吸附剂系统的化学抵抗性 (chemical resistivity)。这意味着本发明的吸附剂系统可以在更苛刻的条件下使用,而且该吸附剂系统可以使用多次而不损失性能。

[0018] 因此,本发明提供了一种制备官能化的聚合物色谱介质的方法,该方法包括

[0019] (I) 提供两个或更多的非织造片材,一个堆叠在另一个之上,每个所述片材包括一个或多个聚合物纳米纤维;

[0020] (II) 同时加热和压制该堆叠的片材,使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合; 以及

[0021] (III) 将所压制和加热的产品与试剂接触,所述试剂使步骤 (II) 的产品官能化成为色谱介质。

[0022] 更具体地,相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合包括一个片材的聚合物纳米纤维的部分与相邻片材的聚合物纳米纤维的部分之间的接触点的熔合。通常情况下,这也包

括一个片材的聚合物纳米纤维的部分与相同纳米纤维的多个其他部分之间的接触点的熔合。

[0023] 本发明还提供了：

[0024] - 通过本发明方法可得到的官能化的色谱介质。

[0025] - 一种制备色谱分析小柱的方法，该方法包括实施本发明的方法和将所获得的产品加入小柱中。

[0026] - 一种色谱分析小柱，其(a)可由所述方法获得，或(b)包括本发明的一种或多种官能化的色谱介质。

[0027] - 本发明的一种官能化的色谱介质或本发明的一种色谱分析小柱在色谱法中的应用。

[0028] - 一种从流动相中分离一种或多种生物分子的方法，包括将流动相中的一种或多种生物分子与本发明的一种官能化的色谱介质或色谱分析小柱接触。

[0029] 本发明还提供了一种制备聚合物介质的方法，该方法包括：如本发明所定义的，提供两个或更多个非织造片材，一个堆叠在另一个之上；如本发明所定义的，每个所述片材包括一个或多个聚合物纳米纤维，；以及，如本文所定义的，同时加热和压制堆叠的片材，以使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合。本发明还提供可由该方法获得的聚合物介质。

附图说明

[0030] 图1示出本发明的一种官能化的色谱介质在阴离子交换色层析中的性能。

[0031] 图2示出本发明的一种官能化的色谱介质在阴离子交换色层析中的性能。

[0032] 图3示出用于确定色谱分析膜的化学稳定性的实验设置。

[0033] 图4示出非本发明的膜以及本发明的膜暴露于氢氧化钠后的的照片。

[0034] 图5示出非本发明膜的以及本发明膜的厚度和密度。

[0035] 图6示出不非本发明膜的和本发明膜的流动性质。

[0036] 图7示出压力对本发明的膜的厚度和密度的影响。

[0037] 图8示出压力对本发明的膜的流动性质的影响。

[0038] 图9示出压力对本发明的膜的动态结合能力的影响。

[0039] 图10示出官能化循环次数对本发明的膜的流动性质的影响。

[0040] 图11示出官能化循环次数对本发明的膜的动态结合能力的影响。

[0041] 图12示出了本发明的SP-官能化的膜的结合洗脱特性。

[0042] 图13示出了本发明的CM-官能化的膜的结合洗脱特性。

[0043] 图14示出了本发明的Q-官能化的膜的结合洗脱特性。

[0044] 图15示出了本发明的蛋白A-官能化的膜的结合洗脱特性。

[0045] 图16示出本发明的苯基-官能化的膜的结合洗脱特性。

[0046] 图17示出非本发明的膜暴露于氢氧化钠后的的照片。

[0047] 图18示出非本发明的膜以及本发明的膜的厚度和密度。

[0048] 图19示出非本发明的膜以及本发明的膜的流动性质。

[0049] 图20示出非本发明的膜以及本发明的膜的动态结合能力。

[0050] 图21示出本发明的膜在多次官能化循环后的照片(顶部图片)和非本发明的膜在

多次官能化循环后的照片(底部图片)。

[0051] 发明详述

[0052] 聚合物纳米纤维

[0053] 本发明官能化的色谱介质由一个或多个聚合物纳米纤维形成。该聚合物纳米纤维通常是电纺聚合物纳米纤维。这种电纺聚合物纳米纤维是本领域技术人员熟知的,它们的优化的生产条件可参见,例如,0. Hardick, et al, J.Mater. Sci. 46 (2011) 3890,其全部内容通过引用并入本文。本发明的方法通常包括电纺聚合物的初始步骤,以产生一个或多个聚合物纳米纤维。这可包括电纺聚合物,以产生一个或多个非织造片材,每个所述片材包括一个或多个聚合物纳米纤维。

[0054] 本发明中使用的聚合物纳米纤维的平均直径通常为10nm至1000nm。对于某些应用,合适的聚合物纳米纤维的平均直径为200nm至800nm。对于某些应用,合适的聚合物纳米纤维的平均直径可为200nm至400nm。

[0055] 本发明对所用的聚合物纳米纤维的长度没有特别限定。因此,常规的电纺方法可生产出长度为几百米或甚至是几公里的纳米纤维聚合物。但是,通常该一个或多个聚合物纳米纤维的长度可达10 km,优选为10 m至10 km。

[0056] 通常情况下,该一个或多个聚合物纳米纤维以一个或多个非织造片材形式提供,每个片材包括一个或多个聚合物纳米纤维。包含一个或多个聚合物纳米纤维的非织造片材是一个或多个聚合物纳米纤维的垫,其中每个纳米纤维的取向基本上是随机的,即,纳米纤维并未采用特定的模式。包含聚合物纳米纤维的非织造片材通常通过公知技术提供,参见,例如,0. Hardick, et al, J.Mater. Sci. 46 (2011) 3890公开的技术。在某些情况下,非织造片材可能由单个聚合物纳米纤维构成。作为选择,非织造片材可包含两个或更多个聚合物纳米纤维,例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个聚合物纳米纤维。

[0057] 通常情况下,非织造片材的面密度为1~40 g/m²,优选为5~25 g/m²,某些情况下为1~20或5~15 g/m²。

[0058] 通常情况下,非织造片材具有的厚度为5~120μm,优选为10~100μm,某些情况下为50~90μm,其他情况下为5~40、10~30或15~25μm。

[0059] 用于生产用于本发明的纳米纤维的聚合物并没有特别的限制,只要该聚合物是适合于在色谱应用中使用即可。因此,通常情况下,该聚合物是适用作色谱法中的色谱介质(即吸附剂)的聚合物。合适的聚合物包括聚酰胺(如尼龙)、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚丙烯腈、聚苯乙烯、聚砜、聚己内酯、胶原、壳聚糖、聚环氧乙烷、琼脂糖、乙酸琼脂糖、纤维素、醋酸纤维素以及它们的组合。优选的是纤维素和醋酸纤维素。

[0060] 通常情况下,本发明的方法是用于制备官能化的纤维素色谱介质,该方法包括提供一种或多种醋酸纤维素纳米纤维。优选地,该方法包括提供一个或多个非织造片材,每一个片材包括一个或多个醋酸纤维素纳米纤维。醋酸纤维素易于电纺并且电纺后容易被转化成纤维素。因此,该方法优选包括提供一个或多个非织造片材,每一个包括一个或多个电纺醋酸纤维素纳米纤维。

[0061] 纳米纤维的物理改性

[0062] 本发明的方法包括对非织造片材中的聚合物纳米纤维的物理改性,即在化学改性之前,先进行加热和压制。这些步骤提高了材料的结构稳定性。压制和加热条件也可被改

变,从而改变所得材料的厚度和/或孔隙率。

[0063] 聚合物纳米纤维的多个非织造片材的使用使得能够制备出更厚的材料,该材料具有更大的吸附能力(一次官能化)。发明人还发现,与由单片的热处理聚合物纳米纤维形成的堆叠比较,通过加热和压制多个聚合物纳米纤维非织造片材生产的膜具有改进的性质。因此,本发明的方法包括提供两个或更多个非织造片材,一个堆叠在另一个之上,每个所述片材包括一个或多个聚合物纳米纤维,并同时加热和压制堆叠的片材,使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合。因此,本发明的方法包括:如本文步骤(I)所定义的,提供两个或更多个非织造片材的堆叠体,并且本发明提供了一种用于制备官能化的聚合物色谱介质的方法,该方法包括:

[0064] (I)提供两个或更多个非织造片材的堆叠体,每一个所述片材包括一个或多个聚合物纳米纤维;

[0065] (II)同时进行加热和压制堆叠的片材,以使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合;和

[0066] (III)将加热和压制的产物与试剂接触,所述试剂使步骤(II)中产物被官能化为色谱介质。

[0067] 通常情况下,提供两至三十个非织造片材的堆叠体。在某些情况下,可能提供五至二十五个非织造片材的堆叠体。在某些情况下,可能提供10至20个非织造片材的堆叠体。采用的非织造片材的数量将影响最终的色谱介质的厚度和对液体的渗透性。因此,较厚的介质通常比较薄的介质具有较低的渗透性。因此,在需要高的渗透性时,通常采用较少数量的片材。在需要低渗透性介质时,则可以采用较多数量的片材。

[0068] 为免生疑问,非织造片材按平行于它们最薄维度的方向压制(在加热下进行)。非织造片材将通常具有两个比第三维度大得多的维度,将这些片材平行于该第三维压制。当提供和压制两个或更多个非织造片材时,这两个或更多个非织造片材被一个堆叠在另一个之上,使得它们基本上重叠,每个非织造片材的最小维度对齐。这就形成了片材的堆叠体,其随后被加热和压制。堆叠体中的片材彼此重叠并且每个非织造片材的最小维度对齐。

[0069] 通常情况下,压制聚合物纳米纤维或非织造片材的包括向它们施加0.01至5 MPa的压力,更通常为0.05~3 MPa,例如0.1~1 MPa。在本发明方法中使用的合适的压力通常大于1 kPa,优选大于5 kPa,在某些情况下大于10 kPa。通常情况下,使用的压力不大于500 kPa,优选不大于200 kPa,更优选不大于150 kPa,例如不大于100 kPa、50 kPa或30 kPa。例如,合适的压力范围可以是1~500 kPa、5~200 kPa、5~150 kPa、5~100 kPa、5~50 kPa或10~30 kPa。压力可以通过任何合适的方式施加。例如,压力可利用手动压力机或液压机施加。施加的压力可被改变,从而改变介质的物理性质。一般而言,较高的压力会产生更强健的介质、具有较低的孔隙率和较小的厚度。较低的压力趋向于产生相对不太强健的介质、具有较高的孔隙率和较大的厚度。当期望结合性能最大化时,可能优选较厚的色谱介质。

[0070] 聚合物纳米纤维或非织造片材的压制时间没有特别限制,通常的压制时间可以由本领域的技术人员来确定。当一个或多个聚合物纳米纤维或一个或多个非织造片材被同时加热和压制时,压制时间通常为1~30分钟,优选1~10分钟,更优选3~7分钟,还更优选为约5分钟。

[0071] 加热所述一个或多个聚合物纳米纤维或一个或多个非织造片材可以通过常规方

法来进行,例如使用烤箱。当一个或多个聚合物纳米纤维或一个或多个非织造片材被同时加热和压制时,加热可以通过热压机来实现,或通过将该一个或多个聚合物纳米纤维或一个或多个非织造片材放置在加热的烤箱中的重物(如金属片)之间来实现。

[0072] 非织造片材的堆叠体被加热和压制,以使得相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合。

[0073] 当两个或更多个非织造片材(每一个包括一个或多个纳米纤维)被一个堆叠在另一个之上并经受热量和压力条件时,一个片材中的聚合物纳米纤维的部分可与相同纳米纤维的部分接触,和/或与相同非织造片材中的其他纳米纤维的部分接触,和/或与相邻的非织造片材中的纳米纤维的部分接触。在非织造片材中的纳米纤维的部分通常不与不相邻的其它非织造片材中的纳米纤维的部分接触。

[0074] 因此,加热和压制两个或更多个非织造片材的堆叠体,可使一个片材中的纳米纤维的部分与相同纳米纤维的其他部分之间的接触点熔合,和/或使一个片材中的纳米纤维的部分与该相同非织造片材中的另一个纳米纤维(如果存在的话)的部分之间的接触点熔合,和/或使一个片材中的纳米纤维的部分与相邻的非织造片材中的纳米纤维的部分之间的接触点熔合。通常情况下,同时加热和压制两个或更多个非织造片材,使得一个片材中的聚合物纳米纤维的部分与相邻片材的聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合。优选地,同时加热和压制两个或更多个非织造片材,使得一个片材中的聚合物纳米纤维的部分与同一纳米纤维的其它部分之间的接触点熔合,并使得该片材中的聚合物纳米纤维的部分与相邻片材中的聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合。更优选地,加热和压制两个或更多个非织造片材,使得一个片材中的纳米纤维的部分与同一纳米纤维的其它部分之间的接触点熔合,并使得一个片材中的纳米纤维的部分与同一非织造片材的另一纳米纤维的部分之间的接触点熔合,和/或使得纳米纤维的部分与相邻的非织造片材的纳米纤维的部分之间的接触点熔合。最优选地,加热和压制两个或更多个非织造片材,使得一个片材中的纳米纤维的部分与同一纳米纤维的其它部分之间的接触点熔合,并使得该片材中的该纳米纤维的部分与同一非织造片材的另一个纳米纤维(如果存在的话)的部分之间的接触点熔合,并使得该片材中的该纳米纤维的部分与相邻的非织造片材的纳米纤维的部分之间的接触点熔合。

[0075] 在一个提供两个非织造片材的简单例子中,其中每个非织造片材包含单个聚合物纳米纤维,优选地,加热和压制第一和第二个非织造片材,使第一个非织造片材中的聚合物纳米纤维的部分与第一个非织造片材中的该聚合物纳米纤维的其他部分之间的接触点熔合,并使第一个非织造片材的该聚合物纳米纤维的部分与第二个非织造片材中的聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合,以及通常也使第二个非织造片材中的该聚合物纳米纤维的部分与第二个非织造片材的该聚合物纳米纤维的其他部分之间的接触点熔合。

[0076] 通常情况下,该聚合物纳米纤维或非织造片材被加热到该聚合物的熔点以下的温度。使用更高的温度可能会导致纳米纤维结构的破坏。在某些情况下,使用低于该聚合物的玻璃化转变温度的温度是有利的。在其他情况下,可能使用高于上述聚合物的玻璃化转变温度的温度。适用于所要求保护的方法的聚合物的熔点和玻璃化转变温度是本领域技术人员熟知的。

[0077] 通常情况下,该聚合物纳米纤维或非织造片材被加热到一定温度,该温度处于一

个或多个聚合物纳米纤维的部分之间的接触点开始熔化的温度和该聚合物的熔点之间。优选地,该聚合物纳米纤维或非织造片材被加热到一定温度,该温度处于一个或多个聚合物纳米纤维的部分之间的接触点开始熔化的温度和该聚合物的玻璃化转变温度之间。

[0078] 通常情况下,使用的温度低于聚合物的熔点40℃以上,优选30℃以上,更优选20℃以上。通常情况下,使用的温度低于聚合物的熔点1℃以下,优选2℃以下,更优选5℃以下。因此,通常使用的温度范围是从低于聚合物的熔点40℃到低于聚合物熔点1℃之间,优选从低于聚合物的熔点30℃到低于聚合物熔点2℃之间,更优选从低于聚合物的熔点20℃到低于聚合物熔点5℃之间。

[0079] 当聚合物是醋酸纤维素的情况时,醋酸纤维素纳米纤维或非织造片材(每一个片材包括一个或多个醋酸纤维素纳米纤维)被加热至190~220℃或在该温度被加热,优选195~218℃,例如195~215℃、195~210℃、190~210℃、195~205℃或210~215℃。其它可使用的合适的温度范围包括200~220℃,优选从205~218℃,例如205~210℃或210~215℃。当醋酸纤维素纳米纤维或非织造醋酸纤维素片材同时被加热和压制时,通常采用温度为190~220℃,例如190~210℃、195~218℃、195~215℃、195~210℃、195~205℃、210~215℃、200~220℃、205~218℃或205~210℃,在某些些情况下,在207℃左右。

[0080] 该聚合物纳米纤维或非织造片材通常加热1~120分钟,例如5~60分钟。当聚合物纳米纤维或非织造片材同时被加热和压制时,加热通常持续1~30分钟,优选1~10分钟,更优选3~7分钟,甚至更优选为约5分钟。

[0081] 通常情况下,该聚合物纳米纤维或非织造片材在压制和加热后(即所得到的压制和加热产物)具有的平均孔径大小为0.1~1.0μm,优选0.3μm~0.9μm,更优选为0.4~0.8μm,甚至更优选为0.5~0.7μm,还更优选0.6~0.7μm,例如0.6~0.65μm。

[0082] 通常情况下,该聚合物纳米纤维或非织造片材在压制和加热后(即所得到的压制和加热产物)具有的平均密度为200~1000 kg/m³,优选250~750 kg/m³,更优选为350~650 kg/m³,在某些情况下为450~550 kg/m³。其他优选的密度包括200~750 kg/m³、200~650 kg/m³、200~550 kg/m³、250~750 kg/m³、250~650 kg/m³和250~550 kg/m³。

[0083] 该聚合物纳米纤维或非织造片材通常同时被加热和压制。在某些实施方式中,可先压制聚合物纳米纤维或非织造片材,随后加热它们;或先加热聚合物纳米纤维或非织造片材,随后压制它们。当聚合物纳米纤维或非织造片材同时被加热和压制时,加热和压制通常是在热压机中进行的,或通过将聚合物纳米纤维或非织造片材放置在加热烤箱中重物(例如金属片)之间来实现。

[0084] 本发明的方法还可包括在压制和加热之前润湿聚合物纳米纤维或非织造片材。因此,该方法可以包括在步骤(I)和(II)之间的润湿堆叠片材的附加步骤。作为选择,该方法可在步骤(I)中包括形成润湿的非织造片材的堆叠体。通常,使用任选地含水的有机溶剂来润湿聚合物纳米纤维/非织造片材/堆叠片材,优选含水有机溶剂。所选择的有机溶剂通常不会溶解聚合物纳米纤维。本领域技术人员清楚地知道哪些溶剂可以使用,以便不溶解聚合物纳米纤维。醇是优选的有机溶剂,例如甲醇、乙醇或异丙醇,优选乙醇。在一些情况下,优选使用含水乙醇。因此,在一些实施方式中可包括润湿,随后同时加热和压制。其他实施方式可包括润湿,随后压制,再加热。还进一步的实施实施方式可包括润湿,然后加热,再压制。

[0085] 通常情况下,该压制和加热的聚合物纳米纤维或片材(即压制和加热得到的产品)具有的厚度为0.05~10 mm,例如0.1~5 mm。

[0086] 在一些实施方式中,本发明的方法包括提供一个或多个聚合物纳米纤维,对一个或多个聚合物的纳米纤维进行压制,以及加热该一个或多个聚合物纳米纤维,以使得该一个或多个聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合。优选地,本发明的方法包括提供一个或多个非织造片材,每一个都包括一个或多个聚合物纳米纤维,对一个或多个非织造片材进行压制,并加热该一个或多个非织造片材,以使得该一个或多个聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合。一个或多个聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合是指包含在一个或多个非织造片材中的一个或多个聚合物纳米纤维。

[0087] 在一些实施方式中,本发明的方法包括进行如本文所述的湿润和进行如本文所述的压制两个或更多个非织造片材的堆叠体,随后进行如本文所述的加热。通常的润湿、压制和加热条件如上所述。因此,在该实施方式中,本发明提供了一种用于制备官能化的聚合物色谱介质的方法,该方法包括:

[0088] (I)如本文所述,提供两个或更多个非织造片材,一个堆叠在另一个之上,每个所述片材包含如本文所述的一个或多个聚合物纳米纤维;

[0089] (II)如本文所述,使用任选地含水的有机溶剂湿润堆叠的片材;

[0090] (III)如本文所述,压制堆叠的片材;

[0091] (IV)如本文所述,加热压制后的堆叠体,使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合;和

[0092] (V)如本文所述,将已润湿、压制和加热得到的产物与如本文所述的试剂接触,该试剂使步骤(II)中产物被官能化为色谱介质。

[0093] 纳米纤维的化学改性

[0094] 本发明的方法通常包括对一个或多个聚合物纳米纤维或一个或多个非织造片材进行化学改性,以使之被官能化而用于色谱法。最简单的形式是,它包括将一个或多个聚合物纳米纤维或一个或多个非织造片材(其可能已经被压制和加热)与试剂相接触,从而将产物官能化为色谱介质。

[0095] 任选地,在与试剂接触这一步骤之前,一个或多个聚合物纳米纤维或一个或多个非织造片材(其可能已经被压制和加热)可被处理以使聚合物上的任何官能团脱保护或被活化。

[0096] 官能团的脱保护通常是为了该官能团可以与试剂发生反应。例如,当聚合物是纤维素时,通常提供的是一个或多个醋酸纤维素纳米纤维或非织造片材(每个片材包括一个或多个醋酸纤维素纳米纤维),在与试剂接触之前,对所述醋酸纤维素进行处理,以将其转换成纤维素。这涉及到乙酰化羟基的脱保护,从而得到羟基。醋酸纤维素转化成纤维素通常是在碱水溶液中实现,优选NaOH水溶液:乙醇,更优选水:乙醇,比例为2:1,处理时间大于12小时,例如12~36小时。这个步骤通常发生在一个或更多个醋酸纤维素纳米纤维或非织造片材(每个片材包含一个或多个醋酸纤维素纳米纤维)被压制和加热之后。作为选择,这个步骤可以在一个或更多个的醋酸纤维素纳米纤维或非织造片材(每个片材包含一个或多个醋酸纤维素纳米纤维)被压制和加热之前进行。官能团的活化在下文进一步讨论。

[0097] 通常,该试剂通过引入一个或部分(moieties)来官能化色谱介质,该一个或部分

使得包含该一个或部分的官能化的产物适于用作色谱介质部分。所引入的一个或部分取决于该介质所应用的具体的色谱技术。合适的部分和试剂在下文中进一步讨论。通常情况下，试剂与存在于一个或多个聚合物纳米纤维（通常被包括在一个或多个非织造片材中）上的一个或多个官能团反应，以引入所述一个或部分。典型的官能团包括羟基、氨基和羧基。因此，在本发明方法中，通常是一个或多个羟基、氨基和（或）羧基基团被官能化。

[0098] 虽然本发明设想了只包括单个的试剂处理的方法，但优选的方法包括多个官能化步骤。这样的方法可导致产品具有改进的结合性质。

[0099] 因此，通常情况下，与试剂接触的官能化是通过以分批的方式与试剂接触两次或更多次而实现的。分批官能化意味着聚合物纳米纤维材料（其任选地被压制、加热、脱保护和（或）活化）与试剂反应使之官能化，然后停止该反应，将所得的（部分地）官能化的材料与单独的一批试剂反应。例如，分批方式并不简单地是指将更多部分的试剂加至反应容器中。

[0100] 分批官能化通常进行2至10次，即，2、3、4、5、6、7、8、9或10次。优选的分批官能化进行2至4次。

[0101] 以分批方式接触试剂的每个步骤通常包括：(a) 与试剂接触，(b) 将步骤(a)的产物与试剂分离，(c) 任选地使用一种碱水溶液处理步骤(b)的产物，和(d) 任选地使用一种水洗涤步骤(b)/(c)的产物。优选地，以分批方式接触试剂的每个步骤包括：(a) 与试剂接触，(b) 将步骤(a)的产物与试剂分离，(c) 使用碱水溶液处理步骤(b)的产物，和(d) 任选地使用水洗涤步骤(b)/(c)的产物。更优选地，以分批方式接触试剂的每个步骤包括：(a) 与试剂接触，(b) 将步骤(a)的产物与试剂分离，(c) 使用碱水溶液处理步骤(b)的产物，和(d) 用水洗涤步骤(b)/(c)的产物。

[0102] 用碱水溶液处理的步骤，通常使用热的（即 70~90℃）碱水溶液。作为选择，用碱水溶液处理的步骤可以在室温下进行。

[0103] 以分批方式接触试剂的每个步骤中使用的试剂可以是相同的或不同的，但优选是相同的。

[0104] 在以分批方式进行的2至4个与试剂接触的步骤的情况下，一个或多个聚合物纳米纤维或一个或多个非织造片材（每个片材都包括一个或多个聚合物纳米纤维）（它们可能已被压制、加热和/或去保护），通常通过以下方式处理：

[0105] - (1) (a1) 与试剂接触，(b1) 将步骤(a1)的产物与试剂分离，(c1) 任选地使用碱水溶液处理步骤(b1)的产物，和(d1) 任选地使用水洗涤步骤(b1)/(c1)的产物；和

[0106] (2) (a2) 将该试剂与步骤(b1)/(c1)/(d1)的产物接触，(b2) 将步骤(a2)的产物与试剂分离，(c2) 任选地使用碱水溶液处理步骤(b2)的产物，和(d2) 任选地使用水洗涤步骤(b2)/(c2)的产物；或

[0107] - (1) (a1) 与试剂接触，(b1) 将步骤(a1)的产物与试剂分离，(c1) 任选地使用碱水溶液处理步骤(b1)的产物，和(d1) 任选地使用水洗涤步骤(b1)/(c1)的产物；

[0108] (2) (a2) 将试剂与步骤(b1)/(c1)/(d1)的产物接触，(b2) 将步骤(a2)的产物与试剂分离，(c2) 任选地使用碱水溶液处理步骤(b2)的产物，和(d2) 任选地使用水洗涤步骤(b2)/(c2)的产物；和

[0109] (3) (a3) 将试剂与步骤(b2)/(c2)/(d2)的产物接触，(b3) 将步骤(a3)的产物与试剂分离，(c3) 任选地使用碱水溶液处理步骤(b3)的产物，和(d3) 任选地使用水洗涤步骤

(b3)/(c3)的产物;或

[0110] (1) (a1)与试剂接触,(b1)将步骤(a1)的产物与试剂分离,(c1)任选地使用碱水溶液处理步骤(b1)产物,和(d1)任选地使用水洗涤步骤(b1)/(c1)的产物;

[0111] (2) (a2)将试剂与步骤(b1)/(c1)/(d1)中的产物接触,(b2)将步骤(a2)的产物与试剂分离,(c2)任选地使用碱水溶液处理步骤(b2)的产物,和(d2)任选地使用水洗涤步骤(b2)/(c2)的产物;

[0112] (3) (a3)将试剂与步骤(b2)/(c2)/(d2)的产物接触,(b3)将步骤(a3)的产物与试剂分离,(c3)任选地使用碱水溶液处理步骤(b3)的产物,和(d3)任选地用水洗涤步骤(b3)/(c3)的产物;和

[0113] (4) (a4)将试剂与步骤(b3)/(c3)/(d3)的产物接触,(b4)将步骤(a4)的产物与试剂分离,(c4)任选地使用碱水溶液处理步骤(b4)的产物,和(d4)任选地使用水洗涤步骤(b4)/(c4)的产物。

[0114] 通常情况下,以分批方式接触试剂的每个步骤包括用试剂处理1至20分钟。

[0115] 在某些情况下,与试剂接触可包括将一个或多个聚合物纳米纤维或一个或多个非织造片材(每个都包括一个或多个聚合物纳米纤维)放置在支架上,其中它们可能已被压制、加热、脱保护和/或活化(即聚合物材料),并使试剂流经支架,因而在流动过程中与聚合物材料接触并使之官能化为色谱介质。以这种方式官能化聚合物材料在某些情况下可比在例如烧瓶或烧杯中将试剂简单地与聚合物材料接触更有效。

[0116] 通常情况下,该支架是一个适于支持聚合物材料的过滤器支架。通常情况下,该过滤器支架支持聚合物材料,使得通过所述过滤器支架传递的水性或液体物质与聚合物材料流动接触。因此,在本发明中,过滤器支架优选支持聚合材料以使得流动通过过滤器支架的试剂与聚合物材料流动接触。

[0117] 通常情况下,利用压力使所述试剂流经支架。

[0118] 通常情况下,使用泵(优选HPLC泵)使所述试剂流经支架。

[0119] 通常情况下,以循环的方式使该试剂流经支架。因此,任何离开支架的试剂都被再循环并再一次流经支架。

[0120] 通常情况下,所述试剂流经支架的时间为1至20分钟。

[0121] 通常情况下,所述试剂流经支架的速率为10至100 mL/min。

[0122] 通常情况下,在试剂流经支架之后,所得产物用碱水溶液处理,并任选地用水洗涤。优选地,在试剂流经支架之后,所得产物用碱水溶液处理,并用水洗涤。用碱水溶液处理优选地是用如上所述的热碱水溶液处理。通常情况下,在试剂流经支架之后,在进行下一步的处理步骤之前,应将所得产物从支架中移除。因此,优选地,在该试剂流经支架后,所得产物被从支架中移除,并用碱水溶液处理,且任选地用水洗涤。更优选地,在该试剂流经支架后,所得产物被从支架中移除,并用碱水溶液处理,再用水洗涤。

[0123] 试剂官能化处理前述物理和化学加工步骤的产物,以产生色谱介质,具体为官能化的色谱介质。通常情况下,试剂官能化上述步骤的产物,使得它适合于离子交换色谱法、亲和捕获色谱法或疏水色谱法。因此,与试剂接触通常产生被以下物质官能化的色谱介质:一个或部分带负电的部分、一个或部分带正电的部分、一种或多种蛋白质、模拟蛋白质配体的作用的模仿的或合成的配体、肽、抗体或其片段、染料、组氨酸、含有金属阳离子的基团、

或疏水基团。这类基团的实例在下文进一步定义。用于引入这些基团的合适试剂是本领域技术人员所知的。该试剂优选2-氯-N,N-二乙胺盐酸盐(DEACH)和缩水甘油基三甲铵,特别是当官能化的色谱介质用于阴离子交换色谱法时。其他优选的试剂是TEMPO,随后用高氯酸钠,或烯丙基缩水甘油醚,接着用亚硫酸氢钠,特别是当官能化的色谱介质用于阳离子交换色谱法时。另一优选的试剂是高碘酸钠,随后用蛋白A,特别是当官能化的色谱介质用于亲和色谱方法时。另一优选的试剂是氧化苯乙烯,特别是当官能化的色谱介质用于在疏水色谱法时。

[0124] 色谱介质和方法

[0125] 本发明方法的产物是官能化的色谱介质,即已经被化学改性以使它们适合于在一个或多个色谱方法中使用的色谱介质。特定的化学改性将在下面更详细地讨论。总体而言,这样的化学改性改变了色谱介质的化学和/或物理性质。这反过来会影响色谱介质在色谱法中使用时的表现。与未官能化形式的色谱介质相比,改性可能改变了官能化的色谱介质的极性、疏水性或生物结合特性。在某些情况下,与未官能化形式的色谱介质相比,改性可能改变了官能化的色谱介质的极性、疏水性或生物结合特性中的不止一个。在一个实施方式中,与未官能化形式的色谱介质相比,改性改变了官能化的色谱介质的极性和疏水性。

[0126] 色谱介质通常是膜的形式。这类膜适合于在膜色谱法中使用。膜色谱法是本领域技术人员公知的技术,并在Membrane Processes in Biotechnologies and Pharmaceutics” ed. Catherine Charcosset, Elsevier, 2012中进行了讨论,其全部内容通过引用并入本文。

[0127] 通常情况下,该官能化的聚合物色谱介质适用于离子交换色谱、亲和捕获色谱、疏水色谱和混合模式色谱。在某些情况下,色谱法以“混合模式”进行操作,即利用不止一种形式的相互作用,即离子交换、亲和捕获和疏水相互作用。通常,这种“混合模式”色谱涉及离子交换(离子)和疏水性相互作用。优选地,所述官能化的聚合物色谱介质适用于离子交换色谱、亲和捕获色谱和疏水色谱。在操作中,这样的色谱方法包括使含有目标分子的流动相流动经过吸附相(即这里的官能化的色谱介质)。通常,吸附相的选择使得目标分子能优先于同样存在于该流动相中的其它组分而保留在吸附相上。

[0128] 通常,所述聚合物色谱介质用DEAE、Q、SP、CM、蛋白A、苯基、或MEP基官能化,例如用DEAE或CM基官能化。一般地,聚合物是纤维素,色谱介质用DEAE、Q、SP、CM、蛋白A、苯基、或MEP基官能化,例如用DEAE或CM基官能化。因此,该官能化的色谱介质可是用DEAE、Q、SP、CM、蛋白A、苯基、或MEP基,例如DEAE或CM基衍生的纤维素。

[0129] 离子交换色谱是基于离子电荷而分离分子(通常是离子或极性分子)的技术。因此,在这种方法中使用的官能化的色谱介质含有一个或部分带正电荷或负电荷的部分。在官能化的色谱介质中的正和/或负电荷通常用一种或多种反荷离子平衡。离子交换色谱包括阳离子交换色谱和阴离子交换色谱中的一种或多种。

[0130] 用于阳离子交换色谱的官能化的色谱介质包含一个或部分带负电荷的部分。通常的带负电荷的部分包括一个或多个羧酸盐、磺酸盐或磷酸盐基团,或它们的混合物,即这些部分通常含有一个或多个 -COO^- 、 -SO_3^- 、或 $\text{-P(OH)}_2\text{O}^-$ 基团,或它们的混合物。通常的用于阳离子交换色谱的官能化的色谱介质包含一个或多个 $\text{-O-CH}_2\text{COO}^-$ 、 $\text{-CH}_2\text{COO}^-$ 、 -SO_3^- 、 $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ 、 $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ 、或 $\text{-P(OH)}_2\text{O}^-$ 部分。

[0131] 用于阴离子交换色谱的官能化的色谱介质包含有一个或部分带正电荷的部分。通常的带正电荷的部分包括一个或多个季胺基。通常的用于阴离子交换色谱的官能化的色谱介质包含一个或多个 $-N^+(CH_3)_3$ 、 $-N^+(C_2H_5)_3$ 、 $-CH_2CH_2N^+(C_2H_5)_3$ 、 $-CH_2CH_2N^+(C_2H_5)_2(CH_2CH(OH)CH_3)$ 、 $-O-CH_2CH_2-N^+(CH_3)_3$ 、 $-CH_2CH_2N^+(CH_3)_3$ 、或 $-CH_2CH_2N^+(CH_3)_2H$ 部分。

[0132] 亲和捕获色谱是基于它们与特定配体(通常是,但并不总是,生物配体)的亲合力来分离分子的技术。例如,这种方法可能依赖于抗体和抗原或酶和底物之间的吸引力。在亲和捕获色谱中使用的官能化的色谱介质通常包含一种或多种蛋白质、肽、抗体或其片段、染料、组氨酸、或含有金属阳离子的基团。另外,在亲和捕获色谱中使用的官能化的色谱介质可含有模拟蛋白质配体的作用的模拟的或合成的配体。

[0133] 通常在亲和捕获色谱中使用的蛋白质是本领域技术人员熟知的,并且包括蛋白A、蛋白G和蛋白L。

[0134] 通常在亲和捕获色谱中使用的抗体及其片段是本领域技术人员熟知的,并且包括IgG。

[0135] 通常在亲和捕获色谱中使用的染料是本领域技术人员熟知的,并且包括活性黄HE4R、活性红HE3B和活性汽巴蓝F3G。

[0136] 通常在亲和捕获色谱中使用的含有金属阳离子的基团是本领域技术人员熟知的。这些基团通常包括用于固定金属阳离子的螯合剂。金属阳离子通常选自铜、镍、锌和钴阳离子,优选 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Co^{2+} 。

[0137] 疏水相互作用色谱是基于分子的疏水性来分离它们的技术。因此,对在这种方法中使用的官能化的色谱介质包含含有一个或多个疏水基团的一个或部分。通常的疏水基包括丙基、丁基、苯基和辛基。

[0138] 混合模式(或者多模式)色谱是基于分子两个或更多个特性(通常是疏水性和离子电荷)来分离分子的技术。这可能包括疏水性和阴离子特性的结合,或疏水性和阳离子性质的结合。因此,对在这种方法中使用的官能化的色谱介质通常含有一个或部分,该一个或部分带正电荷或负电荷(通常为如上文所述),并且含有一个或多个疏水基团(通常如上文所述)。在官能化的色谱介质中的正电荷和/或负电荷通常以一种或多种反荷离子平衡。用于这种方法的官能化的色谱介质也可包含一种或多种可离子化的疏水性基团,以用于所谓的疏水电荷诱导色谱(HCIC)。因此,在一个实施方式中,混合模式色谱是疏水电荷诱导色谱。适用于这类方法的基团有4-巯基乙基吡啶(MEP)基和辛胺基。

[0139] 在包括疏水性和阴离子相互作用的结合的混合模式色谱方法中使用的官能化的色谱介质包括一个或多个带正电荷的部分(通常如以上所述)和一个或多个疏水基团(通常如以上所述)。适用于这类方法的基团有N-苄基甲基乙醇胺基和N-苯甲酰基同型半胱氨酸基团。在包括疏水性和阴离子相互作用的结合的混合模式色谱方法中使用的官能化的色谱介质包括一个或多个带负电荷的部分(通常如以上所述)和一个或多个疏水基团(通常如以上所述)。适用于这类方法中的基团有N-苯甲酰基同型半胱氨酸基团。

[0140] 本发明所述的用于制备官能化的色谱介质的方法通常包括将一个或多个部分引入至色谱介质中,使得所得到的包含这样的—一个或多个基团的官能化产物适合在色谱法中用作色谱介质。典型的部分、介质、试剂和方法如以上所定义。一个或多个部分通过将试剂与包含在一个或多个聚合物纳米纤维或一个或多个非织造片材(每个非织造片材包含一个

或多个聚合物纳米纤维)中的一个或多个官能团反应而引入,这些聚合物纳米纤维或非织造片材通常是经过压制、加热、脱保护和/或活化处理的。通常的官能团包括羟基、氨基和羧基。

[0141] 在与试剂反应前,一个或多个官能团可能被活化。可以采用本领域中已知的常规活化方法。因此,在官能团是羟基的情况下,该基团可通过用羰基二咪唑(CDI)、双环氧乙烷、氰尿酸、N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS)或2-氟-1-甲基吡啶鎓甲苯-4-磺酸盐(FMP)处理而被活化。当官能团为氨基的情况下,该基团可以通过用表氯醇、戊二醛或环氧化物处理而被活化。当官能团为羧基的情况下,该基团可以通过用CDI或1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)处理而被活化。

[0142] 本领域技术人员可以选择合适的试剂而将特定部分引入特定聚合物,例如,以那些包含在聚合物中的官能团为基础。通常的试剂包括2-氯-N,N-二乙胺盐酸盐(DEACH)。

[0143] 通常情况下:

[0144] - 色谱法是一种阳离子交换法,试剂以羧酸盐基、磺酸盐基或磷酸盐基官能化色谱介质;

[0145] - 色谱法是一种阴离子交换法,试剂以季氨基或二乙胺基官能化色谱介质;

[0146] - 色谱法是一种亲和捕获色谱法,试剂以蛋白质、肽、抗体或其片段、染料、组氨酸、或含有金属阳离子的基团官能化色谱介质;

[0147] - 色谱法是一种疏水相互作用色谱法,试剂以丙基、丁基、苯基、或辛基官能化色谱介质;或者

[0148] - 色谱法是一个混合模式色谱法,试剂以MEP、辛胺基、N-苄基甲基乙醇胺或N-苯甲酰基同型半胱氨酸基官能化色谱介质。

[0149] 优选地:

[0150] - 色谱法是一种阳离子交换法,试剂以羧酸盐基、磺酸盐基或磷酸盐基官能化色谱介质;

[0151] - 色谱法为阴离子交换法,试剂以季氨基或二乙胺基官能化色谱介质;

[0152] - 色谱法是一种亲和捕获色谱法,试剂以蛋白质、肽、抗体或其片段、染料、组氨酸、或含有金属阳离子基团官能化色谱介质;或者

[0153] - 色谱法是一种疏水相互作用色谱法,试剂以丙基、丁基、苯基、或辛基官能化色谱介质;或者。

具体实施方式

[0154] 从最广泛的意义上说,本发明提供制备官能化的色谱介质的方法,该方法包括通过物理和化学步骤的结合处理一个或多个聚合物纳米纤维,以产生适合于在色谱法中作为色谱介质使用的一种官能化的产物。

[0155] 通常,所述一个或多个聚合物纳米纤维是如本文所定义的。该一个或多个聚合物纳米纤维可作为一个或多个非织造片材提供,每一个片材都包括一个或多个聚合物纳米纤维。通常情况下,提供两个或更多个非织造片材,每一个都包括一个或多个聚合物纳米纤维。

[0156] 通常情况下,物理处理步骤是本文所述的加热和压制步骤。通常情况下,加热和压

制的步骤是同时进行的。

[0157] 通常情况下,化学处理步骤是本文所述的与试剂接触的步骤。

[0158] 通常情况下,色谱法如本文所述。

[0159] 本发明通常提供了一种用于制备官能化的聚合物色谱介质的方法,该方法包括(I)提供本文所述的两个或更多个非织造片材,一个堆叠在另一个之上,每一个包括一个或多个如本文所述的聚合物纳米纤维,(II)如本文所述,同时加热和压制堆叠的片材,使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合,和(III)与本文所述,将压制和加热的产物试剂相接触,所述试剂使步骤(II)的产物被官能化为如本文所述的色谱介质。

[0160] 在本发明的一个优选实施方式中,试剂官能化的步骤以分批的方式进行。这增加了所得到的官能化的聚合物色谱介质的结合能力。因此,在该优选的实施方式中,本发明提供了一种用于制备官能化的聚合物色谱介质的方法,该方法包括(I)提供本文所述的两个或更多个非织造片材,一个堆叠在另一个之上,每一个包括一个或多个如本文所述的聚合物纳米纤维,(II)如本文所述,同时加热和压制堆叠的片材,使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合,和(III)将步骤(II)的产物以分批方式与如本文所述的试剂至少接触两次,该试剂使步骤(II)的产物被官能化为如本文所述的色谱介质。

[0161] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,试剂官能化的步骤是通过对流进行的。这种方式通常比常规的扩散方式更有效。因此,在该进一步优选的实施方案中,本发明提供了一种用于制备官能化的聚合物色谱介质的方法,该方法包括(I)提供本文所述的两个或更多个非织造片材,一个堆叠在另一个之上,每一个包括一个或多个如本文所述的聚合物纳米纤维,(II)如本文所述,同时加热和压制堆叠的片材,使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合,和(III)如本文所述,将步骤(II)的产物放在支架中,以及(IV)使本文所述的试剂流过支架,使之在流动过程中与步骤(II)的产物接触并使之官能化为如本文所述的色谱介质。

[0162] 优选地,官能化的聚合物色谱介质是官能化的纤维素色谱介质。

[0163] 在本发明更进一步优选的实施方案中,本发明提供了一种用于制备官能化的纤维素色谱介质的方法,该方法包括(i)提供本文所述的两个或更多个非织造片材,一个堆叠在另一个之上,每一个包括一个或多个如本文所述的醋酸纤维素纳米纤维,(ii)如本文所述,同时加热和压制堆叠的片材,使相邻片材的醋酸纤维素纳米纤维之间的接触点熔合,和(iii)如本文所述,处理加热压制后的产物,以使醋酸纤维素转变成纤维素,和(iv)将因此所得的产物与本文所述的试剂接触,该试剂使步骤(iii)的产物被官能化为如本文所述的色谱介质。

[0164] 在本发明的一个最优选的实施方式中,本发明提供了一种用于制备官能化的纤维素色谱介质的方法,该方法包括(i)如本文所述,提供本文所述的两个或更多个非织造片材,一个堆叠在另一个之上,每一个包括一个或多个醋酸纤维素纳米纤维,(ii)如本文所述,同时加热和压制堆叠的片材,使相邻片材的醋酸纤维素纳米纤维之间的接触点熔合,和(iii)如本文所述处理压制和加热后的产物,以使醋酸纤维素转变成纤维素,和(iv)将因此所得的产物以分批方式与本文所述试剂接触2至4次,所述试剂使步骤(iii)的产物官能化为如本文所述的色谱介质。

[0165] 在本发明另一个最优选的实施方案中,本发明提供了一种用于制备官能化的纤维

素色谱介质的方法,该方法包括(i)如本文所述,提供本文所述的两个或更多个非织造片材,一个堆叠在另一个之上,每一个包括一个或多个醋酸纤维素纳米纤维,(ii)如本文所述,同时加热和压制堆叠的片材,使相邻片材的醋酸纤维素纳米纤维之间的接触点熔合,和(iii)如本文所述,处理经压制合加热的产物,使醋酸纤维素转变成纤维素,和(iv)如本文所述,将因此所得的产物放置在支架中,(v)使试剂流经支架,使试剂在流动过程中与步骤(iii)收获的产物接触并使之官能化为如本文所述的色谱介质。

[0166] 优选地,步骤(i)所述片材一个堆叠在另一个之上,数量在2~30之间,更优选5~25之间,每个片材包括1、2或3个聚合物纳米纤维,并且每个片材具有的厚度为5~40 μm 。

[0167] 还优选地,步骤(ii)中堆叠的片材同时在聚合物的熔点以下的温度加热和在0.01~5MPa的压力下压制1~120分钟,以使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合,得到的压制和加热的产物具有的平均密度为250~750 kg/m^3 ,厚度为0.05~10 mm。

[0168] 更优选地:

[0169] - 步骤(I)所述片材一个堆叠在另一个之上,数量在2~30之间,更优选5~25之间,每个片材包括1、2或3个聚合物纳米纤维,并且每个片材具有的厚度为5~40 μm ;并且

[0170] - 步骤(II)中堆叠的片材同时在聚合物的熔点以下的温度加热和在0.01~5 MPa的压力下压制1~120分钟,以使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合,得到的压制和加热的产物具有的平均密度为250~750 kg/m^3 ,厚度为0.05~10 mm。

[0171] 优选地,步骤(I)所述片材一个堆叠在另一个之上,数量在2~30之间,更优选5~25之间,每个片材包括单个聚合物纳米纤维,并且每个片材具有的厚度为5~120 μm 和面密度为1~40 g/m^2 。

[0172] 还优选地,步骤(II)中堆叠的片材同时在聚合物的熔点以下的温度被加热和在1~500 kPa的压力下压制处理1~30分钟,以使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合,得到的压制和加热的产物具有的平均密度为200~1000 kg/m^3 ,厚度为0.05~10 mm。

[0173] 更优选地:

[0174] - 步骤(I)所述片材一个堆叠在另一个之上,数量在2~30之间,更优选5~25之间,每个片材包括单个聚合物纳米纤维,并且每个片材具有的厚度为5~120 μm 和面密度为1~40 g/m^2 ;并且

[0175] - 步骤(II)中堆叠的片材同时在聚合物的熔点以下的温度被加热和在1~500 kPa的压力下压制处理1~30分钟,以使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合,得到的压制和加热的产物具有的平均密度为200~1000 kg/m^3 ,厚度为0.05~10 mm。

[0176] 在一个优选的实施方式中,一个或多个聚合物纳米纤维被压制和加热。这种方法提高了官能化的聚合物色谱介质的结构特性。因此,在这一个优选的实施方式中,本发明提供了一种用于制备官能化的聚合物色谱介质的方法,该方法包括(I)如本文所述,提供一个或多个聚合物纳米纤维,(II)如本文所述,压制该一个或多个聚合物纳米纤维,(III)如本文所述,加热该一个或多个聚合物纳米纤维,使这一个或多个聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合,和(IV)如本文所述,将压制加热后的产物与所述试剂接触,该试剂使步骤(III)的产物被官能化为色谱介质。

[0177] 在这个优选的实施方式中,提供一个或多个聚合物纳米纤维的步骤通常包括提供一个或多个非织造片材,每一个包括一个或多个聚合物纳米纤维。

[0178] 在一个更优选的实施方式中,使用试剂官能化的步骤以分批方式进行。这种方法提高了官能化的聚合物色谱介质的结合能力。因此,在这一个更优选的实施方式中,本发明提供了一种用于制备官能化的聚合物色谱介质的方法,该方法包括(I)如本文所述,提供一个或多个聚合物纳米纤维,(II)如本文所述,任选地压制该一个或多个聚合物纳米纤维,(III)如本文所述,任选地加热该一个或多个聚合物纳米纤维,使这一个或多个聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合,和(IV)将步骤(I)、(II)或(III)的产物以分批方式与所述试剂至少接触2次,该试剂使步骤(I)、(II)或(III)的产物被官能化为如本文所述的色谱介质。

[0179] 在这个更优选的实施方式中,提供一个或多个聚合物纳米纤维的步骤通常包括提供一个或多个非织造片材,每一个包括一个或多个聚合物纳米纤维。

[0180] 该更优选的实施方式优选包括(I)如本文所述,提供一个或多个聚合物纳米纤维,(II)如本文所述,压制该一个或多个的聚合物纳米纤维,(III)如本文所述,加热该一个或多个聚合物纳米纤维,使该一个或多个聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合,和(IV)将步骤(III)的产物以分批方式与如本文所述试剂至少接触2次,该试剂使步骤(III)的产物被官能化为如本文所述的色谱介质。

[0181] 该更优选的实施方式更优选地包括(I)如本文所述,提供一个或多个非织造片材,每一个片材包括一个或多个的聚合物纳米纤维,(II)如本文所述,压制一个或多个非织造片材,(III)如本文所述,加热该一个或多个非织造片材,使该一个或多个聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合,和(IV)将步骤(III)的产物以分批方式与所述试剂至少接触2次,该试剂使步骤(III)的产物被官能化为如本文所述的色谱介质。

[0182] 在另一个更优选的实施方式中,使用试剂官能化的步骤以对流方式进行。这种方式通常比标准扩散方式更有效。因此,在这一个更优选的实施方式中,本发明提供了一种用于制备官能化的聚合物色谱介质的方法,该方法包括(I)如本文所述,提供一个或多个聚合物纳米纤维,(II)如本文所述,任选地压制一个或多个,的聚合物纳米纤维,(III)如本文所述,任选地加热该一个或多个聚合物纳米纤维,使这一个或多个的聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合,,(IV)如本文所述,将步骤(I)、(II)或(III)的产物放在支架中,和(V)使试剂流经支架,该试剂在流动过程中与步骤(I)、(II)或(III)的产物接触并使之官能化为如本文所述的色谱介质。

[0183] 该另一个更优选的实施方式优选包括(I)如本文所述,提供一个或多个聚合物纳米纤维,(II)如本文所述,压制该一个或多个聚合物纳米纤维,(III)如本文所述,加热该一个或多个聚合物纳米纤维,使这一个或多个聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合,(IV)如本文所述,将步骤(III)的产物放置在支架中,和(V)使试剂流经支架,该试剂在流动过程中与步骤(III)的产物接触并使之官能为如本文所述的色谱介质。

[0184] 该另一个更优选的实施方式更优选包括(I)如本文所述,提供一个或多个非织造片材,每一个包括一个或多个聚合物纳米纤维,(II)如本文所述,压制该一个或多个非织造片材,(III)如本文所述,加热该一个或多个非织造片材,使这一个或多个聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合,(IV)如本文所述,将步骤(III)的产物放置在支架中,和(V)使试剂在支架中流动,该试剂在流动过程中与步骤(III)的产物接触并使之官能化为如本文所述的色谱介质。

[0185] 优选地,官能化的聚合物色谱介质是官能化的纤维素色谱介质。

[0186] 在一个最优的实施方式中,本发明提供了一种用于制备官能化的纤维素色谱介质的方法,该方法包括(i)如本文所述,提供一个或多个非织造片材,每一个包括一个或多个醋酸纤维素纳米纤维,(ii)如本文所述,任选地压制该一个或多个非织造片材,(iii)如本文所述,任选地加热该一个或多个非织造片材,使这一个或多个醋酸纤维素纳米纤维的部分之间的接触点熔合,(iv)如本文所述,处理压制和加热的产物将醋酸纤维素转变成纤维素,和(v)将由此收获的产物以分批方式与试剂接触2~4次,该试剂使步骤(iv)的产物官能化为如本文所述的色谱介质。

[0187] 在一个最优的实施方案中,本发明提供了一种用于制备官能化的纤维素色谱介质的方法,该方法包括(i)如本文所述,提供一个或多个非织造片材,每一个包括一个或多个醋酸纤维素纳米纤维,(ii)如本文所述,压制该一个或更多的非织造片材,(iii)如本文所述,加热该一个或多个非织造片材,使这一个或多个醋酸纤维素纳米纤维的部分之间的接触点熔合,(iv)如本文所述,处理压制和加热的产物将醋酸纤维素转变成纤维素,和(v)如本文所述,将由此收获的产物放置在支架中,和(vi)使试剂流经支架,该试剂在流动过程中与步骤(iv)的产物接触并使之官能化为如本文所述的色谱介质。。

[0188] 本发明的官能化的色谱介质

[0189] 本发明还提供一种官能化的色谱介质,该介质可以通过本发明方法得到。

[0190] 本发明还提供一种官能化的色谱介质,该介质通过本发明方法得到。

[0191] 本发明的官能化的色谱介质通常具有的孔隙为0.1~1.0 μm ,优选为0.3~0.9 μm ,更优选为0.4~0.8 μm ,甚至更优选为0.5~0.7 μm ,还更优选为0.6~0.7 μm ,例如为0.6~0.65 μm 。

[0192] 本发明的官能化的色谱介质具有的密度为200~1000 kg/m^3 ,优选250~750 kg/m^3 ,更优选为350~650 kg/m^3 ,在某些情况下为450~550 kg/m^3 。其他优选的密度包括为200~750 kg/m^3 、200~650 kg/m^3 、200~550 kg/m^3 、250~750 kg/m^3 、250~650 kg/m^3 和250~550 kg/m^3 。

[0193] 通常情况下,本发明的官能化的色谱介质具有的厚度为0.05~10 mm,例如为0.1~5 mm。

[0194] 优选地,本发明的官能化的色谱介质被官能化,使得它适合于在如本文所定义的色谱法中使用,例如离子交换色谱、亲和捕获色谱和疏水色谱。

[0195] 本发明的官能化的色谱介质通常是以膜的形式存在。

[0196] 本发明的色谱分析小柱

[0197] 本发明还提供了一种色谱分析小柱。本发明的色谱分析小柱包括本发明的一种或多种官能化的色谱介质。作为选择,本发明的色谱分析小柱可通过实施本发明的方法和将由此得到的产物加入分析小柱中而获得的。

[0198] 本发明还提供了一种制备色谱分析小柱的方法,该方法包括实施本发明的方法和将由此得到的产物加入分析小柱中。

[0199] 色谱分析小柱通常适合用于色谱法,优选为本文所述的色谱法。

[0200] 本发明的色谱分析小柱通常包括在支架内(例如以上所述的支架)本发明的一种或更种官能化的色谱介质,。该支架通常是圆柱形的。

[0201] 通常情况下,色谱分析小柱包括堆叠在一个圆柱形的支架中的本发明的一种或多种官能化的色谱介质。

[0202] 通常情况下,本发明的色谱分析小柱包括两种或更多种官能化的色谱介质。通常情况下,本发明的色谱分析小柱最多包括20种官能化的色谱介质。

[0203] 通常情况下,色谱分析小柱还包括位于通常是圆柱形的支架内的一个或多个滤头(frit)。滤头是本领域技术人员公知的,它是指刚性的多孔结构,通常是刚性的金属、聚合物或陶瓷,优选刚性的金属或陶瓷多孔结构。滤头通常被包括在一个色谱分析小柱里,以改善通过小柱的流动分配和/或支持本发明的一种或多种官能化的色谱介质。典型滤头的孔隙直径为1~1000 μm ,优选5~500 μm ,更优选为10~150 μm 。其它合适的滤头孔径包括1~20 μm ,优选为5~10 μm ,更优选为3~7 μm 。

[0204] 通常情况下,色谱分析小柱还包括一个或多个入口流体分配装置和/或出口流体收集装置。这种装置是本领域技术人员所熟知的。

[0205] 本发明的色谱法

[0206] 本发明还提供了本发明的官能化的色谱介质或色谱分析小柱在色谱法中的应用,特别是在本文所述的色谱法中的应用。

[0207] 本发明还提供了一种从流动相分离一种或多种生物分子的方法,该方法包括将流动相中的一种或多种生物分子与本发明的官能化的色谱介质或色谱分析小柱接触。该色谱介质或色谱分析小柱优先于也存在于流动相的其它组分(例如其它生物分子)结合流动相中的一种或多种生物分子。这可以根据已知的这些色谱方法结合相的常规方法来进行。

[0208] 因此,通常情况下,这种色谱法是离子(阴离子或阳离子)交换色谱法、亲和捕获色谱法、疏水相互作用色谱法或混合模式色谱法。

[0209] 优选地,色谱方法是阴离子交换色谱法,色谱介质用DEAE或Q官能化;色谱方法是阳离子交换色谱法,色谱介质用SP或CM官能化;色谱方法是亲和捕获色谱法,色谱介质用蛋白A官能化;或色谱方法是疏水相互作用色谱法,色谱介质用苯基官能化。

[0210] 因此,本发明提供了一种色谱方法,其包括上述步骤。通常,所述色谱方法是按照如上所述的一个色谱方法进行。

[0211] 色谱方法通常包括从官能化的色谱介质或色谱分析小柱中回收所述一种或多种生物分子的额外步骤。此步骤通常可以通过将吸附了所述一种或多种生物分子的官能化的色谱介质或色谱分析小柱与洗脱缓冲液接触来实现。这可以根据因这样的色谱法的洗脱相而为人所知的常规方法来进行。因此,该方法通常是一个结合-洗脱色谱法。

[0212] 在结合和洗脱步骤之间,本发明的方法可以进一步包括洗涤吸附有一种或多种生物分子的官能化的色谱介质或色谱分析小柱的步骤。此洗涤步骤除去了未结合到官能化的色谱介质或色谱分析小柱的任何组分。这可以根据因这些色谱方法的洗涤相而为人所知的常规方法来进行。

[0213] 在洗脱步骤后,该方法可以进一步包括再生本发明的官能化的色谱介质或色谱分析小柱的步骤。通常情况下,这是通过将已洗脱了其中的一种或多种生物分子的官能色谱介质或色谱分析小柱与缓冲液接触而实现的。这可以根据因这些色谱方法的再生相而为人所知的常规方法来进行。

[0214] 通常情况下,该一种或多种生物分子选自于蛋白质、多肽、抗体、氨基酸、病毒和核酸,例如,包括重组蛋白、单克隆抗体、病毒疫苗和质粒DNA。

[0215] 单克隆抗体可以是多特异性抗体(例如双特异性抗体)或结构域缺失型抗体。优选

的单克隆抗体是人源化抗体或人抗体。可以使用单克隆抗体的抗原结合片段。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、双抗体和单链抗体。

[0216] 通常,色谱方法使用模拟的或真实的移动床系统。因此,通常情况下,该方法包括将流动相中的一种或多种生物分子引入到一个或多个模拟或真实的移动床色谱装置中,该装置具有多个相连的色谱柱,该色谱柱含有本发明作为吸附剂的官能化的色谱介质。

[0217] 任何已知的模拟或真实的移动床装置都可被用来进行色谱方法,只要它含有本发明的官能化的色谱介质作为吸附剂。

[0218] 模拟和真实的移动床色谱是公知的技术,是本领域的技术人员所熟悉的。操作原理涉及液体洗脱相和固体吸附相的逆流运动。此操作允许最少溶剂使用量,使该方法在经济上可行。这种分离技术已经应用于不同的领域,包括利用膜吸附剂纯化生物分子。

[0219] 模拟的移动床系统由多个串联连接在一起的含有吸附剂的独立柱组成。洗脱液以第一方向通过柱。原料和洗脱液的注入点以及系统中的分离组分的收集点通过一系列阀门装置被周期性转换。总的效果是模拟含固体吸附剂的移动床的单个柱的操作。因此,模拟的移动床系统由多个柱组成,这些柱如在传统的固定床系统中一样包含使洗脱液流过的固体吸附剂的固定床,但在一个模拟的移动床系统中,其操作使得其模拟连续逆流的移动床。

[0220] 真实的移动床系统在操作上类似于模拟的移动床系统。然而,不是通过一系列的阀门装置系统将原料混合物和洗脱液的注入点和分离组分的收集点进行转换,而是通过一系列的吸附单元(即柱)在物理上相对于进料口和出料口进行移动。同样地,其操作使得其模拟连续逆流移动床。

[0221] 本发明的聚合物介质

[0222] 本发明还提供了制备聚合物介质的方法,该方法包括:如本文所述,提供两个或更多个非织造片材,一个堆叠在另一个之上,每个所述片材包括两个或更多个聚合物纳米纤维,并且如本文所述,同时加热和压制堆叠的片材,使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合。本发明还提供了一种可通过本发明方法获得的聚合物介质。

[0223] 本发明方法的第一步包括提供两个或更多个非织造片材。因此,本发明还提供一种制备聚合物介质的方法,该方法包括:如本文所述,提供两个或更多个非织造片材的堆叠体,每个所述片材包括两个或更多个聚合物纳米纤维,以及如本文所述,同时加热和压制片材的堆叠体,使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合。本发明还提供了一种可通过本发明方法获得的聚合物介质。

[0224] 该方法还可包括:如本文所述,润湿和压制两个或更多个非织造片材的堆叠体,随后进行如本文所述的加热。通常的润湿、压制和加热条件如以上所述。因此,在本实施方式中,本发明提供了一种用于制备聚合物介质的方法,该方法包括:

[0225] (I)如本文所定义,提供两个或更多个非织造片材,一个堆叠在另一个之上,每个所述片材包含一个或多个聚合物纳米纤维;

[0226] (II)如本文所定义,用任选地含水的有机溶剂湿润片材的堆叠体;

[0227] (III)如本文所定义,压制片材的堆叠体,和

[0228] (IV)如本文定义,加热经压制的堆叠体,使相邻片材的纳米纤维之间的接触点熔合。

[0229] 本发明的聚合物介质的优选特征和生产该聚合物介质的方法的优选特征如以上

关于本发明的色谱介质和用于生产本发明的色谱介质的方法中所述。

[0230] 以下实施例阐释了本发明。

[0231] 材料和设备

[0232] 除非另有说明,本发明采用下述材料、设备和技术。

[0233] BSA蛋白质牛血清白蛋白第V组分,>96%,分子量为~66kDa。它和所有其它化学品都从Sigma-Aldrich公司(Sigma-Aldrich Company Ltd. Dorset, UK)购得,购买时选用最高纯度,使用时不需要进一步纯化,除非另有说明。

[0234] 从马的心脏获得的细胞色素c,纯度 $\geq 90\%$,分子量~12 kDa,购自Merck Chemical (Merck Serono Ltd. Middlesex, UK)。

[0235] 制备实施例1

[0236] 制备纳米纤维素膜

[0237] 将0.20 g/mL的醋酸纤维素溶液(相对分子质量为29000g/mol)溶解于丙酮/二甲基甲酰胺/乙醇(2:2:1)中。在Climate Zone气候控制柜(al-safetech Luton, UK)中进行电纺,以使得能够对环境的温度和湿度条件进行控制。从O. Hardick, et al, J.Mater. Sci. 46 (2011) 3890获得优化的条件,以用于生产电纺醋酸纤维素纳米纤维的非织造片材,其具有低分布的纤维直径,平均厚度为20微米,平均面密度为10 g/m²。

[0238] 当电纺时,将15个表面积为100 cm²的非织造纳米纤维片材堆叠,一个在另一个之上,并通过手动液压机在1MPa的压力下压制2分钟。压制后,材料的片材立即放入一个预热烤箱中的金属板之间,在213℃加热5分钟。金属片之间的压力被确定为20 kPa。然后将压制和加热后的材料切成多个直径为25 mm的圆片。

[0239] 实施例1

[0240] 利用对流进行化学改性

[0241] 醋酸纤维素纳米纤维圆片按如上方法制备并进行化学改性以产生阴离子交换表面官能。按下文所述对厚度为0.188毫米和总体积为0.1mL的圆片进行改性。

[0242] 在衍生化之前,纳米纤维圆片被装入一个过滤器支架中。使用30mL 的在DI水:乙醇(2:1)中的0.1MNaOH进行脱乙酰化,该溶液通过使用Dionex, P680 HPLC泵以速率为25 mL/min 泵送通过该圆片,并进行24小时。圆片然后用300mL 的去离子水以25 mL/min的速度清洗。然后,通过循环20 mL热(40℃)的15%2-氯-N,N-二甲基乙胺盐酸盐99%(DEACH)的水溶液,以40 mL/min的速率循环通过圆片,并进行10min,以赋予阴离子交换表面官能。然后从过滤器支架壳体取出圆片并放置30秒滴干后,放置到20 mL热(80℃)的0.5M的NaOH溶液中,该溶液用50mL样品管装,然后用振荡器温和搅拌10min。最后,圆片用去离子水的多次漂洗,并在使用前干燥。

[0243] 实施例2

[0244] 进行如上述实施例1所述的实验,只是使用的醋酸纤维素纳米纤维的圆片的厚度为0.376mm并且总体积为0.2mL。

[0245] 实施例3

[0246] 利用扩散进行化学改性

[0247] 醋酸纤维素纳米纤维圆片的制备如上。按如下所述对厚度为0.188毫米和总体积为0.1mL的圆片进行改性。

[0248] 将圆片放置在50mL样品管中,其含有30mL热(80℃)的在DI水:乙醇(2:1)中的0.1MNaOH,,在实验室的振荡器上处理24小时,使醋酸纤维素脱乙酰化而形成再生纤维素。然后,圆片在振荡器上用30mL体积的去离子水彻底清洗,循环10次,每次5分钟。然后,通过将漂洗圆片放到含20毫升热(40℃)的15%的2-氯-N,N-二甲基乙胺盐酸盐99%(DEACD)水溶液的样管中处理10分钟,引入阴离子交换表面的官能。将吸附剂除去并放置30秒滴干后,将其放入装有含20mL热(80℃)的0.5M的NaOH溶液的新样品管中,振荡处理10min。最后,圆片用去离子水多次漂洗,并在使用前干燥。

[0249] 实施例4

[0250] 进行的实验如上述实施例1,但是使用的醋酸纤维素纳米纤维圆片的厚度为0.376mm,总体积为0.2mL。

[0251] 实施例5

[0252] 生物分离性能的分析

[0253] 分析了按照实施例1至4制备和修改的纳米纤维圆片,以比较由两种不同的方法衍生的等质量和体积的纳米纤维膜的蛋白结合性能。这是为了确定这些纳米纤维系统呈现出的表面积改性程度。

[0254] 使用AKTA Basic(GE医疗生命科学,白金汉郡,英国)进行实验,在线测量紫外吸收(280nm)、pH和电导率。

[0255] 用5mL 20mM Bis-Tris、pH5.3洗涤缓冲液在480cm/h的速率平衡按照实施例1至4制备和修改的纳米纤维圆片,然后加载1mL含有1mg/ml BSA和0.25mg/mL细胞色素C的双组分蛋白溶液。然后使5mL洗涤缓冲液通过吸附剂,然后引入5mL 0.4M NaCl 20mM Bis-Tris、pH 5.3的洗脱缓冲液。然后使用Unicorn 5.0软件分析通过峰面积的积分测量的洗脱能力。

[0256] 使用BSA和细胞色素C的混合物,以利用它们不同的等电点,并因此利用对通过离子交换色谱的分离的适应性。在25℃的水中,细胞色素C的pI为10.0,而BSA的pI为4.7。这意味着,在pH5.3的Bis-Tris缓冲溶液中,细胞色素C将具有有净正电荷,并且不会结合至DEAE吸附剂的弱阴离子交换表面。与此相反,在该高于BSA的pI的pH下,BSA将具有净负表面电荷,因此将结合至DEAE吸附剂。因为在洗脱期间盐浓度增加,BSA的负表面电荷和阴离子交换器之间的相互作用被盐离子竞争击败,因此从吸附剂中移除并收集BSA。

[0257] 在若干运行周期中分析吸附剂的性能,以确定关于吸附剂的寿命的再生性。下表列出了所测试的圆片的平均结合能力。

样品	吸附剂的厚度(mm)	吸附剂的体积(mL)	结合能力(mg/mL)
实施例1	0.188	0.1	5.64±0.10
[0258] 实施例3	0.188	0.1	5.56±0.40
实施例2	0.376	0.2	6.46±0.44
实施例4	0.376	0.2	5.88±0.56

[0259] 对于纳米纤维圆片的两个厚度,对流改性方法比扩散改性方法给出了更高的结合能力。这种效果对较厚圆片更显著。

[0260] 还观察到化学试剂到达聚合物系统的官能化表面的能力取决于纳米纤维膜的厚度。因此,对于所测试的较厚的纳米纤维膜,对通过对流衍生的DEAE纳米纤维吸附剂观察到

显著提高的结合能力。这表明,对于所研究的方案,扩散不足以使化学试剂到达所有的结合表面区域。

[0261] 实施例6

[0262] 重复的扩散的化学改性

[0263] 如上述实施例4所述进行纤维素纳米纤维圆片的阴离子交换表面衍生,即使用的醋酸纤维素纳米纤维圆片具有的厚度为0.376mm和总体积为0.2mL。然后从DEACH的引入点到方案的末尾重复进行化学改性。

[0264] 因此,将实施例4中得到的圆片置于具有20 mL温(40℃)的15% 2-氯-N,N-二乙基乙胺盐酸盐99% (DEACH)的水溶液的样品管中10分钟。移除吸附剂并让其滴干30秒后,放置到振动台上新的样品管中的20 mL热(80℃)的0.5M的NaOH中10分钟,然后用去离子水多次漂洗。

[0265] 实施例7

[0266] 如实施例6地进行实验,但是再重复一次化学改性。

[0267] 因此,将在实施例6中得到的圆片置于具有20 mL温(40℃)的15% 2-氯-N,N-二乙基乙胺盐酸盐99% (DEACH)的水溶液的样品管中10分钟。移除吸附剂并让其滴干30秒后,放置到振动台上新的样品管中的20 mL热(80℃)的0.5M的NaOH中10分钟,然后用去离子水多次漂洗。

[0268] 实施例8

[0269] 如实施例7地进行实验,但是再重复一次化学改性。

[0270] 因此,将在实施例7中得到的圆片置于具有20 mL温(40℃)的15% 2-氯-N,N-二乙基乙胺盐酸盐99% (DEACH)的水溶液的样品管中10分钟。移除吸附剂并让其滴干30秒后,放置到振动台上新的样品管中的20 mL热(80℃)的0.5M的NaOH中10分钟,然后用去离子水多次漂洗。

[0271] 实施例9

[0272] 使用在实施例5中所述的方案,对在实施例4和6至8中制造的圆片进行结合能力的分析。也确定了每个圆片的压降。

[0273] 下表列出了所测试的圆片的平均结合能力和压降

样品	化学改性	压降(MPa)	结合能力 (mg/mL)
实施例 4	x1	0.210	5.88±0.56
实施例 6	x2	0.205	13.31±3.11
实施例 7	x3	0.245	14.88±0.38
实施例 8	x4	0.205	15.88±0.73

[0275] 这些结果通过重复的衍生方案步骤,显示了在官能团取代中的清晰的改进。对使用在衍生期间重复的方案步骤测试的吸附剂观察到结合能力整体提高270%。压降没有受到重复改性的影响。

[0276] 重复衍生DEAE纳米纤维吸附剂的结构稳定性似乎并未受到影响,这已经在重复性研究中证实,该研究显示了在50次典型的操作中恒定的性能。

[0277] 图1示出未结合细胞色素C+的BSA(第一波峰)在双组份混合物的加载期间和BSA的

洗脱(第二波峰)的流动。50个相同的结合实验运行的平均结果显示样品群体的 ± 1 标准偏差(由围绕相同颜色的主曲线的虚曲线示出)。这些结果示出了50个相同的结合实验运行的再现性,并示出了对于所选择的条件,纳米纤维吸附剂可再现地进行,捕获和洗脱加载的BSA的99%。计算标准偏差,从而表明纳米纤维吸附剂仍继续运行。

[0278] 图2示出未结合细胞色素C+的BSA(第一波峰)在双组份混合物的加载期间和BSA的洗脱(第二波峰)的流动。进行了多次结合实验运行,对实验绘制的曲线记录了500次的实验运行。对两个实验运行记录的曲线几乎完全重叠。这也表明根据本发明制备的膜获得了优异的再生性。这与现有技术的膜所报道的多次运行后性能显著下降相反。

[0279] 制备实施例2

[0280] 将0.20g/mL的醋酸纤维素溶液(相对分子质量为29000g/mol)溶解在常见的溶剂(例如丙酮/二甲基甲酰胺/乙醇)中。使用来自O. Hardick, et al, J.Mater. Sci. 46 (2011) 3890的最佳条件,制备具有低分布的纤维直径的电纺醋酸纤维素纳米纤维的非织造片材,其平均厚度为20微米,平均面积密度为20g/m²。

[0281] 在电纺之后,将10个表面积为100cm²的纳米纤维非织造片材一个堆叠在另一个的顶部,然后在208°C在金属片之间放置于预热的烤箱中30分钟。金属片之间的压力被确定为20kPa。然后将压制和加热的片材切割成多个直径为25mm的圆片。

[0282] 分析实例1-加热和压制的效果

[0283] 如制备实施例2中描述地获得10个醋酸纤维素纳米纤维片材。将这些片材一个堆叠在另一个的顶部,并经受热压机中20kPa的压力,并同时加热至207°C。在热压机中对堆叠的片材压制和加热5min。在压制和加热之后,切割所得的膜的圆片。使用实施例3中概述的方法,将醋酸纤维素纤维脱乙酰化成纤维素。以这种方式制备的样品在下文中称为“压制”样品,反映了加热是在热压机中进行的。

[0284] 将“压制”圆片放入50ml注射器内的橡胶O型环中,该注射器作为容器来使O形环定位。将10ml移液管尖(重量5.81g)形式的重量置于纳米纤维圆片的中心。将1M NaOH溶液加入到容器中,并用计时器确定失效点。在移液管尖下跌穿过圆片时确定失效点。移液管尖下跌穿过圆片所需的时间长度表示出圆片的化学耐受性。该实验重复三次。

[0285] 图3示出实验装置。

[0286] 进一步如上所述地制备纳米纤维片圆片,但是这10个纳米纤维片材首先在20kPa的压力下在压力机(不需加热)中压制1小时,随后在烤箱中在207°C下加热(不需压制)五分钟。以这种方式制备的样品在下文中称为“烤箱”样品,反映了加热是在烤箱中进行的。

[0287] 将“烤箱”圆片放入在橡胶O型环中,并进行上述的化学耐受性测试。同样,此实验重复三次。

[0288] 对于“压机(压制)”和“烤箱”圆片的结果列于下表。

	圆片1	圆片2	圆片3
	66 分钟	71 分钟	88 分钟
烤箱			
压机	>120 小时	>120 小时	>120 小时

[0290] 从这些结果可以看出,被同时压制和加热的圆片比那些先压制(不加热)并随后加热(不压制)的圆片具有好得多的化学耐受性。

[0291] 在暴露于1M NaOH中10min之内,“烤箱”圆片出现变色和点蚀。而即使暴露于1M NaOH中120小时后,“压制”圆片仍几乎不降解。图4示出各个圆片的照片。

[0292] 确定了若干“压制”和“烤箱”圆片的厚度和密度。图5示出这些圆片的厚度与平均密度。发现“压制”圆片比“烤箱”圆片更薄和密度更大。

[0293] 通过测定在经过圆片的Tris-HCl缓冲液(pH 8)的递增的流速(2, 5, 10, 20, 30, 40, 60 ml/min)下的三角柱压降,分析“压制”和“烤箱”圆片的流动特性。图6示出所获得的数据。可以看出,“压制”和“烤箱”圆片具有相似的流动特性。

[0294] 分析实施例2-不同压力的影响

[0295] 使用分析实施例1中描述“压制”圆片的方法制备再生的纤维素圆片。以这种方式制备的圆片在下文中称为“20kPa”圆片。

[0296] 使用以上对“20kPa”圆片描述的方法制备其他圆片,但是使用的压力为200kPa,而不是20kPa。以这种方式制备的圆片在下文中称为“200kPa”圆片。

[0297] 确定了若干“20kPa”和“200kPa”的圆片的厚度和密度。图7示出这些圆片的厚度和平均密度。发现“200kPa”圆片比“20kPa”圆片更薄和密度更大。

[0298] 通过分析实例1中描述的方法分析“20kPa”和“200kPa”圆片的流动特性。图8示出所获得的数据。可以看出,在“200kPa”圆片上的压降比在“20kPa”圆片上的更高。

[0299] 使用实施例3的方法,用DEAE将“20kPa”和“200kPa”的再生纤维素圆片官能化。使用类似于实施例5中列出的方案确定这些圆片的动态结合能力(DBC)。通过1M NaCl洗脱步骤,使用pH 8的Tris-HCl缓冲液,使用不同质量(1mg, 2mg, 4mg)的BSA,在30ml/min的流速下确定动态结合能力(DBC)。图9示出DBC分析的结果。“20kPa”圆片的DBC比“200kPa”圆片的更高。

[0300] 实施例10

[0301] 根据制备实施例2的方法制备纳米纤维圆片。将圆片脱乙酰化并在室温下用DEAC浸渍,然后在室温下用0.5M NaOH洗涤5次。在DEAC中的浸渍和用0.5M NaOH的洗涤被重复多至5次,它也是下面所述的官能化的循环的次数。因此,圆片被官能化1个循环、2个循环、3个循环、4个循环和5个循环。

[0302] 使用在分析实施例1中描述的的方法来分析1、2、3、4、5个循环的圆片的流动特性,其中使用递增的流速(2, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 ml/min),并使用pH 8的Tris-HCl缓冲液。图10示出所获得的数据。可以看出,压降随着循环次数的增加而增加。

[0303] 使用在分析实施例2中描述的的方法来分析1、2、3、4、5个循环的圆片的动态结合能力(DBC)。图11示出DBC的分析结果。从1到4个循环,DBC增加,然后到第5个循环时下降。

[0304] 实施例11-SP官能化的圆片的制备

[0305] 使用制备实施例2和实施例1的方法制备再生的纤维素圆片。

[0306] 将2ml烯丙基缩水甘油醚加入到10ml DMSO和5mL 1M NaOH的溶液中,然后加入10个再生纤维素纤维圆片。通过加入NaOH(1M),将在30ml水中的亚硫酸氢钠(3克)调节至pH 6.5。然后用该混合物处理在上面第一步骤中得到的圆片。然后用0.1M HCl洗涤圆片,接着用水洗涤。

[0307] 为了确定动态结合能力,用类似于在实施例5中概述的方法来分析SP-官能化的圆片。利用pH 5的10mM醋酸钠缓冲液平衡AKTA纯化系统(GE Healthcare)。将1mg/ml的溶菌酶

的样品以30ml/min的速率加载到该系统中。将1M NaCl (pH 5的10mM 醋酸钠缓冲剂)的溶液用于洗脱。在280nm的在线UV追踪产生了在图12中示出的色谱图。

[0308] 实施例12-CM官能化的圆片的制备

[0309] 使用制备实施例2和实施例1的方法制备再生的纤维素圆片。

[0310] 将它们加入到NaBr (24.3 mmol)和TEMPO (1.60 mmol)的水溶液中并用NaOH调节至pH 10。向此加入NaOCl (5.0 mmol),直到pH值没有进一步的变化。然后用EtOH洗涤圆片。

[0311] 为了确定圆片的动态结合能力,AKTA系统以30ml/min的流速运行,所使用的样品是具有1ml的负载注入的1mg/ml浓度的溶菌酶。使用pH 5的10mM醋酸钠缓冲液来平衡和清洗系统。将1 M NaCl (pH 5的10mM醋酸钠缓冲液)用于洗脱。在280nm的在线UV追踪产生了在图13中示出的色谱图。

[0312] 实施例13-Q官能化的圆片的制备

[0313] 使用制备实施例2和实施例1的方法制备再生的纤维素圆片。

[0314] 将它们加入到DMSO: 1M NaOH: 缩水甘油基三甲基铵为2:1:0.1的溶液中。然后用0.1M HCl溶液和水洗涤圆片。

[0315] 为了确定动态结合能力,用pH 8的10mM Tris-HCl 缓冲液平衡AKTA纯化系统(GE Healthcare)。将1mg/ml的BSA的样品以20 mL/min加载到该系统中。将1M NaCl (pH 8的10mM的Tris-HCl 缓冲液)的溶液用于洗脱。在280nm的在线UV追踪产生了在图14中示出的色谱图。

[0316] 实施例14-蛋白A官能化的圆片

[0317] 使用制备实施例2和实施例1的方法制备再生的纤维素圆片。

[0318] 将它们加入到含有6.5g NaIO₄的80 mL醋酸钠缓冲液(pH 5.5)中。然后用50mL乙二醇洗涤圆片,随后用水洗涤。然后用0.05%的Triton X-100、pH 9.0的100mM的碳酸盐/碳酸氢盐洗涤圆片。用0.05%的Triton X-100、pH 9.0的100mM的碳酸盐/碳酸氢盐的溶液透析蛋白A配体,然后将其加入到圆片。然后倾析溶液,并加入0.05%的Triton X-100、pH 9.0的100mM的碳酸盐/碳酸氢盐溶液。向该溶液中加入100mM的硼氢化钠溶液,得到最终硼浓度为4mM的溶液。然后倾析该溶液,并加入20%的在50mM磷酸盐和150mM氯化钠中的乙醇的pH 6.7的缓冲液。上述洗涤步骤重复9次。

[0319] 为了确定动态结合能力,以30 ml/min的流速运行AKTA系统,所使用的样品是具有1ml的负载注入的1mg/ml浓度的蛋白A纯化的IgG。使用pH 7.4的PBS缓冲液来平衡和清洗系统。将pH 3.0的0.1 M柠檬酸钠缓冲溶液用于洗脱。在280nm的在线UV追踪产生了在图15中示出的色谱图。

[0320] 实施例15-苯基官能化的圆片

[0321] 使用制备实施例2和实施例1的方法制备再生的纤维素圆片。

[0322] 将它们加入到75 mL的DMSO: 1M NaOH以2:1混合的溶液中。然后将氧化苯乙烯(7.5mL)加入到反应混合物中,在室温下搅拌4小时。然后用甲醇洗涤圆片,再用水洗涤。

[0323] 为了确定动态结合能力,AKTA系统以10ml/min的流速运行,所用的样品是具有1ml的负载注入的0.1 mg/ml溶菌酶(具有1.5M硫酸铵)。使用1.5M硫酸铵和pH 8的10mM的Tris来平衡和清洗系统。将pH 8的10mM Tris 用于洗脱。在280nm的在线UV追踪产生了在图16中示出的色谱图。

[0324] 分析实施例3-加热和压制前进行堆叠的影响

[0325] 如在上述分析实施例1所讨论的,按照本发明制备的再生纤维素圆片(以下简称“压制”圆片)在化学耐受性测试(如图3所示)中耐受了>120小时。“压制”圆片甚至在暴露于NaOH中120小时后也很少降解(如图4所示)。

[0326] 按照制备实施例2中的描述获得醋酸纤维素纳米纤维单层片材。单层片材由两个平面PTFE片材夹持,并放置在烤箱中以208°C加热1小时,参见Ma, et al, Journal of Membrane Science 265 (2005) 115-123中描述的方法。按照实施例3中概述的方法将所得到的片材脱乙酰化。从所得的纤维素片材上切割出十个片材并堆叠在一起,参见Ma等人的描述。以这种方式制备的样品在下文中统称为“Ma等人”样品。这个过程重复8次以创建八个十圆片堆叠体。

[0327] 将“Ma等人”十圆片堆叠体放置在橡胶O形圈中,并进行上面分析实施例1中描述的化学耐受性测试,重复三次。这三个“Ma等人”圆片分别在十分钟、十分钟、两分钟后测试失败。

[0328] 从这些结果可知,从先堆叠后同时加热和压制的多个非织造纳米纤维片材中形成的圆片,与先加热单个纳米纤维片材,随后堆叠形成的圆片相比,具有更好的化学耐受性。

[0329] 如图17所示,“Ma等人”圆片暴露于1M NaOH中10 min内出现变色和点蚀。而“热压”圆片暴露于1M NaOH中甚至120小时(图4)也很少降解。

[0330] 测定了多个“热压”和“Ma等人”圆片的厚度和密度。图18示出这些圆片的厚度和平均密度。发现“热压”圆片比“Ma等人”圆片更薄更致密。

[0331] “热压”和“Ma等人”圆片的流动特性通过测定在不断升高流过圆片的Tris-HCl缓冲液(pH 8)的流速的情况下三角柱的压降来进行分析。图19示出所获得的数据。可以看出,该“热压”圆片和“Ma等人”圆片具有类似的流动特性。

[0332] “热压”圆片和“Ma等人”圆片按照实施例3中的方法用DEAE配体官能化。这些圆片的动态结合能力使用与实施例5类似的方案测定。动态结合能力(DBC)在30ml/min的流速,使用不同质量的BSA(1mg、2mg、4mg),使用PH8的Tris-HCl缓冲液,并且使用1M NaCl洗脱步骤来测定。图20示出DBC分析的结果。“热压”圆片的DBC比“Ma等人”圆片的更高。

[0333] 测定了“热压”圆片和“Ma等人”圆片进行重复官能化的可能性。在“热压”和“Ma等人”再生纤维素圆片上进行对实施例10中所述圆片的DEAE重复官能化的方法。“Ma等人”材料的差的化学稳定性,意味着它是不可能通过使用多个官能化循环来提高DBC。“Ma等人”材料可能的最大DBC约为7 mg / ml(如图20所示)。通过使用多个官能化循环可以提高“热压”材料的DBC至约16 mg / ml(见图11)。该“Ma等人”材料在多次DEAE循环后显著降解。没有“热压”材料中观察到这个问题。图21示出“Ma等人”和“热压”材料在多次官能化循环后的照片。图21的底部照片示出“Ma等人”材料,而顶部照片示出“热压”材料。

[0334] 本发明的一些优选实施方案如下。

[0335] [1]一种制备官能化纤维素色谱介质的方法,该方法包括(i)提供一个或多个非织造片材,每一个包括一个或多个醋酸纤维素纳米纤维,(ii)压制该一个或多个非织造片材,(iii)加热该一个或多个非织造片材,使一个或多个醋酸纤维素纳米纤维的部分之间的接触点熔合,(iv)处理由此获得的压制和加热产物使醋酸纤维素转变成纤维素,和(v)将由由此获得的产物以分批方式与试剂接触2~4次,使步骤(iv)的产物官能化为色谱介质。

[0336] [2] 按照[1]的方法,与试剂接触的每个步骤包括(a)与试剂接触,(b)将步骤(a)的产物与试剂分离,(c)任选地使用碱水溶液处理步骤(b)的产物,和(d)任选地用水洗涤步骤(b)/(c)的产物。

[0337] [3] 按照[1]或[2]的方法,步骤(v)包括

[0338] (1) (a1)将步骤(iv)的产物与试剂接触,(b1)从试剂中分离出步骤(a1)的产物,(c1)任选地使用碱水溶液处理步骤(b1)的产物,和(d1)任择地用水洗涤步骤(b1)/(c1)的产物,并且

[0339] (2) (a2)将步骤 (b1)/(c1)/(d1)的产物与试剂接触,(b2)从试剂中分离出步骤(a2)的产物,(c2)任选地使用碱水溶液处理步骤(b2)的产物,和(d2)任选地用水洗涤步骤(b2)/(c2)的产物;或者

[0340] (1) (a1)将步骤(iv)的产物与试剂接触,(b1)从试剂中分离出步骤(a1)的产物,(c1)任选地使用碱水溶液处理步骤(b1)中的产物,和(d1)任选地用水洗涤步骤(b1)/(c1)的产物,

[0341] (2) (a2)将步骤 (b1)/(c1)/(d1)的产物与试剂接触,(b2)从试剂中分离出步骤(a2)中的产物,(c2)任选地使用碱水溶液处理步骤(b2)的产物,和(d2)任选地用水洗涤步骤(b2)/(c2)的产物;和

[0342] (3) (a3)将步骤 (b2)/(c2)/(d2)的产物与试剂接触,(b3)从试剂中分离出步骤(a3)的产物,(c3)任选地用碱水溶液处理步骤(b3)的产物,和(d3)任选地用水洗涤步骤(b3)/(c3)的产物;或者

[0343] (1) (a1)将步骤(iv)的产物与试剂接触,(b1)从试剂中分离出步骤(a1)的产物,(c1)任选使用碱水溶液处理步骤(b1)的产物,和(d1)任选地用水洗涤步骤(b1)/(c1)的产物;

[0344] (2) (a2)将步骤 (b1)/(c1)/(d1)的产物与试剂接触,(b2)从试剂中分离出步骤(a2)的产物,(c2)任选地使用碱水溶液处理步骤(b2)的产物,和(d2)任选地用水洗涤步骤(b2)/(c2)的产物;

[0345] (3) (a3)将步骤 (b2)/(c2)/(d2)的产物与试剂接触,(b3)从试剂中分离出步骤(a3)的产物,(c3)任选地使用碱水溶液处理步骤(b3)的产物,和(d3)任选地用水洗涤步骤(b3)/(c3)的产物;和

[0346] (4) (a4)将步骤 (b3)/(c3)/(d3)的产物与试剂接触,(b4)从试剂中分离出步骤(a4)的产物,(c4)任选选地使用碱水溶液处理步骤(b4)的产物,和(d4)任选地用水洗涤步骤(b4)/(c4)的产物。

[0347] [4] 根据前述实施例的任一个的方法,每一个与试剂接触的步骤进行1至20分钟的时间。

[0348] [5] 一种制备官能化纤维素色谱介质的方法,该方法包括(i)提供一个或多个非织造片材,每一个包括一个或多个醋酸纤维素纳米纤维,(ii)压制该一个或多个非织造片材,(iii)加热该一个或多个非织造片材,使一个或多个醋酸纤维素纳米纤维的部分之间的接触点熔合,(iv)处理由此获得的经压制和加热产物使醋酸纤维素转变成纤维素,和(v)将由此获得的产物放置于一个支架中,和(vi)使试剂流经支架,以使试剂在流动过程中与步骤(iv)获得的产物接触,将步骤(iv)的产物管官能化为色谱介质。

- [0349] [6] 按照[5]的方法,步骤(vi)包括
- [0350] -在压力下使试剂流经支架;和/或
- [0351] -使用泵使试剂流经支架;和/或
- [0352] -以循环的方式使试剂流经支架;和/或
- [0353] -使试剂流经支架并持续1至20分钟。
- [0354] [7] 按照[6] 或[7]的方法,其还包括用碱水溶液处理步骤(vi)的产物的步骤,以及任选地用水洗涤由此获得的产物的步骤。
- [0355] [8] 按照先前的任一实施例的方法,官能化的纤维素色谱介质适用于选自以下的色谱方法:离子交换色谱法、亲和捕获色谱法或疏水相互作用色谱法。
- [0356] [9]按照[8]的方法,
- [0357] -色谱法是一种阳离子交换法,试剂以一个或多个羧酸盐基、磺酸盐基或磷酸盐基官能化色谱介质;
- [0358] - 色谱法是一种阴离子交换法,试剂以一个或多个季氨基或二乙胺基官能化色谱介质;
- [0359] - 色谱法是一种亲和捕获色谱法,试剂以一个或多个蛋白质、肽、抗体或其片段、染料、组氨酸、或含有金属阳离子的基团官能化色谱介质;
- [0360] - 色谱法是一种疏水相互作用色谱法,试剂以一个或多个丙基、丁基、苯基、或辛基官能化色谱介质;或者
- [0361] - 色谱法是一个混合模式色谱法,试剂以一个或多个MEP、辛胺基、N-苄基甲基乙醇胺或N-苯甲酰基同型半胱氨酸基官能化色谱介质。
- [0362] [10] 按照先前的任一实施例的方法,其中在纤维素色谱介质上的一个或多个羟基被官能化。
- [0363] [11] 按照先前的任一实施例的方法,其中该一个或多个纤维素纳米纤维的平均直径为10 nm至1000 nm。
- [0364] [12] 按照先前的任一实施例的方法,压制一个或多个非织造片材的步骤使用的压力为0.01至5 MPa。
- [0365] [13] 按照先前的任一实施例的方法,加热一个或多个非织造片材的步骤使用的温度为200至220°C。
- [0366] [14] 一种制备官能化的聚合物色谱介质的方法,包括(I) 提供一个或多个聚合物纳米纤维;(II) 压制这一个或多个聚合物纳米纤维;(III) 加热这一个或多个聚合物纳米纤维,使这一个或多个聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合; 和(IV) 将压制和加热产物与试剂接触,使步骤 (III)的产物官能化为色谱介质。
- [0367] [15] 一种制备官能化的聚合物色谱介质的方法,包括(I) 提供一个或多个聚合物纳米纤维;(II) 任选地压制这一个或多个聚合物纳米纤维;(III) 任选地加热这一个或多个聚合物纳米纤维,使这一个或多个聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合; 和(IV) 将步骤 (I)、(II) 或 (III)的产物以分批方式与试剂至少接触2次而使之官能化为色谱介质。
- [0368] [16] 一种制备官能化的聚合物色谱介质的方法,包括(I) 提供一个或多个聚合物纳米纤维;(II) 任选地压制这一个或多个聚合物纳米纤维;(III) 任选地加热这一个或多

个聚合物纳米纤维,使这一个或多个聚合物纳米纤维的部分之间的接触点熔合;(IV)将步骤(I)、(II)或(III)的产物放置在一个支架中,和(V)使试剂在支架中的流动,以使试剂在流动过程中与步骤(I)、(II)或(III)的产物接触,并使之官能化为色谱介质。

[0369] [17]按照[14]至[16]中的任一个方法,所述官能化的色谱介质适用于如权利要求[8]或[9]所定义的色谱法。

[0370] [18]按照[14]至[16]中的任一个方法,其中在色谱介质上的一个或多个羟基、氨基或羧酸基被官能化。

[0371] [19]按照[14]至[16]中的任一个方法,聚合物选自纤维素、醋酸纤维素、聚砜、聚酰胺、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚丙烯腈、聚苯乙烯、聚环氧乙烷以及它们的混合物。

[0372] [20]能够通过前述任一实施例的方法获得的官能化的色谱介质。

[0373] [21]一种制备色谱分析小柱的方法,该方法包括实施[1]至[19]中的任一方法,以及将由此获得的产物加入色谱小柱。

[0374] [22]一种色谱分析小柱,其(a)可由[21]的方法获得,或(b)包括一种或多种按照[20]的官能化的色谱介质。

[0375] [23]按照[20]的一种官能化的色谱介质或按照[22]的色谱分析小柱在色谱法中的应用。

[0376] [24]一种从流动相中分离出一种或多种生物分子的方法,该方法包括将在流动相中的一种或多种生物分子与按照[20]的官能化的色谱介质或按照[22]的色谱分析小柱接触。

[0377] [25]按照[24]的方法,它是一种离子交换色谱法、亲和捕获色谱法或疏水相互作用色谱法。

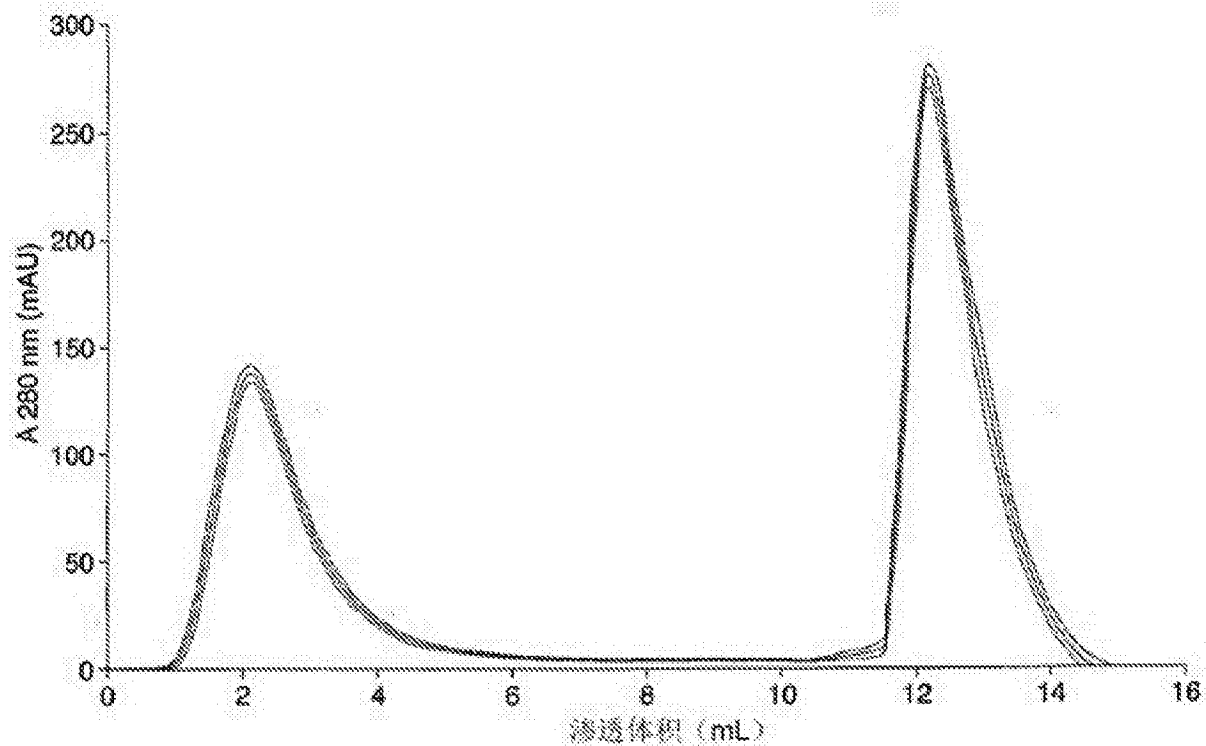


图1

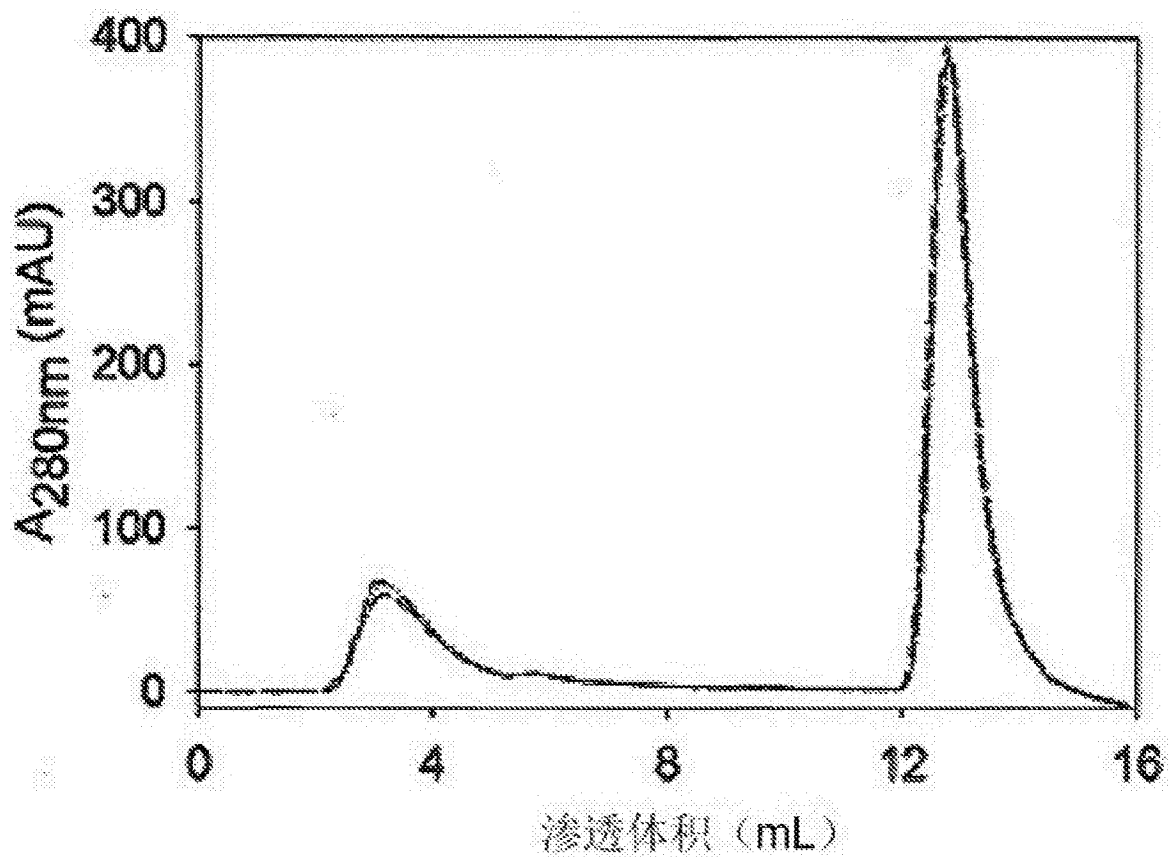


图2

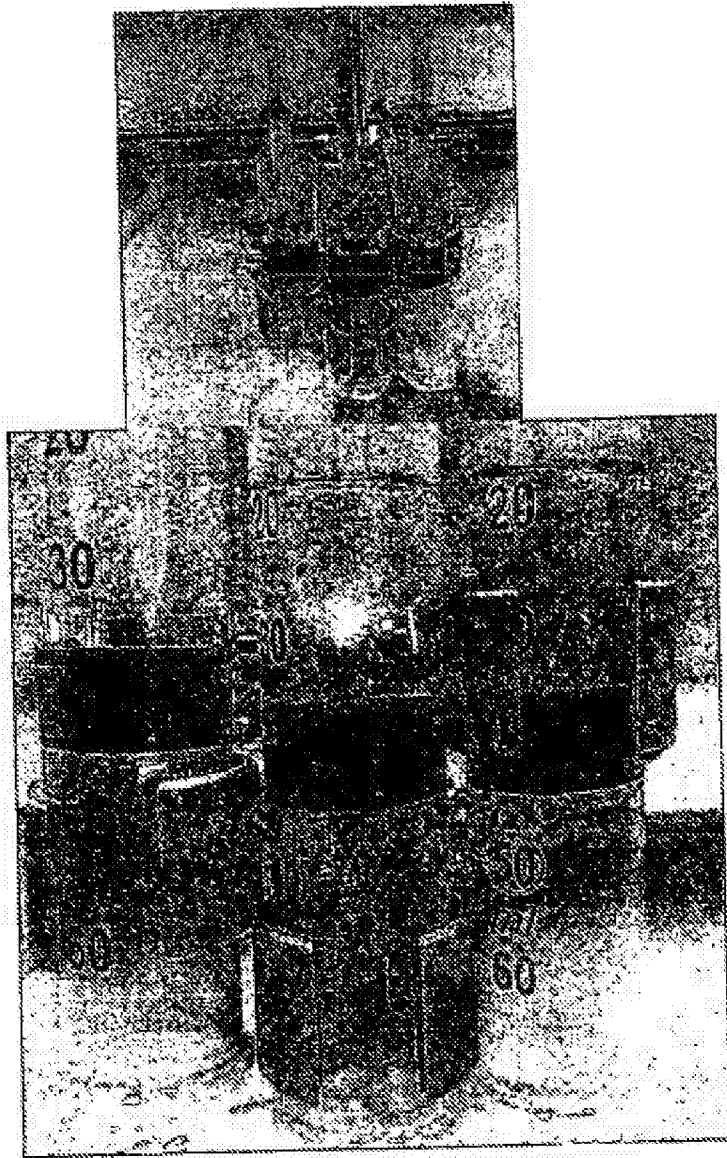


图3

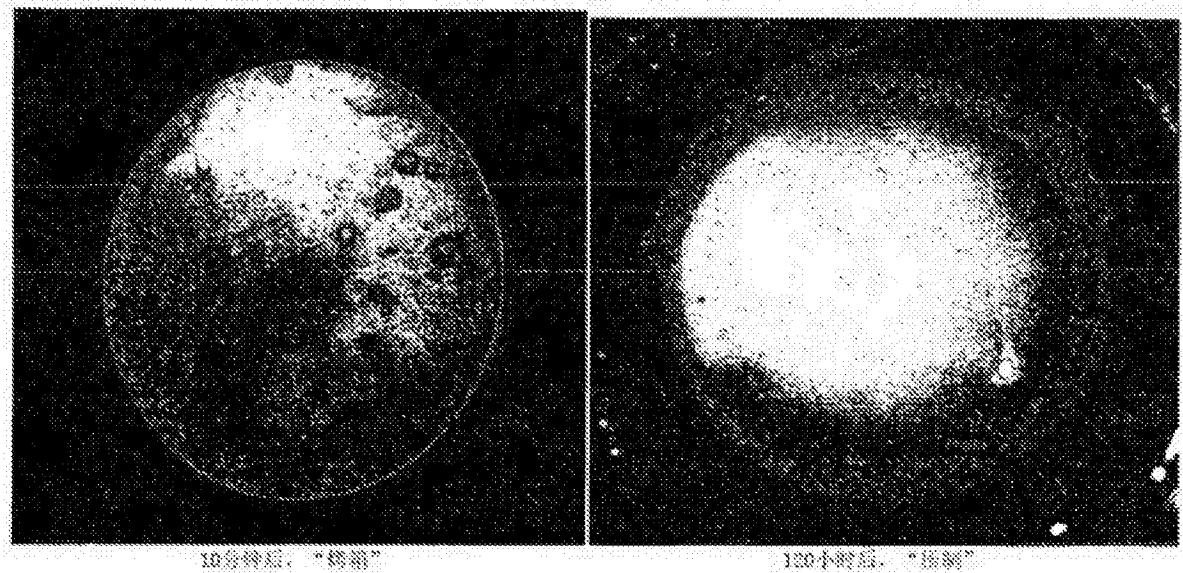


图4

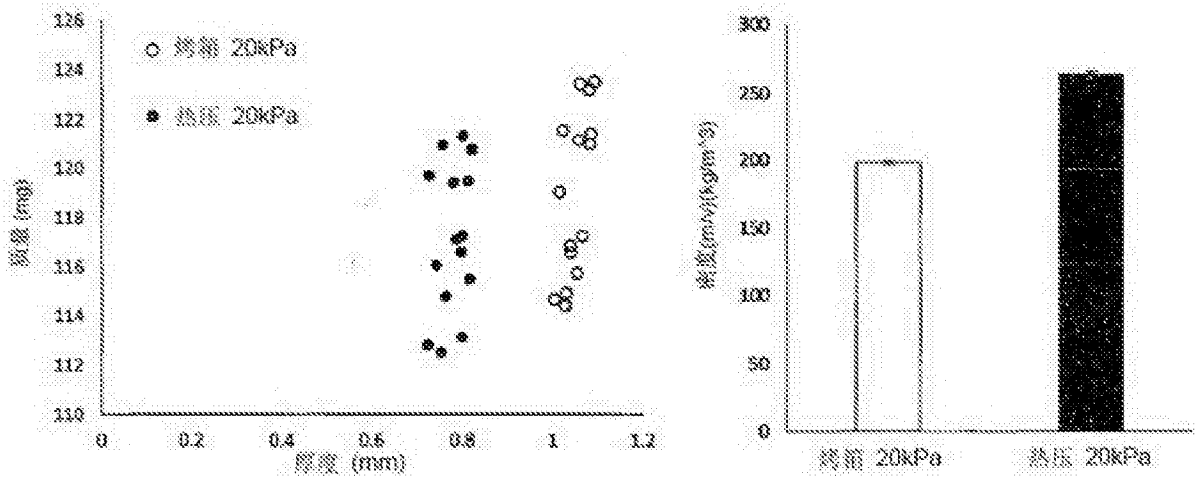


图5

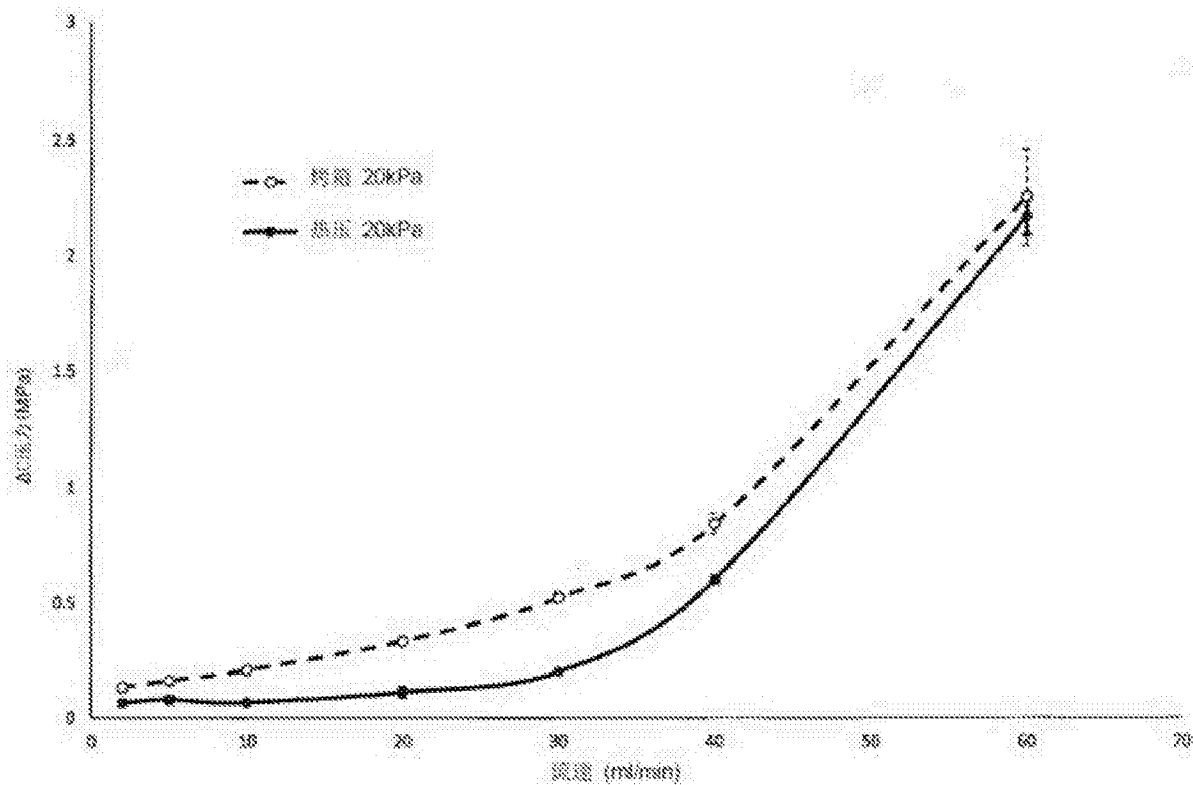


图6

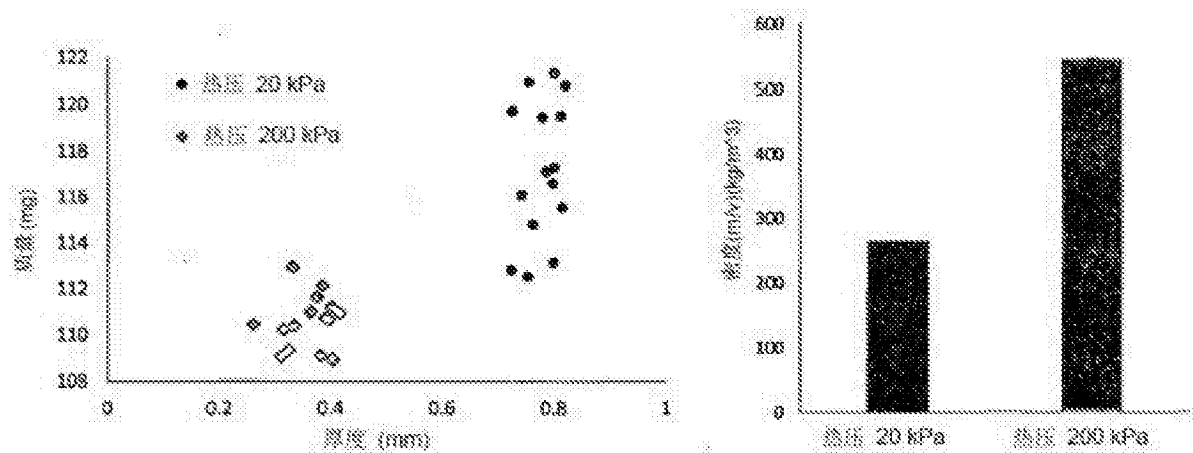


图7

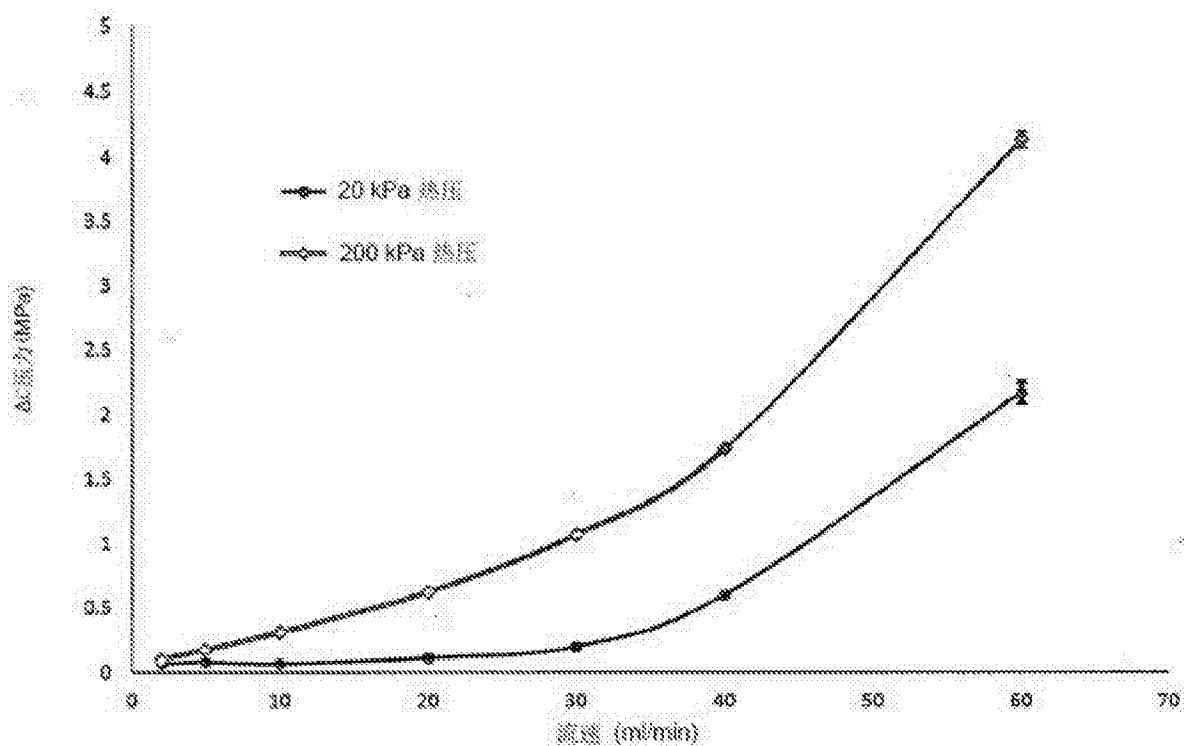


图8

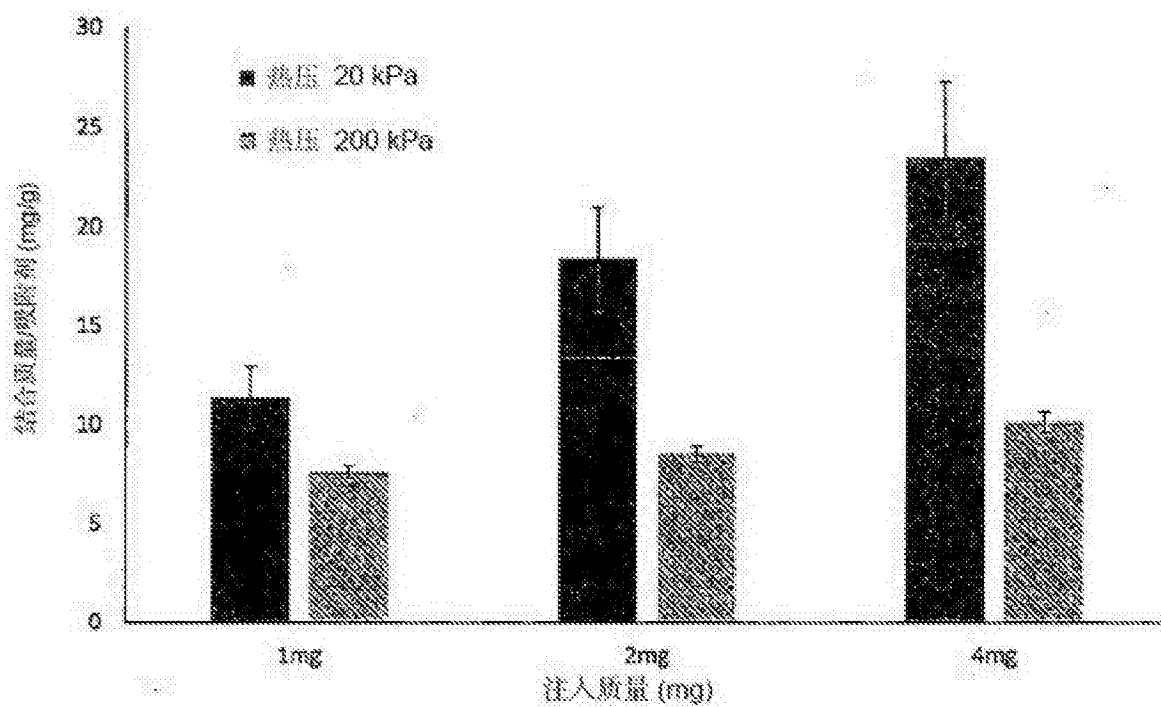


图9

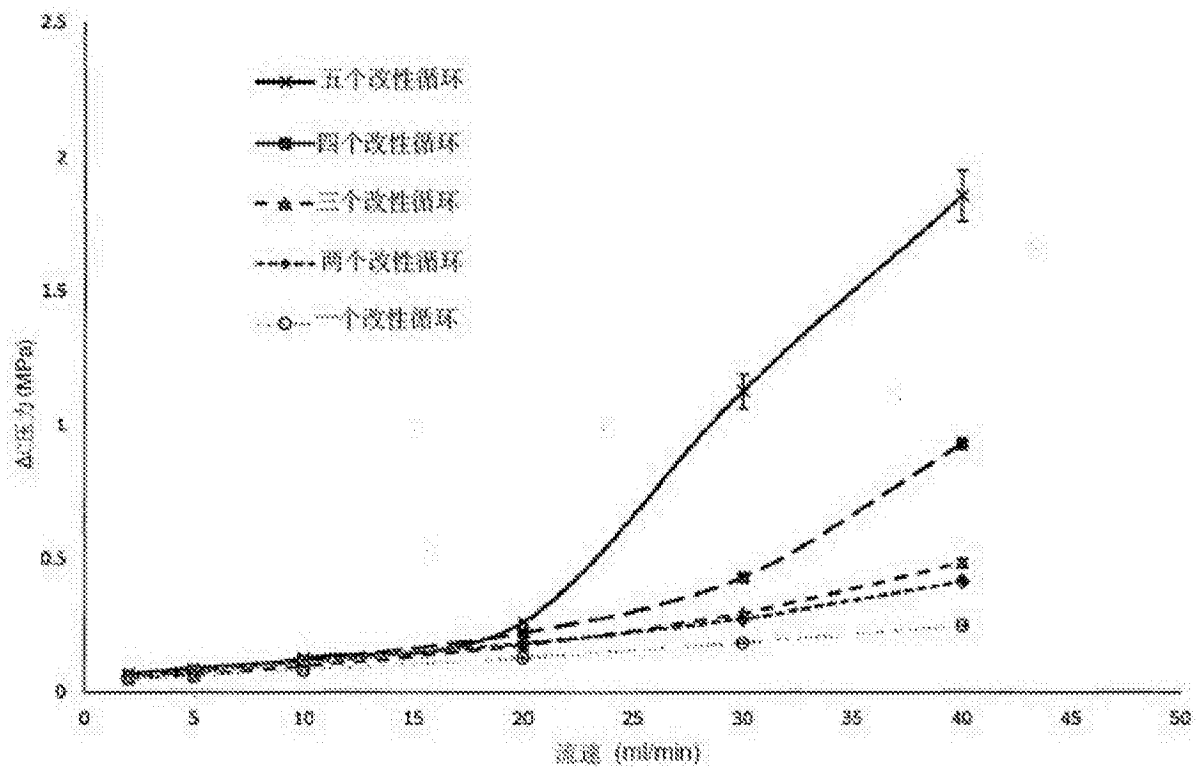


图10

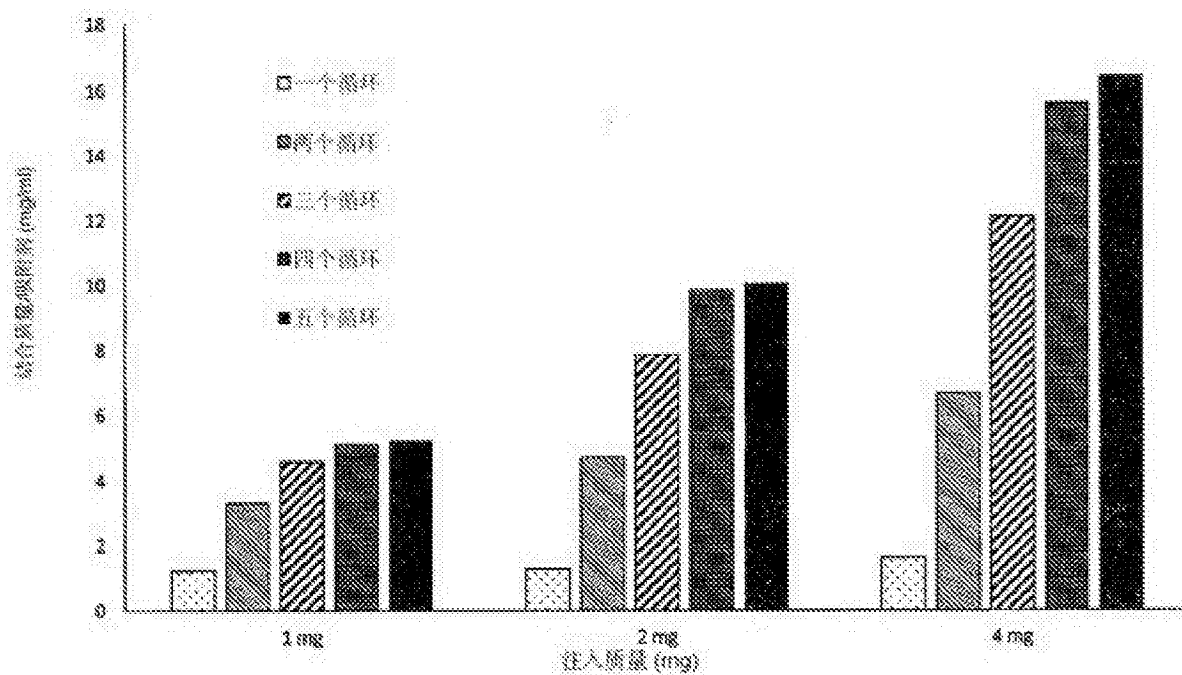


图11

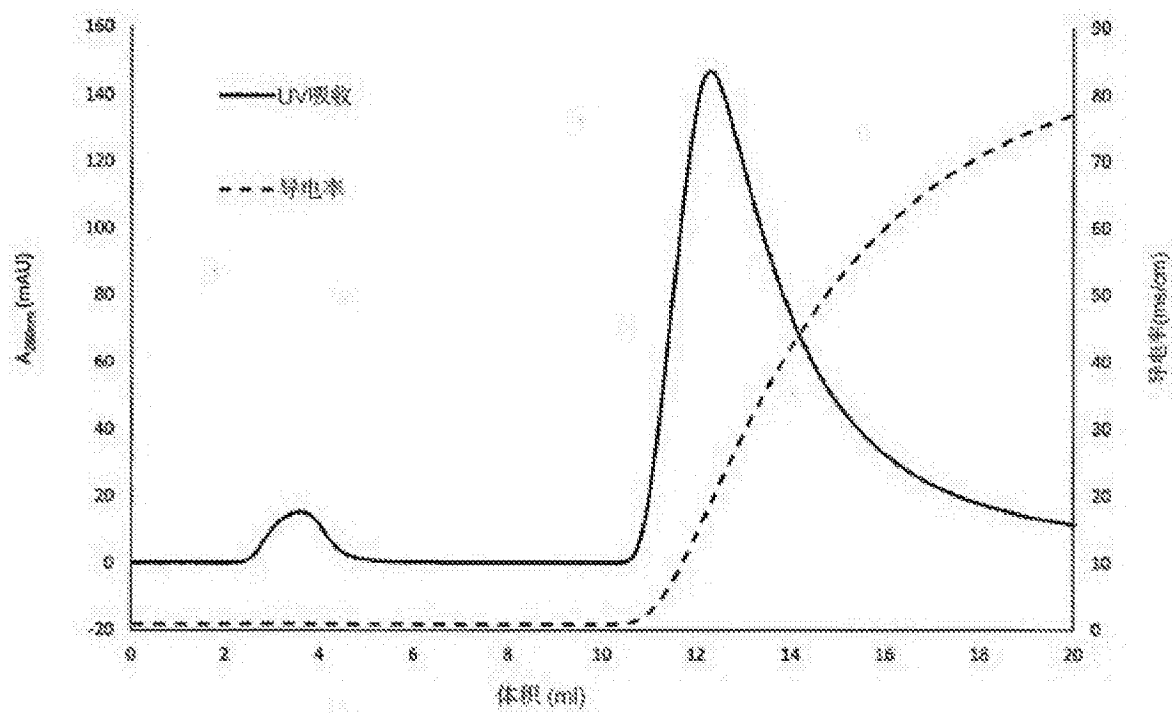


图12

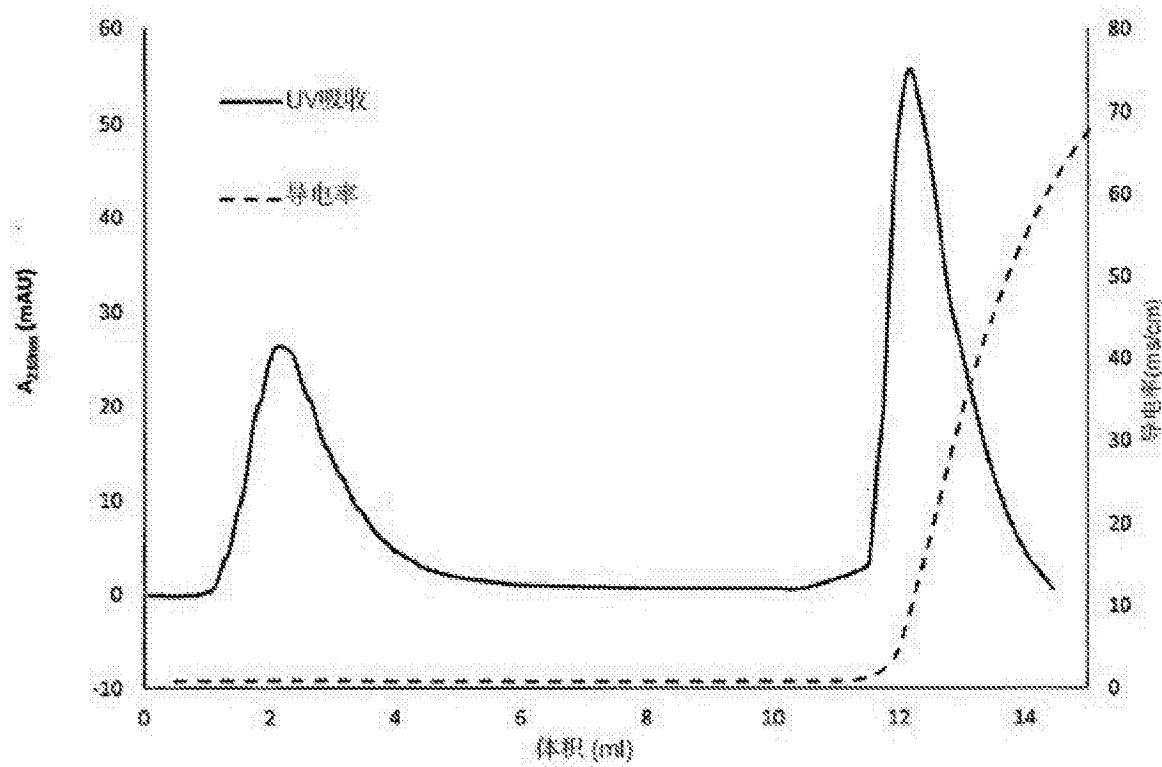


图13

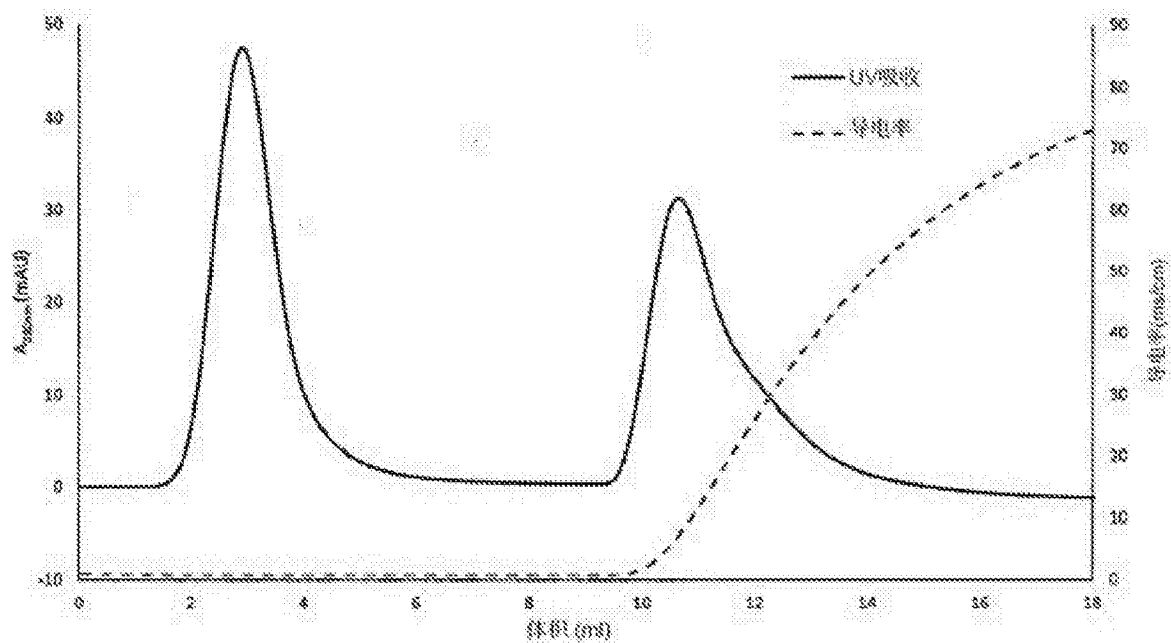


图14

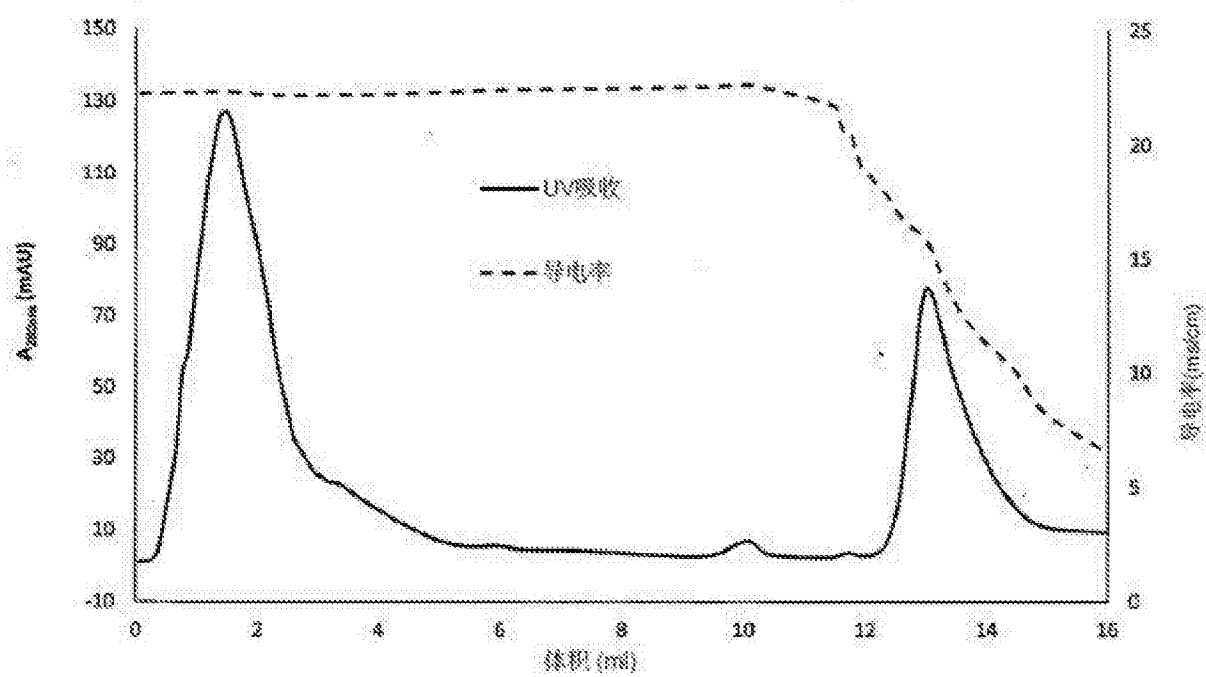


图15

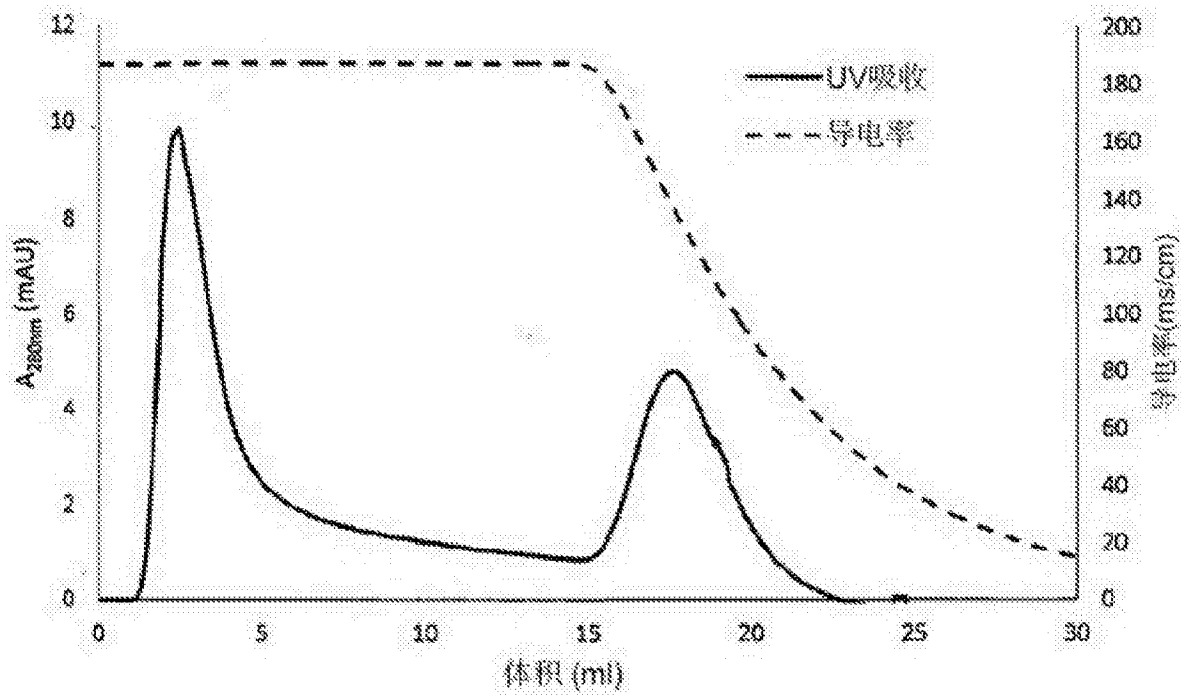


图16

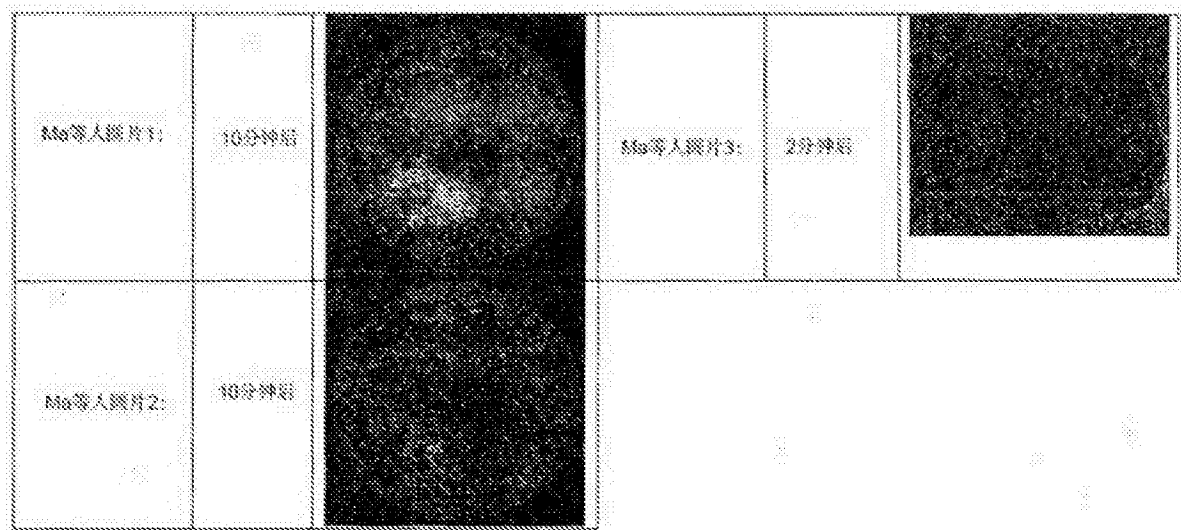


图17

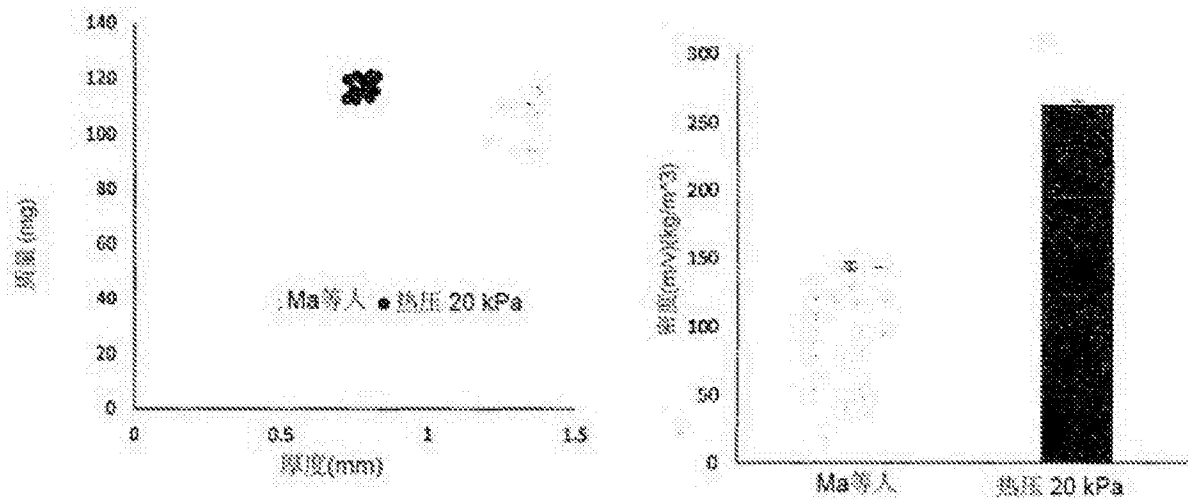


图18

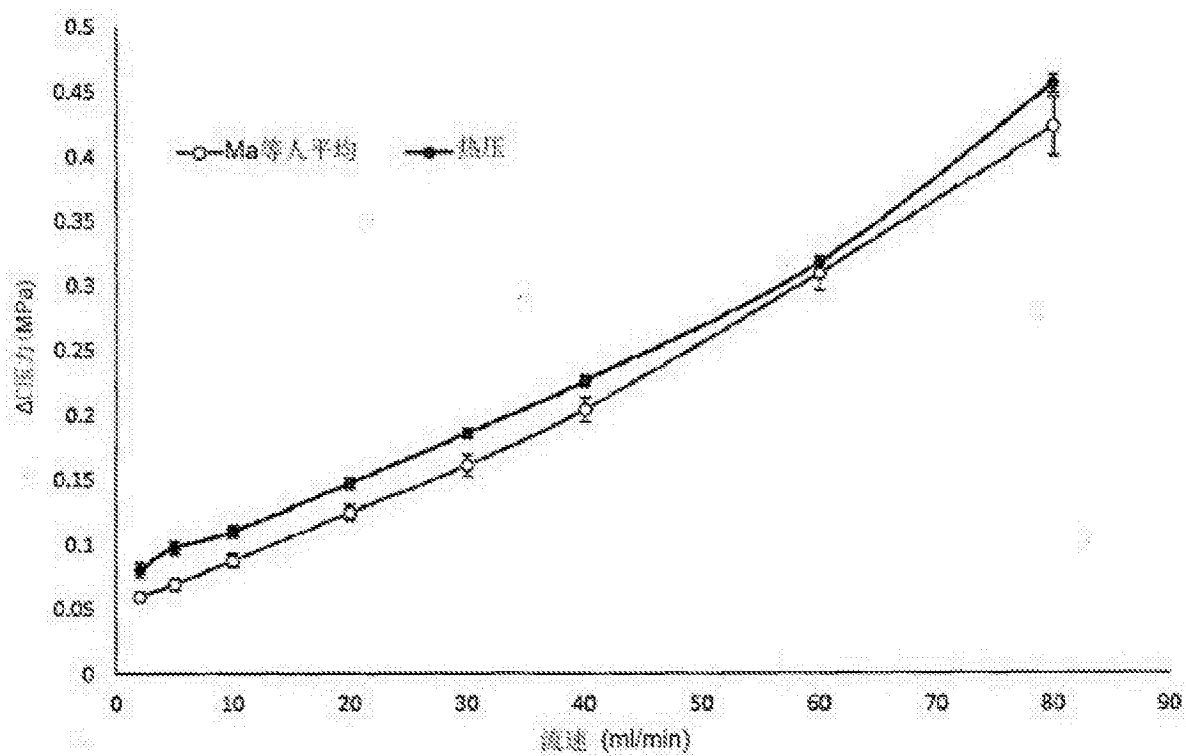


图19

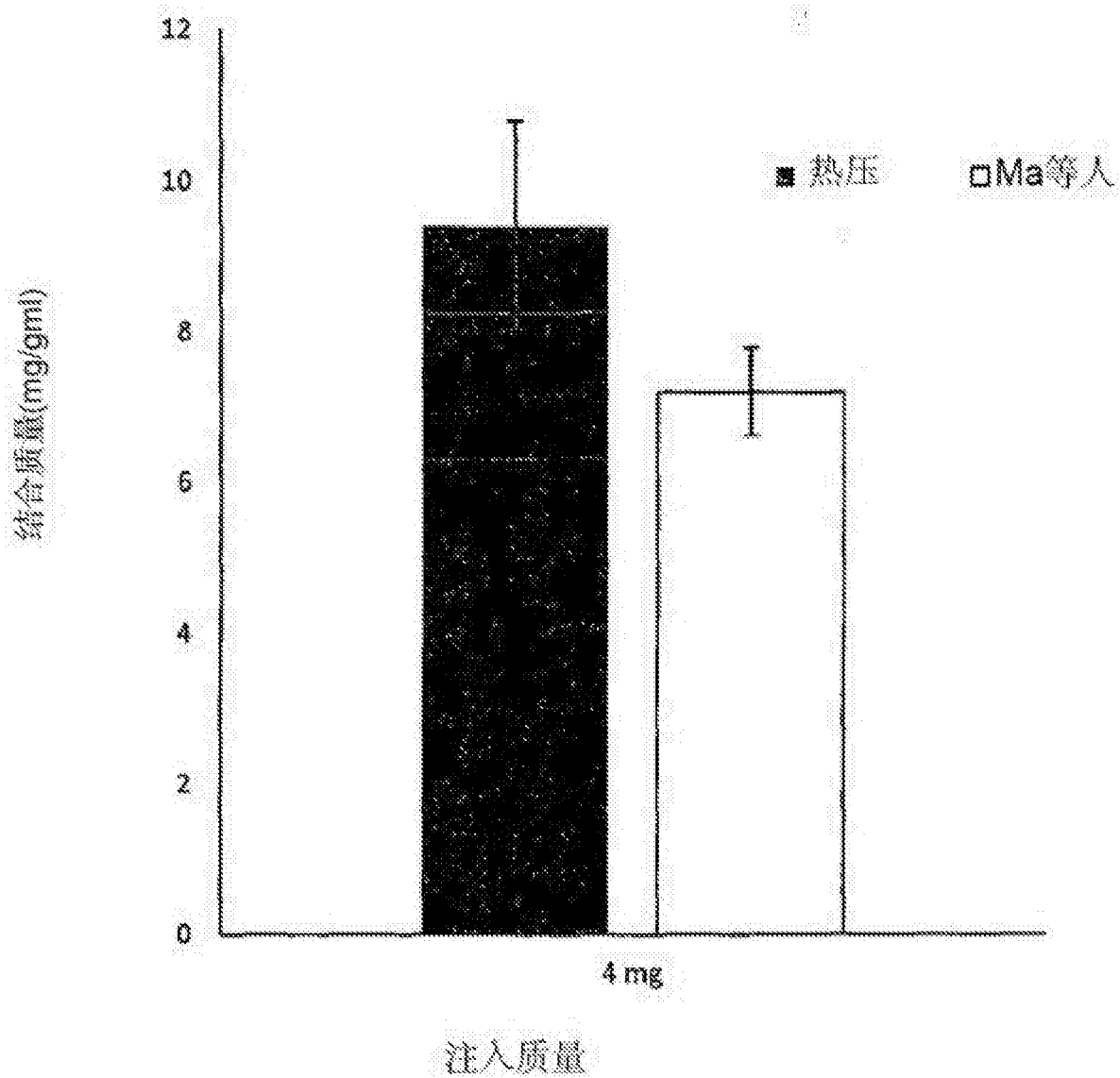


图20



图21