



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103228327 B

(45) 授权公告日 2016.01.27

(21) 申请号 201180057480.X

(22) 申请日 2011.10.27

(30) 优先权数据
10014019.3 2010.10.27 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2013.05.30

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2011/068919 2011.10.27

(87) PCT国际申请的公布数据
W02012/055986 EN 2012.05.03

(73) 专利权人 菲利普莫里斯生产公司
地址 瑞士纳沙泰尔

(72) 发明人 A·利姆 K·奥伊什 I·瓦斯特
R·卡布雷拉

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 袁泉

(51) Int. Cl.
B01D 15/18(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
C07K 1/18(2006.01)
C07K 14/42(2006.01)

(56) 对比文件
EP 1104479 B1, 2006.10.18, 全文.
WO 2004/082397 A1, 2004.09.30,
EP 1736538 A1, 2006.12.27, 全文.

CN 101374418 A, 2009.02.25, 全文.
EP 1994972 A1, 2008.11.26, 全文.
Yun Bai, etc. Capture of a recombinant protein from unclarified canola extract using streamline expanded bed anion exchange. 《Biotechnology and bioengineering》. 2003, 第 81 卷 (第 7 期), 855-864.
Marc-Andre D'Aoust. Influenza virus-like particles produced by transient expression in Nicotiana benthamiana induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. 《Plant biotechnology journal》. 2008, (第 6 期), 930-940.
Todd J. Menkhaus, etc. Compatibility of column inlet and adsorbent designs for processing of corn endosperm extract by expanded bed adsorption. 《Biotechnology and bioengineering》. 2004, 第 87 卷 (第 3 期), 524-336.
Olivier Bertrand, ect. Expanded bed chromatography for one-step purification of mannose binding lectin from tulip bulbs using mannose immobilized on DEAE streamline. 《Journal of chromatography A》. 1998, 第 822 卷 19-28.

审查员 杨轶嘉

权利要求书2页 说明书38页

(54) 发明名称
使用膨胀床色谱从植物中捕获病毒样颗粒的方法

(57) 摘要
本发明涉及用于从混合物中捕获目的病毒样颗粒的方法,包括使用吸附剂的膨胀床,合适地,其中所述方法包括步骤:(a) 提供吸附剂膨胀床;(b) 将混合物与吸附剂相接触,使得混合物中的成分结合于吸附剂;(c) 可选地,洗涤吸附剂;以及 (d) 可选地,从吸附剂中洗脱病毒样颗粒。

CN 103228327 B

1. 用于从包含破裂的植物细胞提取物的混合物中捕获目的病毒样颗粒的方法 ;其中所述方法包括步骤 :

(i) 提供在柱子中的吸附剂膨胀床 ;和

(ii) 以 1cm/min ~ 15cm/min 的流速将混合物加样到柱子上以结合病毒样颗粒,其中柱中膨胀床的膨胀度范围为 1-5,

其中所述提取物未经过预处理,这样目的颗粒可在一步结合和洗脱过程中得到分离。

2. 根据权利要求 1 的方法,其中病毒样颗粒包含流感病毒蛋白质。

3. 根据权利要求 2 的方法,其中病毒样颗粒包含血凝素 ;包含选自 H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 或 H16 的血凝素亚型,或其中两种或更多种的组合。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项的方法,其中混合物包含为用在植物中瞬时表达蛋白质的核酸分子浸润的烟草植物的破裂细胞,所述蛋白质存在于病毒样颗粒中 ;其中混合物为植物的地上部分,或来源于植物的地上部分。

5. 根据权利要求 1-3 中任一项的方法,其中珠子包含选自以下的材料,或由所述材料构成,或基本上由所述材料构成 :塑料、甲基丙烯酸酯、阴离子交换剂、二乙氨基乙基、阳离子交换剂、多糖、硅石、聚(苯乙烯)苯、聚丙烯酰胺、陶瓷及其衍生物或者其中两种或更多种的组合 ;其中珠子包含多糖,由多糖构成,或基本上由多糖构成,所述多糖选自 :纤维素、琼脂糖和葡聚糖及其衍生物或其中两种或更多种的组合。

6. 根据权利要求 5 的方法,其中珠子包含惰性内核,惰性内核材料包含选自以下物质的材料,或由这些构成,或基本上由这些构成,所述物质为 :石英,硅石, Nd-Fe-B 系合金, 不锈钢, 锆氧化物, 氧化锆, 金属硅酸盐, 金属硼硅酸盐, 陶瓷包括二硼化钛、碳化钛、二硼化锆, 碳化锆, 碳化钨, 碳化硅, 氮化铝、氮化硅, 氮化钛, 氧化钇, 硅的金属粉末, 和二硅化钼 ; 金属氧化物和硫化物, 包括镁, 铝, 钛, 钒, 铬, 锆, 钨, 锰, 铁, 钴, 镍, 铜和银的氧化物 ; 非金属氧化物 ; 金属盐, 包括硫酸钡 ; 金属元素, 包括钨, 锆, 钛, 钨, 钒, 铬, 锰, 铁, 钴, 镍, 钼, 铜, 银, 金, 钡, 铂, 钨, 钨, 铱, 铱和铱, 以及金属元素的合金, 如所述金属元素之间形成的合金, 及其衍生物, 或者其中两种或更多种的组合。

7. 根据权利要求 1-3 中任一项的方法,其中结合于目的颗粒的珠子大小为 25 μm -100 μm 。

8. 根据权利要求 7 的方法,其中结合于目的颗粒的珠子大小为 50 μm 。

9. 根据权利要求 1-3 中任一项的方法,其中吸附剂包含配体,由配体构成,或基本上由配体构成 ;其中配体包含选自以下的配体,由所述配体构成,或基本上由所述配体构成,所述配体为 :(i) 苄胺或其衍生物 ;(ii) 烷基胺或其衍生物 ;(iii) 烯基胺或其衍生物 ;(iv) 炔基胺或其衍生物 ;(v) 烷氧基胺或其衍生物 ;以及 (vi) 单环或双环芳族或杂芳族部分的胺类,或其衍生物,或者其中两种或更多种的组合 ;或者其中配体包含阴离子交换树脂,由阴离子交换树脂构成,或基本上由阴离子交换树脂构成 ;其中阴离子交换树脂包含二乙氨基乙基纤维素基的离子交换树脂,由二乙氨基乙基纤维素基的离子交换树脂构成,或基本上由二乙氨基乙基纤维素基的离子交换树脂构成,或者包含二乙氨基乙基纤维素葡聚糖基的离子交换树脂,由二乙氨基乙基纤维素葡聚糖基的离子交换树脂构成,或基本上由二乙氨基乙基纤维素葡聚糖基的离子交换树脂构成。

10. 根据权利要求 1-3 中任一项的方法, 其中混合物在接触吸附剂之前的电导率为 1mS/cm - 10mS/cm ; 和 / 或混合物在接触吸附剂之前的 pH 为 $\text{pH } 6.0$ - $\text{pH } 8.0$ 。

11. 根据权利要求 1-3 中任一项的方法, 其中所述混物流穿膨胀床的线性流速范围为 2cm/min - 8cm/min 。

12. 根据权利要求 1-3 中任一项的方法, 其包括步骤:

(i) 提供吸附剂膨胀床, 其在柱子中包含二乙氨基乙基纤维素葡聚糖, 其中吸附剂密度为 2.5g/ml - 3.5g/ml , 并且其中平均吸附剂平均颗粒大小为 $50\ \mu\text{m}$;

(ii) 在 $\text{pH } 6.0$ - 8.0 范围内的 pH 下平衡树脂材料;

(iii) 提供包含烟草植物材料的混合物, 其中所述混合物电导率为 4mS/cm - 6mS/cm ;

(iv) 以 2.5cm/min 的流速将混合物加样到柱子上以结合病毒样颗粒, 并且其中柱中膨胀床的膨胀度为 2;

(v) 使用具有的 pH 在 $\text{pH } 6.0$ - 8.0 范围内的缓冲液洗涤加样的柱子; 以及

(vi) 从柱子上将结合的目的颗粒洗脱于一个或多个级分中。

13. 权利要求 12 的方法, 其中步骤 (iii) 包括 (a) 提供瞬时表达存在于病毒样颗粒中的蛋白质的完整烟草植物; (b) 破坏烟草植物的叶子和茎的细胞以生产烟草植物材料; 以及 (c) 用缓冲液或去离子水进行稀释而调节混合物的 pH 和电导率。

14. 吸附剂膨胀床, 其包含可逆地与其结合的病毒样颗粒, 其获得自权利要求 1-13 中任一项的方法。

15. 吸附剂膨胀床用于从包含破裂的植物细胞提取物的混合物中捕获目的病毒样颗粒的用途, 其中混合物来源于瞬时表达特定蛋白质的植物, 所述蛋白质存在于病毒样颗粒中; 以 1cm/min ~ 15cm/min 的流速将混合物加样到柱子上以结合病毒样颗粒, 其中柱中膨胀床的膨胀度范围为 1-5; 其中所述提取物未经过预处理, 这样目的颗粒可在一步结合和洗脱过程中得到分离。

使用膨胀床色谱从植物中捕获病毒样颗粒的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及从混合物中对目的颗粒——如病毒样颗粒（例如，重组表达的自装配 VLP）的捕获。本发明能够对目的颗粒进行有效捕获，并可扩大规模到商业规模用途的大体积。

[0002] 前言

[0003] 基因工程革命已扩展到开发可进行多种应用的重组蛋白质，包括人类及动物治疗剂。美国 FDA 批准了大约超过 100 种生物技术来源的治疗剂及疫苗用于医疗用途，此外，有超过 1000 种其他药物和疫苗正进行不同阶段的临床试验。目前，细菌、酵母、昆虫、植物和哺乳动物细胞表达系统用于生产重组蛋白质有不同的成功程度。尽管技术上的此项发展掀起了一场药物和治疗产品的生产和传递上的革命，但在对可获得的分子的纯化方面还存在问题。例如，纯化来自细菌的蛋白质要求裂解细胞，这可能需要数个步骤以及溶液澄清。这样，纯化过程中使用的色谱树脂会容易结块，于是细胞提取物可能需要通过其他过程进行进一步澄清——如通过离心或过滤。还可能需多阶段的纯化过程，这会花费时间且还会导致样品的丢失及降低产出。目的蛋白质的纯化过程可能很昂贵，而且面临技术挑战。下游的加工可占据整个成本的高达 80%。

[0004] 在蛋白质的纯化中广泛采用填充床吸附色谱。使用填充床需要移除整个细胞或胶质碎片。碎片的移除在实验室规模过程的开发中常常受到忽视，但其却是达到高效率的最挑战的操作之一。膨胀床吸附是近期发展的方法，可用于纯化可溶性蛋白质，对加工流的澄清过程要求不高。其使液体流穿起始的填充床结构以接触高的流体空隙。

[0005] 病毒样颗粒（VLP）是用于生产重组蛋白质，尤其是免疫原性重组蛋白质如免疫原性病毒重组蛋白质的一个手段。许多病毒具有的衣壳可由单独表达的结构蛋白质组装而成，组装过程可以在体内在形成 VLP 的过程中表达结构蛋白质和重组蛋白质的细胞内进行，也可在分离和纯化后在细胞外部进行。然而，在含有高含量悬浮固体和不同大小的颗粒的混合物中要捕获这些 VLP 在技术上非常具有挑战性，这通常是在涉及植物来源材料的情况下。当将 VLP 注射入动物以诱导产生阻断感染的抗病毒抗体时，VLP 可能是免疫原性的。因此，例如以用来自 H5N1 禽流感菌株的蛋白质产生的病毒样颗粒免疫的小鼠可在以致死性 H5N1 病毒攻击时得到保护。

[0006] 在工业上仍然需要一种方法用于以效率提高和产率捕获目的颗粒。还需要一种可规模化用于商业水平的方法用于以成本有效的形式捕获颗粒。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明至少部分地基于此项发现：膨胀床吸附（EBA）色谱对从混合物中捕获目的颗粒尤其有效。特定实施方式中，此方法可有利地用于在一步结合及洗脱过程中捕获目的颗粒，这可规模化到商业水平。

[0009] 在一个一般方面，提供了用于从混合物中捕获目的颗粒的方法，其包括使用吸附剂膨胀床。

[0010] 在一个实施方式中，所述方法包括步骤：(a) 提供吸附剂的膨胀床；(b) 将混合物

与吸附剂相接触,使混合物的成分与吸附剂的膨胀床接触并相互作用;(c) 可选地,洗涤吸附剂;以及(d) 可选地,从吸附剂中洗脱目的颗粒。

[0011] 在一个实施方式或上述实施方式的组合中,目的颗粒是目的生物学颗粒。

[0012] 在一个实施方式或上述实施方式的组合中,目的颗粒包含至少一种蛋白质。

[0013] 在一个实施方式或上述实施方式的组合中,目的颗粒包含至少两种蛋白质,其中至少一种是目的蛋白质。

[0014] 在一个实施方式或上述实施方式的组合中,目的颗粒是病毒样颗粒。

[0015] 在本发明的第一个方面,提供了用于从混合物中捕获病毒样颗粒的方法,其包括使用吸附剂膨胀床,合适地,其中所述方法包括步骤:(a) 提供吸附剂的膨胀床;(b) 将混合物与吸附剂相接触,使混合物中的病毒样颗粒与吸附剂结合;(c) 可选地,洗涤吸附剂;以及(d) 可选地,从吸附剂中洗脱目的颗粒。

[0016] 在所述第一方面的一个实施方式中,本发明进一步涉及根据前述实施方式或上述实施方式的组合的方法,其中所述病毒样颗粒包含流感病毒的蛋白质,特别是血凝素;合适地,其为选自 H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 或 H16 的血凝素亚型或其中两种或更多种的组合。

[0017] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述更实施方式的组合中,吸附剂包含在柱子当中。

[0018] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,混合物为植物,或来源于植物。

[0019] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,所述植物是天然发生的植物、突变体植物、非天然发生的植物或转基因植物。

[0020] 在一个实施方式或上述实施方式的组合中,混合物为植物叶子,或来源于植物叶子。

[0021] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,在与吸附剂接触之前通过对植物材料均质化而产生所述混合物。因此,根据所述实施方式,混合物为均质化的植物材料。

[0022] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,所述植物为植物细胞——如生长于培养物中或在植物之外生长的植物细胞,如体外生长的植物细胞或细胞团块——如胡萝卜细胞。

[0023] 在本发明第一个方面的一个实施方式中,本发明提供了根据前述任何实施方式或前述实施方式组合的方法,其中混合物包含破裂的植物细胞;合适地,其中植物为浸润了在植物中瞬时表达特定蛋白质的核酸分子的烟草植物,所述蛋白质存在于病毒样颗粒中;更合适地,其中混合物为植物的地上部分,或来源于植物的地上部分。

[0024] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,吸附剂包含多个的珠子。

[0025] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,珠子为包含惰性内核材料的复合珠子。

[0026] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,珠子包含选自塑料、甲基丙烯酸酯、阴离子交换剂、二乙氨基乙基、阳离子交换剂、多糖、硅石、聚

(苯乙烯-二乙烯)苯、聚丙烯酰胺、陶瓷及其衍生物的材料或其中两种或更多种的组合,或由其构成,或基本上由其构成。

[0027] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,珠子包含多糖;合适地为纤维素、琼脂糖、右旋糖或其衍生物,或前述的两种或更多种的组合,或由其构成,或基本上由其构成。

[0028] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,惰性内核材料包含选自以下的材料,或由所述材料构成,或基本上由所述材料构成:石英,硅石,Nd-Fe-B合金,不锈钢,锆氧化物,氧化锆,金属硅酸盐,金属硼硅酸盐,陶瓷包括二硼化钛,碳化钛,二硼化锆,碳化锆,碳化钨,碳化硅,氮化铝,氮化硅,氮化钛,氧化钇,硅的金属粉末,以及二硅化钼;金属氧化物和硫化物,包括镁,铝,钛,钒,铬,锆,钨,锰,铁,钴,镍,铜和银的氧化物;非金属氧化物;金属盐,包括硫酸钡;金属元素,包括钨,锆,钛,钨,钒,铬,锰,铁,钴,镍,钼,铜,银,金,钨,铂,钨,钨,铱,铱和铱,以及金属元素的合金,如所述金属元素之间形成的合金及其衍生物的材料,或其中两种或更多种的组合。

[0029] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,珠子的大小为大约 $5\ \mu\text{m}$ - $500\ \mu\text{m}$ 或更大。

[0030] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,结合目的颗粒的珠子大小为大约 $25\ \mu\text{m}$ - $100\ \mu\text{m}$,合适地,为大约 $50\ \mu\text{m}$ 。

[0031] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,结合目的颗粒之外的材料例如植物材料的珠子大小为大约 $125\ \mu\text{m}$ - $250\ \mu\text{m}$,合适地,为大约 $150\ \mu\text{m}$ 。

[0032] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,所述方法包括预捕获阶段(其包括使用另外的吸附剂的膨胀床)。合适地,该第一吸附剂膨胀床包含的珠子大小范围为大约 $125\ \mu\text{m}$ - $250\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $150\ \mu\text{m}$ 。

[0033] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,吸附剂包含配体。

[0034] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,配体包含选自以下的配体,或由所述配体构成,或基本上由所述配体构成:(i) 苄胺或其衍生物;(ii) 烷基胺或其衍生物;(iii) 烯基胺或其衍生物;(iv) 炔基胺或其衍生物,(v) 烷氧基胺或其衍生物;以及(vi) 单环或双环芳族或杂芳族成分的胺类,或其衍生物,或者其中两种或更多种的组合。

[0035] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,配体包含阴离子交换树脂,由阴离子交换树脂构成,或基本上由其构成。

[0036] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,阴离子交换树脂包含二乙氨基乙基纤维素基的离子交换树脂,合适地为二乙氨基乙基纤维素葡聚糖基的离子交换树脂,或由所述树脂构成,或基本上由其构成,或为所述树脂。

[0037] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,混合物在与吸附剂接触前的电导率为大约 1mS/cm - 10mS/cm ,合适地,为 2mS/cm - 3mS/cm 。

[0038] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,混合物在与吸附剂接触前的 pH 为大约 pH6.0-pH8.0。

[0039] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,将混合物以大约 1cm/min-15cm/min 的范围内的线性流速加样到柱上以结合目的颗粒。

[0040] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,吸附剂的密度范围为大约 1g/ml-20g/ml。

[0041] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,膨胀床的膨胀度程度的范围为大约 1-5。

[0042] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,所述方法在使混合物接触吸附剂前包括预捕获步骤。

[0043] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,预捕获步骤选自过滤、微滤、离心、倾析和沉积,或其中两种或更多种的组合。

[0044] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,预捕获步骤包括 (i) 将材料与离子交换树脂接触;或(ii) 对材料进行酸沉淀及过滤。

[0045] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,以静态结合或批式孵育的形式将这些材料与离子交换树脂接触。

[0046] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,会对步骤(d)中获得的洗脱液或其一个或多个积分进行进一步的处理步骤。

[0047] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,所述其他处理步骤选自纯化、过滤、微滤、离心、倾析和沉积,或其中两种或更多种的组合。

[0048] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,目的颗粒包含目的蛋白质。

[0049] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,目的蛋白质为抗原。

[0050] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,目的蛋白质为血凝素。

[0051] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,所述血凝素为选自 H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 或 H16 的血凝素亚型,或其中两种或更多种亚型的组合。

[0052] 在包括所述第一方面的实施方式的一个实施方式或上述实施方式的组合中,膨胀床在洗脱步骤中的膨胀率为大约 0.5-5。

[0053] 在第二方面,提供了用于从混合物中捕获目的颗粒的方法,其包括步骤:(i) 提供吸附剂的膨胀床,其在柱内包含配体,静止床高大于 10cm,其中吸附剂的密度为大约 1g/ml-20g/ml,其中膨胀床的膨胀度为大约 1-5,且其中平均吸附剂颗粒大小为大约 5 μm - 大约 500 μm ;(ii) 在大约 pH6.0-8.0 范围内的 pH 下平衡树脂材料;(iii) 提供包含目的颗粒的混合物,其中所述混合物具有的电导率为大约 1mS/cm-10mS/cm;(iv) 以大约 1cm/min-15cm/min 范围内的流速(例如线性流速)将混合物加样到柱上以结合目的颗粒;(v) 使用 pH 为大约 pH6.0-8.0 范围内的缓冲液洗涤加样后的柱子;以及(vi) 从柱子上将结合的目的颗粒洗脱于一个或多个部分。

[0054] 在所述第二方面的一个实施方式中,目的颗粒是病毒样颗粒(VLP)或膜影样颗粒。

[0055] 在所述第二方面的一个实施方式或上述实施方式的组合中,混合物为植物,或来源于植物。

[0056] 在所述第二方面的一个实施方式或上述实施方式的组合中,所述植物为天然发生的植物、突变体植物、非天然发生的植物或转基因植物。

[0057] 在所述第二方面的一个实施方式或上述实施方式的组合中,混合物为植物的叶子,或来源于植物叶子。

[0058] 在所述第二方面的一个实施方式或上述实施方式的组合中,目的颗粒包含目的蛋白质。

[0059] 在所述第二方面的一个实施方式或上述实施方式的组合中,目的蛋白质为抗原。

[0060] 在所述第二方面的一个实施方式或上述实施方式的组合中,目的蛋白质为血凝素。

[0061] 在所述第二方面的一个实施方式或上述实施方式的组合中,所述血凝素为选自 H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 或 H16 的血凝素亚型,或其中两种或更多种亚型的组合。

[0062] 在所述第二方面的一个实施方式或上述实施方式的组合中,结合目的颗粒的珠子大小为大约 $25\ \mu\text{m}$ – $100\ \mu\text{m}$;合适地,为大约 $50\ \mu\text{m}$ 。

[0063] 在所述第二方面的一个实施方式或上述实施方式的组合中,结合目的颗粒之外的材料例如植物材料的珠子大小为大约 $125\ \mu\text{m}$ – $250\ \mu\text{m}$;合适地,为大约 $150\ \mu\text{m}$ 。

[0064] 在所述第二方面的一个实施方式或在所述第二方面的上述实施方式的组合中,提供了从混合物中捕获病毒样颗粒的方法,其包括以下步骤:

[0065] (i) 提供吸附剂的膨胀床,其在柱子中包含二氨基乙基纤维素葡聚糖,其中吸附剂的密度为 2.5g/ml – 3.5g/ml ,且其中吸附剂颗粒的平均大小为大约 50;

[0066] (ii) 在大约 pH6.0–8.0 范围内的 pH 下平衡树脂材料;

[0067] (iii) 提供包含烟草植物材料的混合物,其中所述混合物具有的电导率为大约 2mS/cm – 3mS/cm ;

[0068] (iv) 以大约 2.5cm/min 的流速将混合物加样到柱上以结合病毒样颗粒,其中膨胀床的柱子膨胀度为大约 2;

[0069] (v) 使用 pH 为大约 pH6.0–8.0 范围内的缓冲液洗涤加样后的柱子;以及

[0070] (vi) 从柱子上将结合的目的颗粒洗脱于一个或多个级分。

[0071] 在一个实施方式中,所述第二方面的前述实施方式或上述实施方式的组合的方法包括步骤 (iii),其包括(a) 提供瞬时表达蛋白质的完整的烟草植物,所述蛋白质存在于病毒样颗粒中;(b) 破坏烟草植物的叶子和茎以生产烟草植物材料;以及(c) 用缓冲液或去离子水进行稀释,以调整混合物的 pH 和电导率。

[0072] 在一个实施方式中,所述第二方面的前述实施方式或上述实施方式的组合的方法在步骤 (iv) 之前包括的步骤包括过滤步骤 (iii) 的混合物以及使经过过滤的步骤 (iii) 的混合物与含有聚乙烯亚胺的吸附剂的第一膨胀床相接触以从混合物中移除不期望的物质,其中珠子的大小为大约 $150\ \mu\text{m}$ 。

[0073] 在第三个进一步的方面,提供了吸附剂的膨胀床,其中吸附剂包含与其可逆结合的目的颗粒。

[0074] 在所述第三方面的一个实施方式中,所述吸附剂包含多个珠子。

[0075] 在所述第三方面的一个实施方式或上述实施方式的组合中,结合目的颗粒的珠子大小为大约 $25\ \mu\text{m}$ - $100\ \mu\text{m}$;合适地,为大约 $50\ \mu\text{m}$ 。

[0076] 在第四个进一步的方面,提供了吸附剂膨的胀床用于从混合物中捕获目的颗粒,特别是捕获目的病毒样颗粒,所述混合物特别是来源于瞬时表达特定蛋白质的植物的混合物,所述蛋白质存在于病毒样颗粒之中。

[0077] 在所述第四方面的一个实施方式中,颗粒为病毒样颗粒 (VLP) 或膜影样颗粒。

[0078] 第五方面涉及包含目的颗粒的吸附剂的膨胀床;合适地,所述颗粒为可逆地与其结合的目的病毒样颗粒,特别是其中吸附剂为膨胀床色谱形式。

[0079] 第六方面涉及使用膨胀床色谱用于从混合物中捕获目的颗粒;合适地,所述颗粒为病毒样颗粒。

[0080] 上文描述的关于本发明的一般方面及第一方面的(多种)实施方式及实施方式的组合至少还可形成本发明的第二、第三、第四、第五和第六方面。

[0081] 定义

[0082] 在本申请范围内使用的技术术语和表达一般被给予了植物和分子生物学相关技术中通常对其应用的意义。以下术语定义适用于本申请的全部内容。词语“包含”不排除其他元素或步骤,不定冠词“一”或“一个”不排除复数形式。单个步骤可以满足权利要求中提出的数种特征的功能。术语“基本上”、“大约”、“近似”,诸如此类,在关系到属性或值时具体而言分别精确限定了属性或精确限定了值。术语“大约”在给定数量值或数量范围的情况下指代所述给定值或范围的 20% 之内、10% 之内或 5% 之内的值或范围。术语“百万分率”或“ppm”在本文交换使用用于指代对所纯化的目的分子或目的蛋白质的纯度的度量。单位 ppm 指代每毫克/毫升的目的蛋白质中宿主蛋白质的 ng/毫升的量,其中当蛋白质在溶液中时,宿主蛋白质 ppm=(宿主蛋白质 ng/ml)/(目的蛋白质 mg/ml)。当蛋白质为干燥形式时,如是冻干形式,ppm 指代(宿主蛋白质 ng)/(目的蛋白质 mg)。

[0083] 术语“膨胀床”涉及这样的实施方式,其中色谱过程是以大小范围、密度范围或这两个范围进行分类的(分层的)的吸附剂的床进行操作的,其由直接导向的液体流进行稳定的流化;合适地,为向上的液体流,这样吸附剂的轴向混合达到最小,并允许液体中的液体和固体组分都能与吸附剂相接触,同时迁移穿过床。合适地,液体以近似塞状流的条件迁移穿过床。

[0084] “吸附剂”指代任何能够通过分子间作用力将目的颗粒吸附至其表面的物质。通常目的颗粒对吸附剂的结合是可逆的,这样可在需要的时间将其从吸附剂上洗脱。

[0085] 如本文所使用的,术语“目的颗粒”指代需要从混合物中捕获的分子实体。在特定实施方式中,目的颗粒包含一种或多种或两种蛋白质。在其他实施方式中,目的颗粒包含一种或多种或者两种或更多种蛋白质(例如多个蛋白质),其中至少一种为目的蛋白质。在一个实施方式中,要捕获的颗粒是包含多个生物来源的大分子的颗粒,并因此是目的生物学颗粒。在另一个实施方式中,要捕获的颗粒为病毒样颗粒。在另一个实施方式中,要捕获的颗粒为细菌膜影颗粒。如本文所使用的“所捕获的目的颗粒”指代目的颗粒的制备物,其中制备物重量的至少大约 10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 为所需的目的颗粒。在一些实施方式中,本发明的方法捕获了

混合物中起始存在的目的颗粒总量的至少 50%，包括目的颗粒的至少 60%、70%、80% 或 90%。可能达到甚至更高的捕获率——如至少 92.5%、95%、96%、97%、98% 或至少 99%。术语“纯化的目的颗粒”指代目的颗粒的制备物，其中制备物重量的至少大约 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 是所需要的目的颗粒，剩下的重量被污染性杂质或污染物所占据，特别是可以与纯化的目的颗粒一同纯化其他蛋白质、核酸、脂质或碳水化合物或其组合——如来源于宿主细胞的那些。在一个实施方式中，所捕获或纯化的目的颗粒基本上不含污染性大分子（溶剂除外）。本文描述的颗粒可通过本领域已知的多种方法进行鉴定——如电微分迁移率分析（ES-DMA），非对称流场流分级法用多角度光散射检测（AF4-MALS）和透射电子显微镜（TEM）。在一个实施方式中，目的颗粒的直径测量值低于大约 1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.04 或 0.03 μm ——如直径为 1.0-0.03、0.8-0.03、0.6-0.03、0.4-0.03、0.2-0.03、0.1-0.03、0.08-0.03、0.06-0.03、0.05-0.03 或 0.04-0.03 μm 。

[0086] 如本文所使用的，术语“病毒样颗粒”（VLP）、“多种病毒样颗粒”（VLP）或目的 VLP 指代通过自装配形成的分子实体，其包含多个蛋白质，其中包括至少一种目的蛋白质，且其在至少一个属性上与病毒是类似的。值得注意的是，不像病毒颗粒或病毒粒子，VLP 缺少病毒的基因组核酸。VLP 可具有多样化的多类型的大小分布，其中大小的分布可受到生产过程变化的影响。例如，植物中产生的 VLP 的大小分布可能与不同宿主中产生的 VLP 的大小分布有不同。在一些实施方式中，VLP（例如从植物材料中捕获的 VLP）的平均直径可为 35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm 或 75nm。在一些实施方式中，使用本发明的方法（例如从植物材料中）捕获的 VLP 的直径范围为 35nm-75nm；合适地，为 35nm-70nm；更合适地，为 35nm-65nm；甚至更合适地，为 35nm-60nm；特别合适地，为 35nm-55nm；甚至更特别合适地，为 35nm-50nm；进一步更合适地，为 35nm-45nm；最合适地，为 35nm-40nm。

[0087] 如本文所使用的，“混合物”包含目的颗粒连同一种或多种不想要的材料，如杂质或污染物。术语“杂质”和“污染物”交换使用，意指目的蛋白质之外的任何材料，不论其是否来自宿主生物体，只要是需要将其从包含目的颗粒的组合物中移除的。所述混合物可直接从生产目的颗粒的宿主生物体或宿主细胞中获得。不意欲产生限制，可根据本发明的方法处理的混合物的实例包括进料、破裂的宿主细胞材料、宿主组织均质物、宿主组织裂解物、宿主组织提取物、发酵液以及宿主细胞培养物上清。杂质可包括但不限于任何生物学大分子如目的蛋白质之外的蛋白质，目的颗粒之外的颗粒、核算（例如 DNA 和 RNA）、脂质、多糖（例如，淀粉、纤维素）、木素，酚醛树脂、碳水化合物和色素。

[0088] “经调整的混合物”是为本发明的方法所使用的色谱步骤制备的混合物，是通过对混合物与进行缓冲液交换、稀释、盐类添加、pH 滴定中的一种或多种过程，或前述过程的组合以分别设定 pH、电导率范围、缓冲液条件或其组合而制备的，以达到所需的色谱效果。“经调整的混合物”可为进料，并可用于标准化色谱柱的加样条件。

[0089] 术语“目的蛋白质”在本文与术语“靶标蛋白质”交换使用，其指代存在于目的颗粒中并可作为未装配蛋白质、多聚形式的蛋白质或部分装配颗粒与目的颗粒一同捕获的一种或多种重组生产的蛋白质。

[0090] 术语“宿主蛋白质”指代来源于生产包含靶标蛋白质的（多种）目的颗粒宿主细胞的任何蛋白质，并包括从宿主基因组表达的任何蛋白质或重组表达的蛋白质，其不是目的

颗粒的成分。在包含至少目的颗粒或目的蛋白质的混合物中存在的宿主蛋白质的量提供了对纯化度的量度。通常,蛋白质混合物中宿主蛋白质的量以混合物中目的颗粒量或目的蛋白质的量的百万分率表示。

[0091] 术语“捕获”及其语法变化体在本文交换使用,意指从混合物中对目的颗粒的保留或收集,产生比混合物中浓度更高的目的颗粒的浓度。从混合物中对目的颗粒的捕获可能是不完全的。所捕获的目的颗粒可为混合物中总目的颗粒的一部分,例如但不限于,为其中的大约 2%、5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80% 或 90% 或更多。

[0092] 使用术语“纯化”和“分离”及其语法变化体,意指完全或部分地从混合物中分开或移除至少一种杂质,由此提高组合物中目的颗粒纯度水平。可对目的蛋白质进行纯化以得到这样的组合物,其含有低于 100ppm 宿主蛋白质,合适地含有低于 90ppm、低于 80ppm、低于 70ppm、低于 60ppm、低于 50ppm、低于 40ppm、低于 30ppm、低于 20ppm、低于 10ppm 或低于 5ppm 宿主蛋白质,通常由 ELISA 确定。

[0093] “配体”可用于捕获特异性与其结合的一种或多种目的颗粒或目的蛋白质。合适地,生物学特异性配体共价连接于吸附剂或形成色谱系统的固定相的固态支持物并接近流动相中存在的目的颗粒或目的蛋白质。目的颗粒或目的蛋白质在色谱步骤中都保持对所述配体的特异性结合亲和力,而混合物中的其他溶质和蛋白质最好不会特异性结合于配体。目的颗粒或目的蛋白质对固定相中配体的结合使得流动相中的污染物或杂质能通过膨胀床,而目的颗粒或目的蛋白质保持与配体特异性结合。特异性结合的目的颗粒或蛋白质可从配体上洗脱。例如,这可使用低 pH、高 pH、低盐、竞争配体等等,或甚至使用其中一种或多种的组合而达到,使用洗脱缓冲液通过膨胀床。

[0094] 术语“特异性结合”及“结合特异性”描述了目的颗粒或目的蛋白质与配体之间的普遍特异性及可逆的相互作用。配体可具有可化学修饰的基团,使其能够连接于吸附剂或固态支持物而不破坏其结合活性。配体在自由溶液中对目的颗粒或蛋白质的亲和力范围通常为 $10E+4$ – $10E+8M$ 。

[0095] 术语“植物”指代处于其生命周期或发育过程的任何阶段的任何植物及其子代。所述植物可以为天然发生的、突变的、非天然发生的或转基因植物。可以用编码蛋白质的核酸分子对植物进行浸润,并在浸润的植物中表达所述蛋白质。这种浸润的植物并不是转基因植物,因为不需要将核酸分子插入植物基因组并传递到子代。术语“植物细胞”指代植物的结构和生理学单位。植物细胞可为无细胞壁的原生质体、分离的单细胞、培养的细胞、两个或多个细胞的团块的形式,或为更高组织单位的一部分,所述更高组织单位为例如但不限于,植物组织、植物器官或完整的植物。术语“植物材料”指代获自或可获自植物的任何固体或液体组合物或其组合,包夜叶子、茎、根、花或花的部分、果实、花粉、卵细胞、合子、种子、扦插物、分泌物、提取物、细胞或组织培养物或植物的任何其他部分或产物。在一个实施方式中,植物材料为叶子或来源于叶子——如绿色叶子。

[0096] 如果在本文中提供范围,在该范围低侧和高侧的最大数值表示包括在该范围内。例如,如果提供了大约 $125\ \mu\text{m}$ – $250\ \mu\text{m}$ 的范围,则该范围表示分别包括最大数值 $125\ \mu\text{m}$ 和 $250\ \mu\text{m}$ 。

[0097] 发明详述

[0098] 本发明提供了用于通过膨胀床吸附从混合物中捕获目的颗粒的方法。目的颗粒包

含一种或多种目的蛋白质,其中一种或多种可由宿主细胞重组生产。

[0099] 膨胀床吸附(EBA)是一种组合固体-液体分离和产物纯化的单元操作。该过程是以不同大小、密度或二者都不同的吸附剂的床进行操作的,以向上的液体流使床膨胀。在多种实施方式中,柱子被设计成能避免湍流和过度的液体混合,尤其是沿着柱子轴向的返混,而单个的珠子保持在非固定的动态状态,仅仅在柱子内的局部区域做狭窄的运动。膨胀床在柱子底部部分中可具有小的混合区域,其中进入的液体分布于柱子的整个横截面上;合适地,膨胀床通常在塞状流条件下进行操作。该过程使得进料中的液体和固体组分都能与吸附剂接触并相互作用,这样使得柱子中能进行多阶段的色谱分离过程。床的膨胀使得进料中的固体颗粒差异性地流穿床,由此提供了澄清的功能。

[0100] 在传统的填充床色谱方法中,树脂被限制在柱子底部和流量调适器之间,当紧密堆积的树脂周围颗粒状物质和细胞碎片不能流动时会发生结块。相反,EBA中的液体流是从下进入的,调适器是维持在远离堆积树脂的层面的,这样给吸附剂一定空间膨胀,并由此在其之间创造出空间。床的膨胀度受到混合物流速、混合物粘度以及吸附剂密度的影响。在将吸附剂堆积在柱子中时,其紧密地挨在一起,没有留给大的聚集物和团块太多活动空间。因为缓冲液是从下面注射的,当吸附剂的沉积速率与向上的液体流动速率相等时,吸附剂就会流体化,并形成稳定的浓度梯度。有多种可用规格的林BA,其中有些在柱子的基底包含过滤装置,而有些则不含。在一个实施方式中,柱子在柱子基底不包含过滤装置。

[0101] 床可存在于合适的容器中——如柱子中。在本文的上下文中,术语“柱子”涉及任何种类的容器,其配有至少一个用于混合物进入柱子的入口以及至少一个用于随后从混合物中洗脱目的颗粒或目的蛋白质的出口。在一个实施方式中,容器是柱状的。通常,膨胀床吸附柱是在塞状流的条件下运行的,吸附剂床中的返混和湍流达到最小。根据本发明,混合物被引入包含吸附剂的膨胀床柱中,其中混合物的成分与柱中吸附剂接触并相互作用。本领域技术人员能够根据混合物的输入体积设计具有特定直径和高度的柱子。

[0102] 在将混合物引入柱子时,固体粒子和细胞碎片在吸附剂周围自由移动,最终穿过柱子上部离开。与任何色谱步骤相同,通常会对吸附剂进行高强度的洗涤以限制非特异性相互作用。同时,目的颗粒和目的蛋白质会与吸附剂相互作用,结合于吸附剂,并滞留在柱子当中。然后,使柱子堆积,流向逆转,按传统方法将目的颗粒从珠子上洗脱下来。

[0103] 一个进一步的方面涉及这样的吸附剂膨胀床,其包含可逆结合于其上的目的颗粒。合适地,吸附剂具有一种或多种本文描述的吸附剂特性。一个其他的方面涉及用于从混合物中捕获目的颗粒的膨胀床吸附剂用途或EBA色谱的用途。

[0104] 用于从混合物中捕获目的颗粒的过程基于的是对可用于EBA中的任何形状和规格的任何类型的固相材料的吸附。进一步地,所述的吸附的特征在于使用了所选择的吸附剂的特征、配体化学或其组合,其能够使得基本上仅有目的颗粒进行特异性结合及随后的洗脱,或备选地,其能够使得一些生物分子物质进行一组特异性结合,随后从吸附剂上对目的颗粒进行选择性的、连续性的洗脱。

[0105] 在多种实施方式中,吸附剂是珠子的形式。这些珠子可以在大小、密度、重量或其组合上是一致的,或其可在大小、密度、重量或其组合上是多样的。一个实施方式涉及大小一致但具有多样的密度或重量,或密度重量二者的珠子。这种安排可使珠子进行分布。珠子大小通常在 $5\ \mu\text{m}$ - $500\ \mu\text{m}$ 的范围内。珠子的合适大小可为直径在大约 $5\ \mu\text{m}$ - $500\ \mu\text{m}$ 的范

围内,如大约 $5\ \mu\text{m}$ - $400\ \mu\text{m}$ 、或大约 $5\ \mu\text{m}$ - $300\ \mu\text{m}$ 、或大约 $5\ \mu\text{m}$ - $200\ \mu\text{m}$ 、大约 $5\ \mu\text{m}$ - $100\ \mu\text{m}$ 、大约 $50\ \mu\text{m}$ - $400\ \mu\text{m}$ 、或大约 $50\ \mu\text{m}$ - $300\ \mu\text{m}$ 、或大约 $50\ \mu\text{m}$ - $200\ \mu\text{m}$ 、或大约 $50\ \mu\text{m}$ - $150\ \mu\text{m}$ 或 $50\ \mu\text{m}$ - $100\ \mu\text{m}$ ——如大约 $20\ \mu\text{m}$ - $80\ \mu\text{m}$ 、大约 $150\ \mu\text{m}$ 、大约 $100\ \mu\text{m}$ 、或大约 $50\ \mu\text{m}$ 。按珠子体积计,至少大约 70%、大约 80%、大约 90%、大约 95%、大约 96%、大约 97%、大约 98%、大约 99% 或 100% 的单个珠子可具有所述体积。较大的珠子聚集于流化床的较低部分,而较小的珠子会聚集在较高的部分。如果珠子太小,会以近似于颗粒污染物逃逸的速率发生膨胀,这会降低捕获效率。类似地,如果珠子太大,流化作用要求更高的流动速率,蛋白质结合会受到妨害,因为珠子之间会有不恰当的扩散情况。珠子的形式可以为任何形状,例如但不限于基本上是球形、长形、圆柱状、柱状或不规则形式。在一个实施方式中,珠子是球形的。本领域技术人员可根据要使用的过程选择合适的珠子大小、形状和多孔性。

[0106] 在另一个实施方式中,捕获目的颗粒的珠子的大小为大约 $25\ \mu\text{m}$ - $125\ \mu\text{m}$;合适地,为大约 $25\ \mu\text{m}$ - $100\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $25\ \mu\text{m}$ - $95\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $25\ \mu\text{m}$ - $90\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $30\ \mu\text{m}$ - $90\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $30\ \mu\text{m}$ - $85\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $35\ \mu\text{m}$ - $85\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $35\ \mu\text{m}$ - $80\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $40\ \mu\text{m}$ - $80\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $40\ \mu\text{m}$ - $75\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $45\ \mu\text{m}$ - $75\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $45\ \mu\text{m}$ - $70\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $40\ \mu\text{m}$ - $70\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $40\ \mu\text{m}$ - $65\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $45\ \mu\text{m}$ - $65\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $45\ \mu\text{m}$ - $60\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $45\ \mu\text{m}$ - $55\ \mu\text{m}$;最合适地,为大约 $50\ \mu\text{m}$ 。

[0107] 在另一个实施方式中,捕获目的颗粒之外的材料(例如植物材料)的珠子大小为大约 $130\ \mu\text{m}$ - $250\ \mu\text{m}$;合适地,为大约 $135\ \mu\text{m}$ - $250\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $135\ \mu\text{m}$ - $225\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $135\ \mu\text{m}$ - $200\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $135\ \mu\text{m}$ - $175\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $135\ \mu\text{m}$ - $170\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $140\ \mu\text{m}$ - $170\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $140\ \mu\text{m}$ - $165\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $140\ \mu\text{m}$ - $160\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $145\ \mu\text{m}$ - $160\ \mu\text{m}$;更合适地,为大约 $145\ \mu\text{m}$ - $145\ \mu\text{m}$;最合适地,为大约 $150\ \mu\text{m}$ 。合适地,这些珠子可用于使用膨胀床吸附剂的捕获前步骤中。

[0108] 在另一个实施方式中,吸附剂颗粒的密度可在大约 1g/ml - 20g/ml 的范围内;更合适地在大约 2g/ml - 20g/ml 的范围内;更合适地在大约 3g/ml - 20g/ml 的范围内;更合适地在大约 4g/ml - 20g/ml 的范围内;更合适地在大约 5g/ml - 20g/ml 的范围内;更合适地在大约 6g/ml - 20g/ml 的范围内;更合适地在大约 7g/ml - 20g/ml 的范围内;更合适地在大约 8g/ml - 20g/ml 的范围内;更合适地在大约 9g/ml - 20g/ml 的范围内;更合适地在大约 10g/ml - 20g/ml 的范围内;更合适地在大约 11g/ml - 20g/ml 的范围内;更合适地在大约 12g/ml - 20g/ml 的范围内,更合适地在大约 13g/ml - 20g/ml 的范围内;更合适地在大约 14g/ml - 20g/ml 的范围内;更合适地在大约 14g/ml - 19g/ml 的范围内;更合适地在大约 14g/ml - 18g/ml 的范围内,更合适地在大约 14g/ml - 17g/ml 的范围内;更合适地在大约 15g/ml - 17g/ml 的范围内;最合适地为 16g/ml 。

[0109] 本发明使用的吸附剂,并不限于任何具体的材料,本领域一般技术人员会能够选择适当的材料。这些方法可使用不同珠子的新型组合或在相同珠子上使用各种功能基团或配体的新型组合。珠子可以为非常多孔的、大孔的、微孔的、无孔的、亲水的、疏水的、高度带电的、微电的、无电的、刚性的或可膨胀的,但不限于此。珠子可以为塑料、甲基丙烯酸酯,多

糖(如琼脂糖,纤维素),氧化硅(例如,可控孔度玻璃),聚(苯乙烯-二乙烯苯)、聚丙烯酰胺,陶瓷珠,以及其的任何衍生物,不限于此。进一步的例子包括,结合能力高、结合能力低的强阴离子交换剂(如Q)、弱阴离子交换珠(例如,二乙基氨基乙基(DEAE), ANX),强阳离子交换材料(例如, SP),或弱阳离子交换材料(例如, CM)。

[0110] 为减少向上的流动中进料中吸附剂和粒子的速率之间的差异,可使用许多不同的吸附剂材料。为处理高粘性的进料或达到高的流速,需要的是增加珠子的大小、密度或增加二者。在本发明的多种实施方式中,密度的增加可通过使用高密度多孔材料或通过为高密度无孔材料包被有空材料而完成。仅仅由有机材料制造的珠子密度有限,出于常规色谱考虑,如考虑到高的沉积速率,其需要有非常大的直径。这样的大的珠子直径产生长的扩散途径长度,这引起了显著的传质阻力,对生产起到反作用。本发明包括复合珠子的应用,其包含比有机材料更致密的惰性内核材料。在本文的上下文中,术语“内核”涉及存在于珠子内部的无孔内核。内核不限于位于珠子中心。这些珠子的益处为具有高的密度和适合本发明方法的珠子大小。所述材料的密度范围为大约 1.2- 大约 4.0,例如,石英(1.2),硅石(1.4 ~ 1.6)、Nd-Fe-B 系合金(1.8-2.1)、不锈钢、钨碳化物(2.5-3.5)、锆氧化物(3.2)或氧化锆(3.85)。可用于包被内核的多孔材料包括但不限于,琼脂糖、陶瓷羟基磷灰石、纤维素、氧化锆凝胶、硅胶、和羟乙基甲基丙烯酸酯-亚乙基二甲基丙烯酸酯共聚物。合适的无孔内核材料的其他实例为无机化合物、金属、重金属、非金属元素、金属氧化物、非金属氧化物、金属盐和金属合金。这种内核材料的实例为金属硅酸盐、金属硼硅酸盐;陶瓷包括二硼化钛、碳化钛、二硼化锆、碳化锆、碳化钨、碳化硅、氮化铝、氮化硅、氮化钛、氧化钇、硅的金属粉末、和二硅化钼;金属氧化物和硫化物、包括镁、铝、钛、钒、铬、锆、钨、钼、铁、钴、镍、铜和银的氧化物;非金属氧化物;金属盐,包括硫酸钡;金属元素、包括钨、锆、钛、钨、钼、铬、锰、铁、钴、镍、钨、铜、银、金、钯、铂、钨、钨、钨、钨和金属元素的合金、如所述金属元素之间形成的合金,例如不锈钢;晶体和无定形形式的碳,包括石墨、炭黑和木炭。合适的无孔内核材料为碳化钨、钨、钢和钛珠-如不锈钢珠。无孔内核通常至多构成了吸附剂颗粒总体积的70%、例如至多60%、合适地至多50%、合适地至多40%、合适地至多30%、合适地至多20%、合适地至多15%、合适地至多10%、合适地为至多5%。

[0111] 通常用作吸附剂的材料为琼脂糖,这是一种已经证明对工业规模的色谱能很好运作的材料。因此,在一个实施方式中,吸附剂为琼脂糖或琼脂糖基的。(优选地高度交联的)琼脂糖基质的大孔结构将对大分子如蛋白质的良好结合能力与高的化学和机械稳定性相组合。在另一个实施方式中,吸附剂是葡聚糖或葡聚糖基的。高的机械稳定性是是基质的一项重要特性,用于减少珠子自由移动时的摩擦效应。因为对膨胀床方法的设计有不同于柱色谱的考虑,所以琼脂糖珠可比标准珠子更小或更大,或交联的量有差异。床材料中的所有结构材料都包括这些变化或不包括任何变化。修饰的琼脂糖基质可能脆性低于无机材料如一些玻璃或陶瓷材料。

[0112] 本发明包括珠子在柱内的多分散性。珠子的大小和密度梯度将珠子定位在珠子或床的特定位置。较小、较轻的珠子移动至一个位置,而较大、较重的珠子移动至不同位置。本发明还包括其他珠子特征的多分散性或分散性。大小、密度、结合能力、排阻孔大小、支持材料的差异是用于本发明的多种组分和因素的组合中的几个。

[0113] 在本发明的特定实施方式中,吸附剂包含适合用于捕获目的颗粒的配体。在本发

明特定实施方式中,吸附剂包含适合用于纯化目的颗粒或目的蛋白质的配体。

[0114] 可用于本发明的配体包括但不限于:包含以下物质,由以下物质构成或基本上由以下物质构成的配体:(i) 苄基胺或其衍生物,(ii) 烷基胺,包括具有如下烷基的烷基胺,所述烷基具有 1-12 个碳原子的直链或支链或环状结构,例如,甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、环戊基、环己基或十氢萘基,可选地,所述烷基基团被酸性基团以外的至少一个基团所置换;(iii) 烯基胺,包括烯基基团,其包括具有 2-12 个碳原子的单-,二-或多不饱和的烷基,所述烯基可以是直链,支链或环状的,并且其中的双键可能存在于链中或环上的任何位置,可选地,所述烯基基团被酸性基团以外的至少一个基团所置换;(iv) 炔基胺,其包括基本上对炔基胺定义的 C_{2-12} 炔基基团,包括被酸性基团以外的至少一个基团所置换的炔基基团;(v) 烷氧基胺,具有 C_{2-12} 烷氧基基团,可选地,所述烷氧基基团被酸性基团以外的至少一个基团所置换;以及(vi) 单环或双环芳基或杂芳基团的胺类,可选地,所述芳族基团或杂芳族基团被酸性基团以外的至少一个基团所置换。

[0115] 在一个进一步的实施方式中,能够捕获目的颗粒如 VLP 的配体选自这样的配体,其包含以下物质,由以下构成,或基本上由其构成:(i) 苄基胺或其衍生物,(ii) 烷基胺,包括具有如下烷基的烷基胺,所述烷基具有 1-12 个碳原子的直链或支链或环状结构,例如,甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、十二烷基、环戊基、环己基或十氢萘基,可选地,所述烷基基团被酸性基团以外的至少一个基团所置换;(iii) 烯基胺,包括烯基基团,其包括具有 2-12 个碳原子的单-,二-或多不饱和的烷基,所述烯基可以是直链,支链或环状的,并且其中的双键可能存在于链中或环上的任何位置,可选地,所述烯基基团被酸性基团以外的至少一个基团所置换;(iv) 炔基胺,其包括基本上对炔基胺定义的 C_{2-12} 炔基基团,包括被酸性基团以外的至少一个基团所置换的炔基基团;(v) 烷氧基胺,具有 C_{2-12} 烷氧基基团,可选地,所述烷氧基基团被酸性基团以外的至少一个基团所置换;以及(vi) 单环或双环芳基或杂芳基团的胺类,可选地,所述芳族基团或杂芳族基团被酸性基团以外的至少一个基团所置换,或其组合。

[0116] 在一个进一步的实施方式中,所述配体包含芳族酸类或杂芳族酸类,由芳族酸类或杂芳族酸类构成或基本上由其构成,其中芳族酸类或杂芳族酸类选自羧酸、磺酸、膦酸、硼酸等。合适地,配体选自 2- 巯基苯甲酸、2- 巯基烟酸、2- 氨基苯甲酸、3- 氨基苯甲酸和 4- 氨基苯甲酸、4- 羟基苯基 - 巯基乙酸、4- 羟基苯基 - 巯基丙酸、4- 羟基苯基 - 巯基 - 丁酸、2,3- 二羟基苯甲酸、2,4- 二羟基苯甲酸、2,5 二羟基苯甲酸、2,6- 二羟基苯甲酸、3,4- 二羟基苯甲酸、3,5- 二羟基苯甲酸、巯基苯并咪唑磺酸、邻氨基苯磺酸、间氨基苯磺酸、对氨基苯磺酸、4- 甲基苯胺 -2- 磺酸、4- 甲氧基苯胺 -2- 磺酸、苯胺 -2,5- 二磺酸、N- 氨基甲苯磺酸、7- 氨基 -1- 萘酚 -3- 磺酸、1- 萘酚 -4- 磺酸、2- 萘酚 -6- 磺酸和 2- 羟基 -3- 萘甲酸、以及 2- 巯基苯并咪唑磺酸。

[0117] 在一个进一步其他的实施方式中,所述配体包含芳族或杂芳族基团(根),由芳族或杂芳族基团(根)构成或基本上由芳族或杂芳族基团(根)构成,所述芳族或杂芳族基团(根)选自 i) 配体、其包含以下类型的功能基团:苯甲酸,如 2- 氨基苯甲酸、3- 氨基苯甲酸、4- 氨基苯甲酸、2- 巯基苯甲酸、4- 氨基 -2- 氯苯甲酸、2- 氨基 -5- 氯苯甲酸、2- 氨基 -4- 氯苯甲酸、4- 氨基水杨酸、5- 氨基水杨酸、3,4- 二氨基苯甲酸、3,5- 二氨基苯甲酸、5- 氨基

间苯二甲酸、4-氨基邻苯甲酸、肉桂酸、如羟基肉桂酸；烟碱酸、如 2-巯基烟酸；萘甲酸，如 2-羟基-1-萘甲酸；喹啉类，如 2-巯基喹啉；四氮唑乙酸、如 5-巯基-1-四氮唑乙酸、例如 2-巯基-5-甲基-1,3,4-噁二唑；苯并咪唑如 2-氨基苯并咪唑、2-巯基苯并咪唑和 2-巯基-5-氨基苯并咪唑；硝基苯并噻唑如 2-氨基苯并噻唑、2-氨基-6-硝基苯并噻唑、2-巯基苯并噻唑和 2-巯基-6-乙氧基苯并噻唑；苯唑酮、如 2-巯基苯唑酮；苯硫酚、如苯硫酚和 2-氨基苯硫酚；2-(4-氨基苯硫基)乙酸；芳族或杂芳族磺酸和膦酸、如 1-氨基-2-萘酚-4-磺酸和酚类、如 2-氨基-4-硝基苯酚、ii) 配体，其包含 2-羟基肉桂酸、3-羟基肉桂酸和 4-羟基肉桂酸；iii) 配体，其包含羧酸和作为取代基的氨基基团，如 2-氨基烟酸、2-巯基烟酸、6-氨基烟酸和 2-氨基-4-羟基嘧啶羧酸；iv) 配体，其包含由苯环与杂芳环体系融合衍生的基团，例如，选自以下物质的配体：苯并咪唑、如 2-巯基苯并咪唑以及 2-巯基-5-硝基-苯并咪唑；苯并噻唑、如 2-氨基-6-硝基苯并、2-巯基苯并噻唑以及 2-巯基-6-乙氧基苯并噻唑；苯唑酮如 2-巯基苯唑酮；以及 v) 选自苯硫酚的配体如苯硫酚和 2-氨基苯硫酚。

[0118] 配体可具有对目的颗粒或目的蛋白质的亲和力。因此，配体能够发生高度特异的生物学相互作用，如抗原和抗体之间、酶和底物之间或受体和受体配体之间可能发生的那些相互作用。因此，配体可以为抗体、抗原、酶、酶底物、受体、受体配体或适配子，等等。在一个实施方式中，配体为抗体。生物学配体可单独使用或与本文描述的一种或多种化学配体组合使用。所述生物学配体可包含一种或多种相同或不同的配体，可选地，可与本文描述的一种或多种化学配体相组合。

[0119] 通常将包含配体的吸附剂平衡到目的颗粒结合发生的最佳 pH 条件。平衡过程通常是通过使用 pH 值在大约 3-10 的范围内的缓冲液进行的，如 pH 范围为大约 5-7，合适地，为 pH7。

[0120] 包含配体的珠子通常包含多个的配体。在一个特定实施方式中，珠子包含如上文描述的配体，并组合有第二种类型的配体，其中根据本发明的配体存在量为总配体量的至少大约 30%，合适地，为至少大约 50%，更合适地，为至少大约 70%，最合适地，为至少大约 90%。这样的组合配体分离基质可设计为用于特定情况，其中其他相互作用的元素提高了其分离特性。第二种配体种类可包含一个或多个带电基团，如阳离子交换剂，其被用于通过电荷排斥洗脱化合物；疏水基团；能够形成氢键的基团；亲和基团等等。因此，还包括的是如本文所描述的能够结合目的颗粒的不同配体的组合，这些配体可以相同比率或不同比率存在。

[0121] 在多种实施方式中，需要以如下流速运行所述方法，所述流速超过进料中粒子的收尾速率但不超过珠子的收尾速率。在一个实施方式中，膨胀床中线性流速为至少大约 2cm/min、至少大约 3cm/min、至少大约 4cm/min、至少大约 5cm/min、至少大约 6cm/min、至少大约 7cm/min、至少大约 8cm/min、至少大约 10cm/min、至少大约 12cm/min、至少大约 15cm/min、至少大约 20cm/min、至少大约 25cm/min、至少大约 30cm/min、至少大约 40cm/min 或至少大约 50cm/min。在另一个实施方式中，线性流速范围为大约 1cm/min-15cm/min，例如大约 2cm/min-10cm/min、或大约 2cm/min-9cm/min、或大约 2cm/min-8cm/min、或大约 3cm/min-8cm/min、或大约 3.5cm/min-7.5cm/min。在一个实施方式中，流速为大约 3.8cm/min。在另一个实施方式中，流速为大约 7.5cm/min。可通过在出口处收集限定的时间段内的液

体体积测量流速。

[0122] 在其他实施方式中,膨胀床中进料的输入可以以至少大约 150cm/ 小时的线性流速进行—如至少大约 180cm/ 小时、至少大约 200cm/ 小时、至少大约 210cm/ 小时、至少大约 220cm/ 小时、至少大约 230cm/ 小时、至少大约 240cm/ 小时、至少大约 250cm/ 小时、至少大约 300cm/ 小时、至少大约 400cm/ 小时、至少大约 425cm/ 小时、至少大约 450cm/ 小时、至少大约 475cm/ 小时、至少大约 500cm/ 小时或至少大约 600cm/ 小时或更多。在另一个实施方式中,膨胀床中进料的输入可以以至少大约 200–500cm/ 小时的流速进行——例如大约 300–500cm/ 小时、或大约 400cm/ 小时。在一个实施方式中,流速为大约 228cm/ 小时。在另一个实施方式中,流速为大约 450cm/ 小时。

[0123] 床的膨胀度的测量公式为:高度 0/ 高度 1,其中高度 1 是没有液体流穿柱子时填充床形式中的床高度,高度 0 是有液体流穿柱子时膨胀床形式中的床高度。在一个实施方式中,膨胀度范围为 1–5,例如,为 1–4 或 1–3 或 1–2——如 1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8 或 1. 9。对一些实施方式,膨胀度最多为大约 1. 2。在另一个实施方式中,流速为大约 5cm/min,膨胀度为 1–2,例如为 1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8 或 1. 9,合适地,为 1. 2。在另一个实施方式中,流速为大约 6cm/min,膨胀度为 1–2,例如为 1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8 或 1. 9,合适地,为 1. 2。在另一个实施方式中,流速为大约 7cm/min,膨胀度为 1–2,例如为 1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8 或 1. 9,合适地,为 1. 2。在另一个实施方式中,流速为大约 8cm/min,膨胀度为 1–2,例如为 1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8 或 1. 9,合适地,为 1. 2。在另一个实施方式中,流速为大约 9cm/min,膨胀度为 1–2,例如为 1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8 或 1. 9,合适地,为 1. 2。在另一个实施方式中,流速为大约 10cm/min,膨胀度为 1–2,例如为 1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8 或 1. 9,合适地,为 1. 2。在另一个实施方式中,流速为大约 4cm/min (例如为大约 3. 8cm/min),膨胀度为 1–2,例如为 1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8 或 1. 9,合适地,为 1. 2。在另一个实施方式中,流速为大约 8cm/min (例如为大约 7. 8cm/min),膨胀度为 1–2,例如为 1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8 或 1. 9,合适地,为 1. 2。

[0124] 偶联有配体的膨胀床吸附剂用于从混合物中捕获目的颗粒的用途可包括首先提供包含一种或多种目的颗粒的混合物的步骤。混合物可具有限定的 pH 值,或者可调整混合物的 pH 以获得所需的 pH 值。将混合物与膨胀床吸附剂相接触,可选地,用一种或多种缓冲液进行洗涤。一种或多种目的颗粒可逆地结合于吸附剂,或者其保持未结合的状态。然后可用缓冲液洗涤吸附剂,以获得包含未结合材料的部分。然后,可用至少一种洗脱缓冲液洗涤吸附剂以获得至少一种洗脱液,其包含一种或多种可逆地结合于吸附剂的目的颗粒。洗涤步骤、洗脱步骤或二者可以用 pH 值比起始接触吸附剂的混合物 pH 高的缓冲液进行。所述(多种)缓冲液可包含一种或多种进一步的化合物——例如一种或多种去垢剂。可以在每个洗脱步骤之间用缓冲液洗涤吸附剂。洗脱步骤中所获得的包含未结合材料或目的颗粒,或二者的部分可经过本文讨论的其他下游处理,包括但不限于,色谱、免疫纯化、离心、倾析、沉积过程,等等,或两种或更多种前述过程的组合。

[0125] 洗脱步骤中床的膨胀度在 0. 5–5 的范围内,例如,1–4 或 1–3 或 1–2, 如 1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8 或 1. 9。对一些实施方式,膨胀度至多为大约 1. 2。

[0126] 在一个实施方式中,可使用两种或更多种不同的吸附剂从混合物中捕获两种或更

多种目的颗粒,其中所述吸附剂中一种或多种,例如其中所有都是膨胀床模式。因此,本发明包括两种或更多种、三种或多种、四种或多种或者五种或多种不同吸附剂用于捕获目的颗粒的用途。

[0127] 在一个其他的方面,本发明涉及从混合物中捕获目的颗粒的方法,所述方法包括在目的颗粒与吸附剂结合的条件下将混合物与膨胀床吸附剂相接触,以及改变条件将目的颗粒从吸附剂上洗脱下来。在一些实施方式中,所述方法捕获了起始存在于混合物中的目的颗粒总量的至少 50%,包括目的颗粒的至少大约 60%、70%、80% 或 90%。甚至可达到更高的捕获率——如至少 92.5%、95%、96%、97%、98% 或至少 99%。

[0128] 现在描述本发明的其他实施方式。在捕获前,可对包含目的颗粒的宿主细胞进行裂解、均质化、研磨、粉碎、破碎、干燥(例如,冷冻干燥)、挤压,或对其进行上述两种或更多种的组合。还可使用其他已知的减少大体积材料的大小、破坏细胞或释放细胞内容物的方法。如果宿主细胞为植物宿主细胞,则可使用本领域已知方法进行破坏或均质化——例如但不限于,螺旋压榨机(例如,以大约 15Kg/hr-20Kg/hr 使用 Vincent CP-4 螺旋压榨机,锥体上使用至少 45psi 的压力)、铣刀、或烟草加工中常用的一种或多种机器(例如,挤出机)。收集所获得的提取物,可选地,加以储存。当绿叶占起始材料中主要成分时,还将其称为绿汁或绿色提取物。这种提取物不仅包含细胞间空间的内容物(即质外体),还包含细胞的细胞内内容物。在一个实施方式中,可添加一种或多种化学品或组合物等对提取物进行其他处理。因此,在一个实施方式中,可将偏亚硫酸氢钠加入提取物中。此步骤是可选的,因为目的颗粒可能从细胞中分泌出来。

[0129] 提取物的电导率可使用本领域已知方法测量——如通过使用 ConduTimeter Multi350i/set。如果电导率不在所需范围内,则可在使用前用去离子水稀释提取物。例如,有观察到烟草的茎和叶子的均质化产生的植物材料的电导率为大约 20mS/cm。在来源于普通烟草(N. Tabacum) 和本氏烟草(N. bentamiana) 的均质化植物材料中一致观察到该数值。根据一个实施方式,电导率应当在 1mS/cm-10mS/cm 的范围内;合适地,为 2mS/cm-8mS/cm;合适地,为 3mS/cm-7mS/cm;合适地,为 4mS/cm-6mS/cm,例如,为 5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8 或 5.9mS/cm。根据另一个实施方式,电导率可以为 1mS/cm-5mS/cm 的范围;合适地,为 2mS/cm-3mS/cm,例如为 2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8 或 2.9mS/cm。在另一个实施方式中,提取物的 pH 为大约 pH6.0-8.0,合适地,为大约 pH7.0。

[0130] 可取地,可以在捕获前对进料进行预处理。在其中目的颗粒存在于植物提取物的情况下,有利的是移除一些能在捕获过程中引起结块和阻塞的植物来源的大分子。根据一个实施方式,使用离子交换剂——如聚乙烯亚胺(PEI) 离子交换剂以结合不期望的植物来源大分子。此步骤可以以批式孵育的模式施行,合适地,在第一个柱子中进行孵育,可选地,将由其获得的洗脱材料与第二个包含膨胀的床的柱子相接触。合适地,用于此捕获前步骤的离子交换剂具有的平均吸附颗粒尺寸为大约 100 μm -200 μm ;合适地,为大约 150 μm , pH 为大约 7。通常,用合适的缓冲液平衡离子交换剂——如 0.5M Tris/HCl 缓冲液(pH7),随后使用 10mM Tris/HCl 缓冲液(pH7.0)进行平衡。本发明包括的其他捕获前步骤可包括过滤、微滤、离心(例如,低速离心)、倾析或沉积作用,或两种或更多种这些方法的组合。

[0131] 根据另一个实施方式,捕获前步骤包括吸附剂膨胀床的应用。合适地,用于捕获前步骤的珠子大小为大约 130 μm -250 μm ;合适地,为大约 135 μm -250 μm ;更合适地,为大

约 135 μm -225 μm ;更合适地,为大约 135 μm -200 μm ;更合适地,为大约 135 μm -175 μm ;更合适地,为大约 135 μm -170 μm ;更合适地,为大约 140 μm -170 μm ;更合适地,为大约 140 μm -165 μm ;更合适地,为大约 140 μm -160 μm ;更合适地,为大约 145 μm -160 μm ;更合适地,为大约 145 μm -145 μm ;最合适地,为大约 150 μm 。合适地,可在使用膨胀床吸附剂的捕获前步骤中使用这些珠子。因此,本发明的一个其他方面涉及用于从混合物中捕获目的颗粒的方法,包括以下步骤:(a) 提供第一吸附剂膨胀床;(b) 在混合物中不期望的材料结合于第一吸附剂的条件下来将混合物与第一吸附剂相接触;(c) 提供第二吸附剂膨胀床;(d) 在目的颗粒结合于第二吸附剂的条件下来将来自步骤(b)的目的颗粒与第二吸附剂接触;(e) 可选地,洗涤第二吸附剂;(f) 可选地,从第二吸附剂中洗脱目的颗粒;以及(g) 可选地,重复进行一或多次步骤(a)-(f)。

[0132] 在一个实施方式中,膨胀床模式中使用的吸附剂为阴离子交换树脂——如二乙氨基乙基纤维素基的离子交换树脂,合适地为二乙氨基乙基纤维素葡聚糖基的离子交换树脂。树脂通常是用 pH 为大约 pH6.0-8.0 的缓冲液平衡的;合适地,所述缓冲液为 pH7.0,例如使用 0.5M Tris/HCl 缓冲液(pH7),随后使用 10mM Tris/HCl (pH7.0)。在一个实施方式中,吸附剂的平均吸附剂颗粒大小为大约 25 μm -200 μm ;合适地,为大约 25 μm -75 μm ;最合适地,为大约 50 μm 。如果该方法是在膨胀床柱子中进行的,那么技术人员会清楚知道可使用多种大小的柱子。在一个实施方式中,柱子直径为 1cm,柱高为大约 70cm,床高为大约 15cm。本发明还包括更大的珠子的应用——如可用于工业规模的柱子。例如,柱子大小范围是直径大约 1cm-直径 1500cm——例如多至直径为大约 10cm、多至直径为大约 100cm、多至直径为大约 250cm、多至直径为大约 500cm、多至直径为大约 750cm、多至直径为大约 1000cm、多至直径为大约 1250cm、多至直径为大约 1500cm、多至直径为大约 1750cm 或至少多至直径为大约 2000cm。其他直径包括 2cm 直径、10cm 直径、45cm 直径和 150cm 直径。如本文所描述的,将上清液以所需的流速加样上柱,在加样上柱后,通常地,用 pH 为大约 6.0-8.0 的洗涤缓冲液洗涤珠子;合适地,使用 pH7.0 的洗脱缓冲液——如 10mM Tris/HCl pH7.0。然后可使用合适的洗脱缓冲液洗脱结合的材料,通常,洗脱缓冲液比洗涤缓冲液的 pH 更高或更低。在一个实施方式中,洗涤缓冲液包含 50mM Tris/HCl 和 1M NaCl, pH9.0。合适地将洗脱液收集于一个部分中,洗脱过程中添加缓冲液——如 1M Tris/HCl (pH6.5) 调整其 pH 至 pH7——例如在收集洗脱液之前将溶液加至管中。

[0133] 根据一种操作模式,植物提取物中存在的目的颗粒的结合和洗脱是使用 DEAE 离子交换剂,随后用 PEI 离子交换剂进行预捕获而完成的。

[0134] 在另一个实施方式中,提取物未经过预处理,这样目的颗粒可在一步结合盒洗脱过程中得到分离。这种操作模式对于使用膨胀床吸附的大规模捕获目的颗粒是尤其合适的。因此,根据本方法可处理至少 100 升(例如,至少 250 升、至少 500 升、至少 750 升、至少 1000 升、至少 1250 升、至少 1500 升、至少 1750 升以及至少 2000 升)的提取物。

[0135] 在一个实施方式中,珠子组合物为琼脂糖基的——如环氧氯丙烷交联的琼脂糖(例如,以 4%w/v 使用)。珠子可包含与珠子其他部分不同的组合物的内核——如碳化钨的内核。合适的配体为 DEAE 离子交换剂,其通常具有的平均直径为大约 50 μm 。合适地,吸附剂颗粒的平均密度为大约 16kg/L。合适的柱子直径为大约 45cm,其在沉积状态下的空隙体积包含近似 40% 的堆积体积。在一个实施方式中,柱子是用 0.5M Tris-Cl 缓冲液(pH7),随

后使用 10mM Tris-Cl 缓冲液(pH7)平衡的。合适地,提取物的加样是通过以如本文所描述的流速向上泵入提取物而完成的。膨胀系数通常在 2.0-2.5 的区域内,未结合的材料是用 10mM Tris/HCl (pH7)以相同的膨胀速率洗出的。在 EBA 色谱步骤后,可用 50mM Tris-Cl 和 1M NaCl (pH9)以大约 1.2 的膨胀速率洗脱目的颗粒。可通过收集洗脱峰前向容器中添加 1MTris/HCl (pH6.5)中和洗脱级分。可汇合含有或包含目的颗粒的级分用于其它捕获和纯化过程。

[0136] 珠子的平均密度可为大约 1g/ml-20g/ml,线性流速可为至少大约 150cm/小时,膨胀床的膨胀度可为大约 1-5。

[0137] 在本发明的一个实施方式中,可选地,可分别用一种或多种洗涤缓冲液和平衡缓冲液对吸附剂进行洗涤或平衡,或进行洗涤和平衡。加至吸附剂的混合物可为经调整的混合物。在其中吸附剂并非维持在柱子中的情况下,其可为偶联有配体的固相,例如用于膜基的吸附,例如膜过滤器、纤维或片层。

[0138] 因此,一个其他的方面涉及用于从混合物中捕获目的颗粒的方法,包括步骤:(i) 提供吸附剂的膨胀床,其在柱子中包含配体,静止床高超过 10cm,其中吸附剂的密度为大约 1g/ml-20g/ml,其中膨胀床的膨胀度为大约 1-5,并且其中吸附剂颗粒的平均大小为大约 25 μ m-大约 200 μ m;(ii) 以在大约 pH6.0-8.0 范围内的 pH 下平衡树脂材料;(iii) 提供包含目的颗粒的混合物,其中所述混合物的电导率为大约 1mS/cm-10mS/cm;(iv) 以大约 1cm/min-15cm/min 范围内的线性流速将混合物加样到柱上以结合目的颗粒;(iv) 使用具有的 pH 值在大约 pH6.0-8.0 范围内的缓冲液洗涤加样后的柱子;以及(v) 从柱子上将结合的目的颗粒洗脱于一个或多个级分。

[0139] 如本文所指代的,“缓冲液”为通过其酸碱缀合物组分耐受加入酸或碱时的 pH 变化的溶液。根据所需的缓冲液 pH 值以及捕获过程中具体步骤,可采用多种缓冲液。可用于控制本发明的方法所需要的 pH 范围的缓冲液组分的非限制性实例包括乙酸、柠檬酸、组氨酸、磷酸、铵缓冲液如乙酸铵、肉桂酸铵、MES、CHAPS、MOPS、MOPSO、HEPES、Tris 等等,以及 TRIS-苹果酸-NaOH、马来酸、氯乙酸、甲酸盐、苯甲酸盐、丙酸盐、吡啶、哌嗪、ADA、PIPES、ACES、BES、TES、甘氨酸、N-二甘氨酸、TAPS、乙醇胺、CHES、CAPS、甲胺、哌啶、硼酸、碳酸、乳酸、丁二酸、二乙基丙二酸、双甘氨酸、HEPPS、HEPPSO、咪唑类、苯酚、POPSO、琥珀酸盐、TAPS、苄胺、三甲基胺或二甲基胺或乙基胺或苯基胺、乙二胺、或吗啉的组合。根据需要,其他组分(添加剂)可以存在于缓冲液中,例如,盐类可用于调整缓冲液离子强度,如氯化钠、硫酸钠和氯化钾;以及其他添加剂,如氨基酸(如甘氨酸、组氨酸)、离液剂(如尿素)、醇类(如乙醇、甘露糖醇、甘油、和苄醇)、清洁剂(见上文)、以及糖类(如蔗糖、甘露糖醇、麦芽糖、海藻糖、葡萄糖和果糖)。所述缓冲液组分和添加剂以及所使用的浓度可根据本发明中实行的色谱类型而变动。

[0140] 术语“去垢剂”指代离子型、两性离子型及非离子型表面活性剂,可用于防止蛋白质的聚集并防止污染物与目的蛋白质的非特异性相互作用或结合,其可存在于本发明所使用的多种缓冲液中,包括消毒、平衡、加样、加样后洗涤、洗脱或再生缓冲液。在具体实施方式中,去垢剂是添加到洗涤缓冲液中的。可用于本发明的去垢剂的实例包括但不限于聚山梨醇酯(例如,聚山梨酸酯 20 或 80);泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆 188);Triton;十二烷基硫酸钠(SDS);硫酸月桂钠;糖苷辛基钠;月桂基、肉豆蔻基、亚油基或硬脂基硫代甜菜碱;月

桂基、肉豆蔻基、亚油基或硬脂基酰肌氨酸；亚油基，肉豆蔻基，鲸蜡基甜菜碱；月桂酰胺丙基、椰油酰胺基丙基、亚油基酰胺丙基、肉豆蔻酰胺丙基、棕榈酰胺丙基或异硬脂酰胺丙基甜菜碱(例如，月桂酰胺丙基)；肉豆蔻酰胺丙基、棕榈酰胺丙基或异硬脂酰胺丙基二甲胺；甲基椰油基钠，或油酰基甲基牛磺酸二钠；MONAQUAT™系列(Mona Industries, Inc., Paterson, NJ.)；Igepal CA-630、Pluronic、Triton、BRIJ、Atlas G2127、Genapol、HECAMEG、LUBROL PX、MEGA、NP、THESIT、TOPPS、CHAPS、CHAPSO、DDMAU、EMPIGEN BB、AWITTERGENT 和 C12E8。去垢剂可加入任何工作缓冲液中，还可包括在含有目的分子的进料内。去垢剂可以以任何适合用于本文描述的方法的量存在，例如，为大约 0.001%–大约 20%，通常为大约 0.01%–大约 1%。在一个具体的实施方式中，对于 CEXC 在所使用的洗涤缓冲液中使用了聚山梨酸酯 80。

[0141] 色谱运行可使用多种本领域熟知的方法进行监测——如通过在 280nm 和 600nm 处测量 UV 吸收值，通过测量电导率或通过 pH，或通过这些测量的组合而进行监测。

[0142] 对所需目的颗粒的捕获可使用特异于目的蛋白质的恰当的测定法进行监测。可使用一些测定法——如熟知的 Bradford 测定法——确定各级分的总蛋白质含量。SDS-PAGE 可用于确定其纯度。Western 印记可用于对目的蛋白质进行鉴别和定性。还可使用测量蛋白质活性的方法——例如本文所描述的血凝素测定法。

[0143] 根据另一个实施方式，在使用后对膨胀床和柱子进行清洁和再生。因此，例如在洗脱后，用 0.5M NaOH 洗涤，随后使用蒸馏水进行洗涤，以对树脂进行清洁和再生。使用 10mM Tris-Cl 缓冲液(pH7)可再次平衡。

[0144] 因此，本发明的一些方面涉及从植物中捕获目的颗粒。因此，一个方面涉及用于从植物、植物细胞或植物提取物中捕获目的颗粒的方法，包括使用膨胀床或 EBA 色谱。根据一个实施方式，所述方法包括以下步骤：(a) 提供吸附剂膨胀床；合适地，其为 DEAE 基的吸附剂；(b) 将植物材料与吸附剂相接触；(c) 可选地，对吸附剂进行冲洗；以及 (d) 可选地，从吸附剂上洗脱目的颗粒。合适地，植物提取物在与吸附剂接触前的电导率为 1mS/cm–10mS/cm，合适地为 2mS/cm–3mS/cm。合适地，吸附剂包含多个珠子——如包含琼脂糖以及适合与目的颗粒相结合的配体的珠子。这些珠子的平均直径为大约 50 μm。合适地，配体包含阴离子交换树脂，或由阴离子交换树脂构成，或基本上由其构成——如二乙氨基乙基纤维素葡聚糖基的离子交换树脂，合适地是二乙氨基乙基纤维素葡聚糖基的离子交换树脂。合适地，珠子的平均密度为大约 1g/ml–20g/ml。合适地，线性流速为至少大约 150cm/小时。合适地，膨胀床的膨胀度为大约 1–5。

[0145] 通常，VLP 与感染中产生的病毒子的抗原性类似，但缺少足以进行复制的基因信息，因此通常是非感染性的。VLP 可与感染中产生的病毒子在形态学上类似，但并不总是如此。VLP – 如病毒来源的 VLP– 可具有很广的大小分布，并可与感染中产生的病毒子形状相异——如，不是那么球形、有更长的轴或是扁平的外观。因此，有时候可将 VLP 视为变形的病毒，这使得对其的捕获具有挑战性。

[0146] VLP 产生于多种病毒家族的组分，包括细小 DNA 病毒科(Parvoviridae，例如腺相关病毒)、逆转录病毒科(Retroviridae，例如 HIV) 以及黄病毒科(Flaviviridae，例如 C 型肝炎病毒)。VLP 可产生于多种细胞培养系统中，包括哺乳动物细胞系、昆虫细胞系、酵母和植物细胞。在特定实施方式中，存在于 VLP 中的一种或多种蛋白质种类可以是天然发生的序列修饰而来。VLP 可产生于合适的宿主细胞，包括哺乳动物细胞、细菌细胞、植物细胞和

昆虫细胞。在一个实施方式中，VLP 产生于植物的细胞中。VLP 常常可通过异源表达而大量生产。VLP 可以以完整的结构分离自宿主或宿主细胞。可通过例如免疫测定、功能测定（例如，凝集反应）、电子显微镜或尺寸排阻色谱就结构和大小对 VLP 进行评估。

[0147] VLP 可包含一种或多种不同的目的蛋白质。这些蛋白质可以为不同生物学来源，但其中至少一种是病毒来源。对于包含超过一种蛋白质种类的 VLP 来说，所述蛋白质种类可来自相同病毒种属，或可包含来自不同病毒种、属、亚科或家族的蛋白质。此外，VLP 可另外包含非蛋白质的其他类型的分子，例如但不限于脂质和碳水化合物。

[0148] 在一个实施方式中，VLP 是目的蛋白质单体单位的多聚组装体。在多个实施方式中，目的蛋白质为病毒蛋白质，例如但不限于衣壳蛋白质。大多数病毒结构是基于其衣壳结构，并能以螺旋体、二十面体或等轴体或信封体形式存在。螺旋对称体在病毒的圆周一圈有蛋白质亚基，形成盘状。二十面体重对称的衣壳形成了准球形结构；对于信封体病毒，蛋白质亚基则暴露于外部环境。在多种实施方式中，VLP 包含衣壳，包括三个到大约 200 个衣壳。在一个实施方式中，VLP 包括至少 30、至少 50、至少 60、至少 90 或至少 120 个衣壳。在另一个实施方式中，每个 VLP 包括至少 150 个衣壳、至少 160、至少 170 或至少 180 个衣壳。在其他实施方式中，目的蛋白质可为病毒基质蛋白质或病毒糖蛋白，等等。

[0149] 在一个实施方式中，VLP 是以二十面体结构表达的。在另一个实施方式，VLP 是以与衣壳序列来源的原生病毒相同的几何体形式表达的。在另一个实施方式中，VLP 不具有与原生病毒一致的几何体形式。在一个实施方式中，至少有一个衣壳包含至少一种目的蛋白质。

[0150] 在一个实施方式中，通过本发明捕获的 VLP 可用于制造药用组合物，包括但不限于疫苗——如流感或禽流感疫苗。这种疫苗可施用于人类或动物以防止病原体感染或治疗这些病原体引起的感染，所述病原体为例如病毒、细菌、原虫、线虫、寄生虫，但不限于此。

[0151] 目的颗粒可以为细菌膜影颗粒。这种类型的颗粒为细菌如革兰氏阴性细菌的空细菌细胞外壳。通常，其是通过受控制的基因外源表达而制备的，所述基因影响细菌（特别是革兰氏阴性细菌）的部分裂解。例如，裂解基因可以为噬菌体 PhiX174 基因 E，其编码一种多肽，所述多肽插入到革兰氏阴性细菌细胞外壳复合物中并形成穿透内膜和外膜的跨膜通道结构。所述通道结构的内径可在大约 20nm-400nm 的范围内，特别是 40nm-200nm 或 500nm-1,000nm 的范围内，这取决于所应用的裂解条件。细胞质组分通过所述通道结构释放出来，其中获得了具有完整形态学的空细胞外壳复合物，即所谓的细菌膜影。细菌 ghost 膜影的用途公开于 W091/13555 和 W093/01791。细菌膜影颗粒可为重组膜影颗粒。所述细菌膜影颗粒可为在其表面展示有一种或多种目的蛋白质——如疫苗抗原的重组膜影颗粒。

[0152] 该过程可产生至少 0.1g/L 的 VLP 形式的蛋白质。在另一个实施方式中，该过程产生 0.1g/L-10g/L 的 VLP 形式的蛋白质。在其他实施方式中，所述过程产生至少大约 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 或 1.0g/L 的 VLP 形式的蛋白质。在一个实施方式中，产生的 VLP 总量为至少 1.0g/L。

[0153] 所表达的病毒衣壳部分可操作地连接至目的蛋白质，其形成于细胞的不可溶聚集体内。在一个实施方式中，目的蛋白质时从如本文描述的不可溶聚集体内复性得到的。

[0154] 在一个实施方式中，可操作地连接于病毒衣壳序列的蛋白质包含至少 2 个氨基酸。在另一个实施方式中，所述蛋白质包含至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个或至少 6 个氨基

酸。在另一个实施方式中,所述蛋白质长度为至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少十个或至少 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900 或 1000 或更多的氨基酸。在一个实施方式中,蛋白质的分子量为至少 25kDa、50kDa、100kDa 或 150kDa 或更多。

[0155] 目的蛋白质可以为并非来源于所述病毒的异源蛋白质,可选地,其并不来源于与宿主细胞相同的种属。

[0156] 目的蛋白质可以为功能性蛋白质;结构蛋白质;抗原;免疫原;毒素;抗微生物蛋白质、治疗性蛋白质或预防性蛋白质,用于治疗或预防或者治疗及预防人类或动物的疾病。本文描述的蛋白质的片段、融合蛋白质、前体或共聚体也包括在内。功能性蛋白质的非限制性实例包括但不限于,免疫活性蛋白质(例如,抗原蛋白质、过敏原性蛋白质、免疫调控子、免疫调节剂);信号传导及信号转导蛋白质及抑制性蛋白质(例如,毒性的、杀生物的或生物稳定型蛋白质,如蛋白质、毒素和抗微生物蛋白质)。结构性蛋白质包括但不限于,适配体;折叠蛋白质、促粘附蛋白质、界面蛋白质、微观结构和纳米结构的蛋白质和预激活蛋白。催化性蛋白质包括,例如, RNA 编辑蛋白质;tRNA 合成酶的催化蛋白质;核糖体失活蛋白质;以及病毒催化性蛋白质。目的蛋白质可以为相关蛋白质(例如抗原性病毒蛋白质;病毒相关蛋白质、抗体独特结构域;细胞表面蛋白质;人类,动物,原生生物,植物,真菌,细菌或古生物的抗原性蛋白质;过敏原性蛋白和过敏原脱敏蛋白质)。

[0157] 蛋白质还可以为免疫调控子和免疫调节剂(例如,干扰素、白介素、免疫抑制剂和免疫增强剂);抗体(例如,单链抗体;单链抗体片段和构建体,例如单链 Fv 分子;抗体轻链分子、抗体重链分子、结构域删除的抗体轻链或重链分子;单链抗体结构域和分子,例如 CH1、CH1-3、CH3、CH1-4、CH4、VHCH1、CL、CDR1 或 FR1-CDR1-FR2 结构域;旁原位肽(paratopic peptide)、微抗体);其他结合蛋白质(例如,适配体、细胞内和细胞表面受体蛋白质、受体片段)。

[0158] 所述蛋白质可以为酶底物或酶抑制剂或细胞表面受体配体、激动剂、以及拮抗剂、激素、细胞因子、趋化因子、病毒因子以及病毒受体激素释放及释放抑制蛋白质、经递质或通道阻滞剂,毒素,或毒素前体。蛋白质也可以是代谢和消化相关蛋白,细胞粘附调节或介导蛋白,细胞外基质蛋白,神经保护剂或促髓鞘化蛋白质;或聚集抑制性蛋白质。目的蛋白质可以为分泌蛋白质。

[0159] 蛋白质的编码序列可以为原生编码序列,但更通常地,为经过选择、改进或优化以在所选择的宿主细胞中使用的编码序列:例如,通过合成基因以反映出宿主种属的密码子使用偏好,或在其中包含信号肽。

[0160] 在一个实施方式中,目的蛋白质为可用于疫苗或疫苗组合物的抗原。合适地,疫苗还包含药用可接受载体或佐剂,或二者。疫苗的预期用途是预防性或治疗性的。“预防性”处理是这样的处理,施用于未显示疾病征兆或仅仅显示出早期征兆的受试者,用于降低发展病理状况风险的目的。疫苗可作为预防性治疗以减少发展病理状况的可能性,或者在已发展病理学状况的情况下使病理学状况的严重度最小化。“治疗性”处理是这样的处理:施用于显示有病理状况的征兆或症状的受试者,用于减小或消除这些征兆或症状的目的。所述征兆或症状可以为生物化学层面、细胞层面、组织学层面、功能性、主观性或客观性的征兆或症状。

[0161] 在一个实施方式中,抗原为血凝素(HA)或其衍生物。HA为包含近似560个氨基酸的病毒表面糖蛋白。其负责感染早期阶段病毒的粘附及向宿主细胞的渗透。有至少16种已知的HA亚型,分类为H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15或H16亚型。血凝素可见于流感病毒以及很多其他细菌和病毒的表面。目前,人类中流感感染的最显著的原因归结于A型流感病毒H1N1和H3N2。然而,引起流行性感染的流感病毒株为例如H5N1亚型,通常的流感疫苗对其起不到防护作用。H2、H7和H9亚型也具有流行感染的潜在可能。高度致病的禽流感病毒能够引起鸟类的严重呼吸疾病以及死亡。现在仅仅已知H5和H7亚型的HA有这项特征。因为一些禽类病毒能够传染到人类,所以这些病毒也成为人类健康的威胁。禽流感病毒的病原性具有多基因特性,而HA蛋白质已经显示出在感染中起主要作用。HA蛋白质可表达为单体、双体和三体的形式。任何HA亚型和变体以及任何HA的单体、双体或三体形式都可以为目的蛋白质并存在于本文描述的VLP中。

[0162] 凝血素蛋白质可使用标准方法通过ELISA进行检测,其中可能包含抗体的应用。用于测量凝血活性的方法在本领域内已知,包括将样品与血红细胞一同孵育,如WO2004/098533中所描述的。

[0163] 用于生产目的颗粒的宿主通常为其中不允许病毒蛋白质进行复制或感染所述细胞的宿主。在一个实施方式中,病毒蛋白质来源于不感染宿主细胞所来源的细胞种属的病毒。例如,在一个实施方式中,病毒种属感染哺乳动物细胞,表达系统使用植物宿主细胞。宿主细胞可经过修饰以提高目的颗粒的组装。宿主细胞可以经过修饰以包括蛋白质分子伴侣,其促进由表达的病毒蛋白质形成目的颗粒。在另一个实施方式中,宿主细胞经过修饰,包括抑制子蛋白质,这样可以更有效地调控衣壳的表达,以促进目的颗粒的调控性形成。

[0164] 宿主细胞包括细菌、酵母、藻类、昆虫、哺乳动物和植物细胞。

[0165] 在本发明的一些实施方式中,宿主细胞为农杆菌属的细菌宿主细胞,例如放射形农杆菌(*A. Radiobacter*)、发根农杆菌(*A. Rhizogenes*)以及悬钩子农杆菌(*A. Rubi*)。在本发明的一些实施方式中,细菌宿主细胞是节杆菌属,例如,金黄节杆菌(*A. Aurescens*)、柠檬色节杆菌(*A. Citreus*)、球状节杆菌(*A. Globiformis*)、裂烃谷氨酸(*A. Hydrocarboglutamicus*)、迈索尔节杆菌(*A. Mysorens*)、烟草节杆菌(*A. Nicotianae*)、石蜡节杆菌(*A. Paraffineus*)、*A. Protophoniae*、*A. Roseoparaffinus*、硫磺节杆菌(*A. Sulfureus*)以及产脲节杆菌(*A. Ureafaciens*)。在本发明的一些实施方式中,细菌宿主细胞为芽孢杆菌属的,例如,苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)、炭疽芽孢杆菌(*B. anthracis*)、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、缓慢芽孢杆菌(*B. Lentos*)、环状芽孢杆菌(*B. circulans*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、*B. Lautus*、凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)、坚强芽孢杆菌(*B. Firmus*)、*B. Alkaophilus*、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、克劳氏芽孢杆菌(*B. clausii*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)、耐盐嗜碱芽孢杆菌(*B. Halodurans*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。在具体的实施方式中,宿主细胞是工业芽孢杆菌菌株,包括但不限于枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌,解淀粉芽孢杆菌。在一些实施方式,细菌宿主细胞为梭状芽孢杆菌属,例如,丙酮丁醇梭菌(*C. acetobutylicum*)、破伤风梭菌(*C. tetani*)E88、*C. lituseburensis*, *C. Saccharobutylicum*、产气荚膜梭菌(*C. perfringens*)、拜季林斯基

梭菌(*C. Beijerinckii*)。在一些实施方式中,细菌宿主细胞为棒杆菌属,例如,谷氨酸棒杆菌(*C. Glutamicum*)和嗜乙酰乙酸棒杆菌(*C. Acetoacidophilum*)。在一些实施方式中,细菌宿主细胞是埃希氏菌属,如大肠杆菌(*E. Coli*)。在一些实施方式中,细菌宿主细胞为欧文氏菌属,例如,噬夏孢欧文氏菌(*E. Uredovora*)、软腐病欧文氏菌(*E. Carotovora*)、菠萝欧文氏菌(*E. Ananas*)、草生欧文氏菌(*E. Herbicola*)、斑点泛菌(*E. Punctata*)和草生欧文氏菌(*E. Terreus*)。在一些实施方式中,细菌宿主细胞为泛菌属(*Pantoea*),例如,柠檬假交替单胞菌(*P. Citrea*)和成团泛菌(*P. Agglomerans*)。在一些实施方式中,细菌宿主细胞为假单胞菌属(*Pseudomonas* genus),例如,恶臭假单胞菌(*P. Putida*),铜绿假单胞菌(*P. Aeruginosa*)和还原酶假单胞菌(*P. Mevalonii*)。在一些实施方式中,细菌宿主细胞为链球菌属(*Streptococcus* genus),例如,C型菌马链球菌(*S. Equisimiles*),化脓链球菌(*S. Pyogenes*),和乳房链球菌(*S. Uberis*)。在一些实施方式中,细菌宿主细胞为链霉菌属(*Streptomyces* genus),例如,生二素链霉菌(*S. Ambofaciens*)、不产色链霉菌(*S. Achromogenes*)、多拉菌素产生菌(*S. Avermitilis*)、天蓝色链霉菌(*S. Coelicolor*)、金霉素链霉菌(*S. Aureofaciens*)、金黄色葡萄球菌(*S. Aureus*)、杀真菌链霉菌(*S. Fungicidicus*)、灰色链霉菌(*S. Griseus*)和变铅青链霉菌(*S. Lividans*)。在一些实施方式中,细菌宿主细胞为发酵单胞菌属,例如运动发酵单胞菌(*Z. Mobilis*)和解脂发酵单胞菌(*Z. Lipolytica*)。因为重组蛋白质的产出具有快速、高效、便宜及丰富的潜在特质,所以将细菌视为生产目的颗粒如VLP的表达系统的宿主细胞。研究者已经表明,不含重组蛋白质插入片段的具体野生型病毒衣壳可在非热带肠杆菌中转基因表达。研究者还显示,这些衣壳可在体内和在体外进行组装,以形成目的颗粒——如VLP。

[0166] 酵母宿主细胞可以为以下酵母属的细胞,但不限于:假丝酵母(*Candida*),汉逊酵母(*Hansenula*)、出芽酵母(*Saccharomyces*)、裂殖酵母(*Schizosaccharomyces*)、毕赤酵母(*Pichia*)、克鲁维酵母(*Kluyveromyces*)和耶氏酵母(*Yarrowia*)。在本发明的一些实施方式中,酵母细胞为汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、卡氏酵母(*Saccaromyces carlsbergensis*)、糖化酵母(*Saccharomyces diastaticus*)、出芽酵母(*Saccharomyces norbensis*)、克鲁维酵母(*Saccharomyces kluyveri*)、裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、巴斯得毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、芬兰毕赤酵母(*Pichia finlandica*)、喜海藻糖毕赤酵母(*Pichia trehalophila*)、白神毕赤酵母(*Pichia kodamae*)、膜醭毕赤酵母(*Pichia membranaefaciens*)、有孢毕赤酵母(*Pichia opuntiae*)、耐热毕赤酵母(*Pichia thermotolerans*)、柳毕赤酵母(*Pichia salictaria*)、子囊座毕赤酵母(*Pichia quercuum*)、皮杰普毕赤酵母(*Pichia pijperi*)、树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)、甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)、安格斯毕赤酵母(*Pichia angusta*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、白假丝酵母(*Candida albicans*)、和固定化解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)。

[0167] 真菌宿主细胞可为以下属的细胞,但不限于:绵霉菌(*Achlya*)、顶头孢霉菌(*Acremonium*)、曲霉菌(*Aspergillus*)、茁芽短梗霉菌(*Aureobasidium*)、烟管菌(*Bjerkandera*)、白腐菌(*Ceriporiopsis*)、头孢霉菌(*Cephalosporium*)、金孢子菌(*Chrysosporium*)、旋孢霉菌(*Cochliobolus*)、棒囊菌(*Corynascus*)、栗疫

病菌(Cryphonectria)、隐球菌(Cryptococcus)、鸡腿菇菌(Coprinus)、色二孢菌(Coriolus)、壳囊孢菌(Diplodia)、镰刀菌(Endothia)、赤霉菌(Fusarium)、粘帚霉菌(Gibberella)、腐质霉菌(Gliocladium)、肉座菌(Humicola)、毁丝霉菌(Hypocrea)、毛霉菌(Myceliophthora)、链孢霉菌(Mucor)、青霉菌(Neurospora)、柄孢壳菌(Penicillium)、金黄射脉菌(Podospora)、单鞭毛菌(Phlebia), Piromyces)、稻瘟菌(Pyricularia)、寄生根黏菌(Rhizomucor)、孢根霉菌(Rhizopus)、裂褶菌(Schizophyllum)、顶孢微菌(Scytalidium)、申克孢子丝菌(Sporotrichum)、篮状菌(Talaromyces)、嗜热子囊菌(Thermoascus)、喜热菌(Thielavia)、栓菌(Trametes)、弯颈霉菌(Tolypocladium)、木霉菌(Trichoderma)、轮枝菌(Verticillium)、小包脚菇菌(Volvvariella), 或有性型菌或无性型菌, 以及其同义词或分类学等价物。

[0168] 在本发明的一些实施方式中, 宿主细胞为藻类细胞如衣藻(例如, 莱茵衣藻(C. Reinhardtii)) 和席藻属(P. sp. ATCC29409)。

[0169] 昆虫宿主细胞的实例包括Lepidoptera细胞系, 如草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda) (Sf9 或 Sf21) 或粉纹夜蛾(Trichoplusia ni) 细胞(High Five)。

[0170] 哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系(例如CHO-K1; ATCC CCL-61), 绿猴细胞系(COS)(例如COS1(ATCC CRL-1650), COS7(ATCC CRL-1651)); 小鼠细胞(例如NS/O), 幼仓鼠肾(BHK)细胞系(例如, ATCC CRL-1632 或 ATCC CCL-10), 以及人类细胞(例如HEK293(ATCC CRL-1573))。

[0171] 在一个实施方式中, 宿主为植物, 宿主细胞为植物细胞。植物细胞来源于植物, 或可来源于植物, 或其可为培养的植物细胞, 其是在植物之外培养的。因此, 在一个实施方式中, 植物为植物细胞——如在培养物中生长或在植物之外生长的植物细胞, 如体外生长植物细胞或细胞团块。所述植物的非限制性实例包括单子叶植物和双子叶植物, 例如作物, 观赏植物, 和非驯养或野生植物。其他实例包括具有商业或农业价值的植物, 如作物(尤其是用于人类食品或动物饲料的作物), 生产木材或纸浆的树木, 蔬菜植物, 水果植物以及观赏植物。

[0172] 所述植物的非限制性实例包括谷物作物(如小麦, 燕麦, 大麦, 玉米, 黑麦, 小黑麦, 大米, 小米, 高粱, 藜, 苋菜, 和荞麦); 牧草作物(如牧草和牧草双子叶植物, 包括野豌豆, 苜蓿, 紫花苜蓿, 等); 油籽作物(如棉花, 红花, 向日葵, 大豆, 油菜, 油菜籽, 亚麻, 花生以及油棕); 树坚果(如核桃, 腰果, 榛子, 山核桃, 杏仁, 等等); 甘蔗、椰子, 枣椰, 橄榄, 甜菜, 茶叶以及咖啡; 生产木材或木浆的树木; 蔬菜作物, 如豆类(例如, 大豆, 豌豆, 扁豆, 苜蓿, 花生), 莴苣, 芦笋, 洋葱, 芹菜, 胡萝卜, 萝卜, 芸苔属蔬菜(例如, 白菜, 羽衣甘蓝, 芥菜, 及其他叶类芸苔属蔬菜, 椰菜, 花椰菜, 孢子甘蓝, 芜菁甘蓝, 甘蓝), 瓜类(如黄瓜, 西瓜, 西葫芦, 笋瓜), 葱属植物(例如, 葱, 蒜, 韭菜, 大葱, 香葱), 茄科成员(例如, 西红柿, 茄子, 土豆, 辣椒, 地莓), 以及藜科成员(例如, 甜菜根, 甜菜, 菠菜, 藜, 苋菜); 水果作物, 如苹果, 梨, 柑橘类水果(如橙, 酸橙, 柠檬, 柚子, 以及其他), 核果(例如, 杏, 桃, 李子, 油桃), 香蕉, 菠萝, 葡萄, 猕猴桃, 木瓜, 鳄梨, 以及浆果; 以及观赏植物, 包括开花观赏植物, 观赏树木和灌木, 观赏性地被植物, 观赏草皮。双子叶植物的其他实例包括但不限于, 油菜, 棉花, 马铃薯, 藜, 苋菜, 荞麦, 红花, 大豆, 甜菜, 以及向日葵, 更合适地为大豆, 油菜, 和棉花。单子叶植物中的其他实例包括但不限于, 小麦, 燕麦, 大麦, 玉米, 黑麦, 黑小麦, 水稻, 观赏草皮和牧草, 高粱, 小米, 和甘

蔗。作为重组蛋白质生产宿主的植物包含独特的一组污染物,其可在目的颗粒的捕获和纯化中移除。进一步地,需要在提取后早期移除的植物固体物一般比传统细菌和哺乳动物细胞培养物碎片浓度更高、大小范围更广,并且密度更大。典型的植物加工和纯化流程由以下步骤构成:分离含有重组蛋白质的植物组织、组织级分,并同时减小颗粒大小、将靶标蛋白质萃取入水溶液介质、对粗提取物进行澄清,以及最后对产物进行纯化。因此,从植物细胞中对目的颗粒的捕获过程的改进对总体生产成本产生有助的影响。

[0173] 适合用于本发明的植物材料可以为单子叶植物或双子叶植物或植物细胞系统,或来源于单子叶植物或双子叶植物或植物细胞系统,包括来自以下家族之一的种属:爵床科(Acanthaceae)、葱科(Alliaceae)、百合水仙科(Alstroemeriaceae)、石蒜科(Amaryllidaceae)、夹竹桃科,棕榈科(Arecaceae)、菊科(Asteraceae)、小檗科(Berberidaceae)、胭脂树科(Bixaceae)、十字花科(Brassicaceae)、凤梨科(Bromeliaceae)、大麻科(Cannabaceae)、石竹科(Caryophyllaceae)、三尖杉科(Cephalotaxaceae)、藜科(Chenopodiaceae)、秋水仙科(Colchicaceae)、葫芦科(Cucurbitaceae)、薯蓣科(Dioscoreaceae)、麻黄科(Ephedraceae)、古柯科(Erythroxyllaceae)、大戟科(Euphorbiaceae)、豆科(Fabaceae)、唇形科(Lamiaceae)、亚麻科(Linaceae)、石松科(Lycopodiaceae)、锦葵科(Malvaceae)、黑药花科(Melanthiaceae)、芭蕉科(Musaceae)、桃金娘科(Myrtaceae)、珙桐科(Nyssaceae)、罂粟科(Papaveraceae)、松科(Pinaceae)、车前草科(Plantaginaceae)、禾本科(Poaceae)、蔷薇科(Rosaceae)、茜草科(Rubiaceae)、杨柳科(Salicaceae)、无患子科(Sapindaceae)、茄科(Solanaceae)、红豆杉科(Taxaceae)、山茶科(Theaceae)或葡萄科(Vitaceae)。

[0174] 合适的种属可包括以下属:金花、冷杉、槭树、翦股颖、葱、六出花、菠萝、穿心莲、须芒草、蒿、芦竹、颠茄、小檗、Beta、红木属、芸薹属、山茶、喜树、大麻、辣椒、红花、长春花、三尖杉、菊花、金鸡纳、西瓜、咖啡、秋水仙、彩叶草、黄瓜、南瓜、狗牙根、曼陀罗、石竹、洋地黄、黄药、山药、油棕、麻黄、蔗茅属、古柯属、桉树、羊茅、草莓、雪花莲、大豆、棉花、向日葵、三叶橡胶、大麦、黑麦草、天仙子、莴苣、小桐子、亚麻、羽扇豆、番茄、石松、木薯、苜蓿、薄荷、芒草、香蕉、烟草、水稻、黍、罂粟、银胶菊、狼尾草、矮牵牛、法拉里斯、猫尾、五针松、早熟禾、一品红、龙胡杨、萝芙木、蓖麻、罗莎、甘蔗、沙柳、血根草、莨菪、黑麦、高粱、互花米草、菠菜属、菊蒿、红豆杉、可可、小黑麦、小麦、北美穗草属、藜芦、长春花属、葡萄、玉米。

[0175] 合适的种属可包括黍属、高粱属、芒草属、甘蔗属、斑菌、杨树菌、东方被大须芒草(大须芒草)、狗尾草(大象草)、草芦(利甘草)、狗牙根(百慕大草)、高羊茅(牛尾草)、草原网茅(草原索草)、紫花苜蓿(苜蓿)、芦竹(巨头芦苇)、黑麦(裸麦)、柳属(杨柳)、桉树属(桉树)、小黑麦(小麦-小麦、times. 裸麦)、竹、向日葵(向日葵)、红花(红花)、小桐子(麻疯树)、蓖麻(蓖麻)、油棕(棕榈)、亚麻(亚麻)、芥菜、甜菜属(甜菜)、木薯(木薯)、番茄(西红柿)、莴苣(生菜)、粉芭蕉(香蕉)、马铃薯(土豆)、甘蓝(西兰花、菜花、布鲁塞尔豆芽)、茶树(茶)、草莓(草莓)、可可(可可)、小粒咖啡(咖啡)、酿酒葡萄(葡萄)、菠萝(凤梨)、辣椒(辣椒和甜椒)、洋葱(洋葱)、甜瓜(哈密瓜)、黄瓜(黄瓜)、笋瓜(南瓜)、南瓜(南瓜)、菠菜(菠菜)、西瓜(西瓜)、黄秋葵(秋葵)、茄子(茄子)、蔷薇属(玫瑰)、香石竹(康乃馨)、矮牵牛属(矮牵牛)、一品红(一品红)、白羽扇豆(羽扇豆)、海滨燕麦草(燕麦)、翦股颖(翦股颖属)、颤杨(白杨)、松属(松树)、冷杉属(冷杉)、槭属(枫木)、大麦(青稞)、草地早熟禾(兰草)、黑麦草属(黑麦草)和猫尾草

(提摩太)、柳枝稷(柳枝)、高粱(高粱、苏丹草)、芒草竹材(芒草)、甘蔗属(能源甘蔗)、胡杨(杨树)、玉米(玉米)、大豆(大豆)、油菜(油菜籽)、小麦(小麦)、棉花(棉花)、水稻(大米)、向日葵(向日葵)、紫花苜蓿(苜蓿)、甜菜(甜菜)、或灰绿狼尾草(珍珠粟)。

[0176] 植物材料可为天然发生的、突变体的、非天然发生的或转基因的烟草植物,或可来源于所述植物,包括以烟草属、多种烟草种属的植物,包括本氏烟草 (*N. benthamiana*) 和普通烟草 (*N. tabacum*) (例如, LA B21, LN KY171, TI1406, Basma, Galpao, Perique, Beinhart1000-1, 和 Petico)。其他种属包括无茎烟草 (*N. Acaulis*)、渐尖叶烟草 (*N. acuminata*)、多花种尖叶烟草 (*N. acuminata* var. *Multiflora*)、非洲烟草 (*N. africana*)、花烟草 (*N. alata*)、抱茎烟草 (*N. amplexicaulis*)、阿伦特氏烟草 (*N. arentsii*)、渐狭叶烟草 (*N. attenuata*)、贝纳末特氏烟草 (*N. benavidesii*)、黄花烟草 (*N. rustica*)、海蓬子烟草 (*N. bigelovii*)、博内里烟草 (*N. bonariensis*)、洞生烟草 (*N. cavicola*)、克利夫兰烟草 (*N. clevelandii*)、落葵烟草 (*N. cordifolia*)、伞床烟草 (*N. corymbosa*)、迪勃纳氏烟草 (*N. debneyi*)、高烟草 (*N. excelsior*)、福氏烟草 (*N. forgetiana*)、香烟草 (*N. fragrans*)、粉蓝烟草 (*N. glauca*)、粘烟草 (*N. glutinosa*)、古德斯比氏烟草 (*N. goodspeedii*)、哥西氏烟草 (*N. gossei*)、杂种花叶烟草 (*N. hybrid*)、因古儿巴烟草 (*N. ingulba*)、格氏栲烟草 (*N. kawakamii*)、奈特氏烟草 (*N. knightiana*)、朗氏烟草 (*N. langsdorffii*)、狭叶烟草 (*N. linearis*)、长花烟草 (*N. longiflora*)、(*N. maritima*)、麦格隆熄丰烟草 (*N. megalosiphon*)、摩西氏烟草 (*N. miersii*)、圆锤烟草 (*N. noctiflora*)、裸茎烟草 (*N. nudicaulis*)、欧布特斯烟草 (*N. obtusifolia*)、西方烟草 (*N. occidentalis*)、偏斜西方烟草 (*N. occidentalis* subsp. *hesperis*)、耳状烟草 (*N. otophora*)、圆锥烟草 (*N. paniculata*)、少花烟草 (*N. pauciflora*)、碧冬烟 (*N. petunioides*)、皱叶烟草 (*N. plumbaginifolia*)、夸德瑞伍氏烟草 (*N. quadrivalvis*)、雷蒙德氏烟草 (*N. raimondii*)、残波烟草 (*N. repanda*)、莲座叶烟草 (*N. rosulata*)、莲座叶亚因古儿巴烟草 (*N. rosulata* subsp. *ingulba*)、蓝铃草烟草 (*N. rotundifolia*)、赛特氏烟草 (*N. setchellii*)、拟似烟草 (*N. simulans*)、茄叶烟草 (*N. solanifolia*)、斯佩格茨烟草 (*N. spegazzinii*)、斯托克通氏烟草 (*N. stocktonii*)、香花烟草 (*N. suaveolens*)、林烟草 (*N. sylvestris*)、红花烟草 (*N. Tabacum*)、唐印烟草 (*N. thyrsiflora*)、绒毛烟草 (*N. tomentosa*)、绒毛状烟草 (*N. tomentosiformis*)、狭烟草 (*N. trigonophylla*)、蕨叶烟草 (*N. umbratica*)、波叶烟草 (*N. undulata*)、天鹅绒烟草 (*N. velutina*)、芹叶烟草 (*N. wigandioides*)、和桑德烟草 (*N. xsanderae*)。

[0177] 来自或来源于栽培种或精英栽培种的植物材料的用途也包含在内。所述变种或栽培种的非限制性实例为:BD64, CC101, CC200, CC27, CC301, CC400, CC500, CC600, CC700, CC800, CC900, Coker176, Coker319, Coker371Gold, Coker48, CD263, Denzizli, DF911, Galpao 烟草, GL26H, GL350, GL600, GL737, GL939, GL973, HB04P, K149, K326, K346, K358, K394, K399, K730, KDH959, KT200, KT204LC, KY10, KY14, KY160, KY17, KY171, KY907, KY907LC, KTY14xL8LC, Karabaglar, Little Crittenden, McNair373, McNair944, msKY14xL8, Narrow Leaf Madole, NC100, NC102, NC2000, NC291, NC297, NC299, NC3, NC4, NC5, NC6, NC7, NC606, NC71, NC72, NC810, NC BH129, NC2002, Neal Smith Madole, OXF OR D207, 'Perique' 烟草, PVH03, PVH09, PVH19, PVH50, PVH51, R610, R630, R7-11, R7-12, RG17, RG81, RG H51,

RGH4、RGH51、RS1410、Speight168、Speight172、Speight179、Speight210、Speight220、Speight225、Speight227、Speight234、Speight G-28、Speight G-70、Speight H-6、Speight H20、Speight NF3、TI1406、TI1269、TN86、TN86LC、TN90、TN97、TN97LC、TN D94、TN D950、TR(Tom Rosson)Madole、Turkish Samson、VA309、VA359、DAC、Mata、Fina、P02、BY-64、AS44、RG17、RG8、HB04P、Basma Xanthi BX2A、Coker319、Hicks、McNair944(MN944)、Burley21、K149、Yaka JB125/3、Kasturi Mawar、NC297、Coker371Gold、P02、Wislica、Simmaba、Turkish Samsun、AA37-1、B13P、BU21x Hoja Parado 系 97 杂交的 F4、Samsun 或 P01。普通烟草栽培种的非限制性实例为 AA37-1、B13P、Xanthi(Mitchell-Mor)、KTRD#3Hybrid107、Bel-W3、79-615、Samsun Holmes NN、KTRDC#2Hybrid49、KTRDC#4Hybrid110、Burley21、BY-64、KTRDC#5KY160SI、KTRDC#7FCA、KTRDC#6TN86SI、Coker371Gold、K149、K326、K346、K358、K394、K399、K730、KY10、KY14、KY160、KY17、KY8959、KY9、KY907、MD609、McNair373、NC2000、PG01、PG04、M066、P01、P02、P03、RG11、RG17、RG8、SpeightG-28、TN86、TN90、VA509、AS44、Banket A1、Basma DramaB84/31、Basma I Zichna ZP4/B、Basma Xanthi BX2A、Batek、Besuki Jember、C104、Coker319、Coker347、Criollo Misionero、DAC Mata Fina、Delcrest、Djebel181、DVH405、**Galpão Comum**、HB04P、Hicks Broadleaf、Kabakulak Ellassona、Kasturi Mawar、Kutsage E1、KY14xL8、KY171、LA BU21、McNair944、NC2326、NC71、NC297、NC3、PVH03、PVH09、PVH19、PVH2110、Red Russian、Samsun、Saplak、Simmaba、Talgar28、Turkish Samsun、Wislica、Yayaldag、NC4、TR Madole、Prilep HC-72、Prilep P23、Prilep PB156/1、Prilep P12-2/1、Yaka JK-48、Yaka JB125/3、TI-1068、KDH-960、TI-1070、TW136、Samsun NN、Izmir、Basma、TKF4028、L8、TKF2002、TN90、GR141、Basma xanthi、GR149、GR153、Petit Havana 或 Xanthi NN。

[0178] 瞬时表达系统尤其适合于生成用于本发明方法的植物。合适地，所述瞬时表达系统可用于多种烟草种属及普通烟草变种，其包括通过本领域已知物理方法(例如，施加真空，或大于大气压的压力)将遗传工程改造的根瘤农杆菌的悬液浸润到完整植物的叶子中，这依赖农杆菌将编码目的蛋白质的核酸分子(一般为能在农杆菌中复制的表达构建体)转移至植物细胞的能力。所述表达构建体在浸润的植物细胞中的拷贝数高于用于生成转基因植物所使用的拷贝数。用于生成本发明所使用的植物的瞬时表达方法的特征在于，不要求将表达构建体整合入植物基因组，虽然农杆菌的浸润可能导致整合发生。因此，大多数浸润的植物细胞不包含含有整合的表达构建体的基因组，而且瞬时表达也不要求表达构建体向子代植物中的转移。通常，在浸润后的 2-15 天，或合适地，在 4-6 天后，重组蛋白质在浸润的植物细胞中累积并形成病毒样颗粒。可在此时收获生物质，特别是收集浸润的叶子，并加工以分离颗粒。因此，植物材料可来源于瞬时表达存在于病毒样颗粒中的蛋白质的植物(如本氏烟草和普通烟草的变种)，合适地，其来源于用包含编码所述蛋白质并使得所述蛋白质能在浸润的植物细胞中瞬时表达的表达构建体的农杆菌细胞浸润的植物。

[0179] 植物材料用作进料提出了另外的挑战，因为其固体含量很高，例如，含量超过 5%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%w/w。进料可含有高浓度的比细胞培养物上清液中可见的那些材料大的材料，例如，目的颗粒大小范围为 10E-4 到 10E-2、10E-4 到 10E-1、10E-3 到 10E-1、10E-4 到 1mm、10E-3 到 1mm 或 10E-2 到 1mm。进料为化学复合物，其

通常含有脂质、淀粉、木质素、酚类化合物及色素。植物中重组蛋白的产出相对细胞培养物较低,这要求加样时使用更高体积的进料。

[0180] 如果混合物为植物或来源于植物,则其可为植物汁液提取物的形式。如本文所使用的,术语“植物汁液提取物”指的是来源于植物的包含有叶绿素的液体材料。植物汁液提取物可为经调整的植物汁液提取物。

[0181] 技术人员会理解,目的蛋白质可包含在一种或多种目的颗粒之内,在一些实施方式中,需要从目的颗粒中分离或纯化目的蛋白质。因此,本文描述的方法包括一个可选的进一步的步骤——从目的颗粒中纯化蛋白质。因此,可通过本领域熟知的标准技术纯化包含在目的颗粒之内的目的蛋白质至基本上纯净,包括但不限于硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱、镍色谱、羟基磷灰石色谱,反相色谱,凝集素层析,制备性电泳,去垢剂溶解、用柱色谱相同的物质进行选择性的沉淀、免疫纯化方法,等等。例如,已经有确认的分子粘附特性的分子可以可逆地融合至配体。对于合适的配体,可将蛋白质选择性地吸附至纯化柱,然后使其以相对纯净的形式从柱上释放。此外,可使用免疫亲和柱子或 Ni-NTA 柱子纯化蛋白质。

[0182] 还要理解,本发明的方法可包括加工材料的其他步骤,可以在接触膨胀床之前或之后进行。因此,本文描述的方法可包括其他的上游或下游加工步骤。因此,在一个实施方式中,该方法包括在与膨胀床接触之前或之后处理材料的可选的进一步步骤。在另一个实施方式中,该方法包括在目的颗粒从吸附剂上洗脱后立即对其处理的可选的进一步步骤。因此,例如,可对材料材料进行硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱、镍色谱、羟基磷灰石色谱、反相色谱、凝集素色谱、制备性电泳、用柱色谱相同的物质进行选择性的沉淀、免疫纯化方法、过滤、微滤、离心、倾析或沉积,或前述过程的组合。

[0183] “阳离子交换色谱”是带负电的,具有可与经过或穿过吸附剂或固相的水溶液中阳离子交换的游离阳离子。可使用任何带负电的适合形成阳离子交换树脂的配体,例如,羧酸盐、磺酸盐及下文描述的其他配体。商业可得的阳离子交换树脂包括但不限于,例如具有基于磺酸基团的配体(例如, MonoS, MiniS, Source15S 和 30S, SP Sepharose Fast Flow™, SP Sepharose High Performance (来自 GE Healthcare), Toyopearl SP-650S 和 SP-650M (来自 Tosoh), Macro-Prep High S (来自 BioRad), Ceramic HyperD S, Trisacryl M 和 LS SP 以及 Spherodex LS SP (来自 Pall Technologies));具有基于磺乙基基团的配体(例如, Fractogel SE (来自 EMD)、Poros S-10 和 S-20 (来自 Applied Biosystems));具有基于磺丙基基团的配体(例如, TSK Gel SP5PW 和 SP-5PW-HR (来自 Tosoh), Poros HS-20 和 HS50 (来自 Applied Biosystems));具有基于磺异丁基基团的配体(例如, (Fractogel EMD SO₃” (来自 EMD));具有基于磺乙基基团的配体(例如, SE52、SE53 和 Express-Ion S (来自 Whatman)), 具有基于羧甲基基团的配体(例如, CM Sepharose Fast Flow (来自 GE Healthcare), Hydrocell CM (来自 Biochrom Labs Inc.), Macro-Prep CM (来自 BioRad), Ceramic HyperD CM, Trisacryl M CM, Trisacryl LS CM (来自 Pall Technologies), Matrx Cellufme C500 和 C200 (来自 Millipore), CM52, CM32, CM23 和 Express-Ion C (来自 Whatman), Toyopearl CM-650S, CM-650M 和 CM-650C (来自 Tosoh));基于磺酸和羧酸的基团的配体(例如, BAKEPVBOND Carboxy-Sulfon (来自 J. T. Baker));基于羧酸的基团

的配体(例如, WP CBX(来自 J. TBaker), DOWEX MAC-3(来自 Dow Liquid Separations), Amberlite Weak Cation Exchangers, DOWEX Weak Cation Exchanger 和 Diaion Weak Cation Exchangers(来自 Sigma-Aldrich)以及 Fractogel EMD C00-(来自 EMD)); 具有基于磺酸的基团的配体(例如, Hydrocell SP(来自 Biochrom Labs Inc.), DOWEX Fine Mesh Strong Acid Cation Resin(来自 Dow Liquid Separations), UNOsphere S, WP Sulfonic(来自 J. T. Baker), Sartobind S膜(来自 Sartorius), Amberlite Strong Cation Exchangers, DOWEX Strong Cation 和 Diaion Strong Cation Exchanger(来自 Sigma-Aldrich)); 以及基于正磷酸的基团的配体(例如, P11(来自 Whatman))。

[0184] “阴离子交换树脂”是带正电的,因此具有与其连接的一个或多个带正电的配体。可使用任何连接于吸附剂或固相的适合形成阴离子交换树脂的带正电配体,如季铵基团。商业可得的阴离子交换树脂包括 DEAE 纤维素, Poros PI20, PI50, HQ10, HQ20, HQ50, D50(来自 Applied Biosystems), Sartobind Q(来自 Sartorius), MonoQ, MiniQ, Source15Q 和 30Q, Q, DEAE 及 ANX Sepharose Fast Flow, 高效 Q Sepharose, QAE SEPHADEX™和 FAST Q SEPHAROSE™(GE Healthcare), WP PEI, WP DEAM, WP QUAT(来自 J. T. Baker), Hydrocell DEAE 和 Hydrocell QA(来自 Biochrom Labs Inc.), UNOsphere Q, Macro-Prep DEAE 和 Macro-Prep High Q(来自 Biorad), Ceramic HyperD Q, ceramic HyperD DEAE, Trisacryl M 和 LS DEAE, Spherodex LS DEAE, QMA Spherosil LS, QMA Spherosil M 和 Mustang Q(来自 Pall Technologies), DOWEX Fine Mesh Strong Base I 型和 II 型阴离子树脂以及 DOWEX MONOSPHER E77, 弱碱性阴离子树脂(来自 Dow Liquid Separations), Intercept Q membrane, Matrex Cellufme A200, A500, Q500 及 Q800(来自 Millipore), Fractogel EMD TMAE, Fractogel EMD DEAE 和 Fractogel EMD DMAE(来自 EMD), Amberlite I 型和 II 型弱 / 强阴离子交换剂, DOWEX I 型和 II 型弱 / 强阴离子交换剂, Diaion I 型和 II 型弱 / 强阴离子交换剂, Duolite(来自 Sigma-Aldrich), TSK gel Q 和 DEAE5PW 及 5PW-HR, Toyopearl SuperQ-650S, 650M 和 650C, QAE-550C 和 650S, DEAE-650M 和 650C(来自 Tosoh), QA52, DE23, DE32, DE51, DE52, DE53, Express-Ion D 和 Express-Ion Q(来自 Whatman)。

[0185] 亲硫色谱的应用也包含在内,也称为亲硫吸附色谱。术语“亲硫”指代蛋白质对紧挨硫醚基的磺基基团具有选择性。这是一种非亲和的色谱类型,其中含有亲硫区域和芳族氨基残基的目的蛋白质结合于含有硫磺的配体,这样蛋白质可以得到分离。亲硫凝胶可通过用 β -巯基乙醇还原二乙烯砷(偶联于 Sepharose4B)而制备。亲硫吸附色谱是基于电子的供体-受体特性,与基于疏水性的色谱不同。对于亲硫吸附剂,并不发生疏水结合及离子相互作用,因为硫代乙基砷结构不具有显著的疏水性或离子电荷。商业可得的亲硫色谱的实例包括 Fractogel EMD TA(Merck; Rahway, NJ), Uniflow and Superflow 树脂(Clontech) 和 T-Gel(Pierce)。

[0186] 术语“亲和色谱”指代一种分离技术,其中目的蛋白质可逆、特异地结合于生物学特异性配体,其中通常组合有空间互补作用和一种或多种类型的相互作用,例如:结合位点处的静电力、氢键作用、疏水力以及范德华力。这些相互作用并非由于分子间的通用特性,如等电点、疏水性或大小,而是由于目的蛋白质和配体之间有特异相互作用,例如,免疫球蛋白结合于表位、蛋白质 A 结合于免疫球蛋白、生物反应调节子和其细胞表面受体之间的相互作用。在很多情况下,生物学特异配体还可以是能固定化于固相(如柱子)的蛋白质或

多肽。

[0187] “混合模式离子交换树脂”也包括在本文中,指代用阳离子、阴离子或疏水部分共价修饰的固相。混合模式离子交换树脂包括 BAKERBOND ABX™(J. T. Baker;Phillipsburg,NJ)、I 和 II 型陶瓷羟磷灰石以及含氟羟磷灰石(BioRad;Hercules, CA) 以及 MEP 和 MBI HyperCel(Pall Corporation;East Hills, NY)。

[0188] 术语“疏水性电荷诱导色谱”(或“HCIC”)是一种混合模式色谱过程的类型,其中混合物中目的蛋白质在未添加盐时(例如致溶盐类)通过中等疏水相互作用结合于可离子化的配体。混合模式指代用于结合的一种模式和用于洗脱的另一种模式,例如,用于 HCIC 的固相含有的配体具有亲疏效应(即,利用了亲疏色谱的特性)、疏水性和可离子化基团的组合特性,这些都有助于其的分离能力。因此,本发明的方法中使用的吸附剂含有可离子化的配体,所述配体在中性(生理条件)或轻微酸性的 pH 下(例如大约 pH5-10,优选地大约 pH6-9.5)是中度疏水的。在这个 pH 范围中,配体主要是不带电的,并通过中度的非特异性疏水相互作用结合目的蛋白质。当 pH 下降时,配体获得电荷,pH 变化导致的对溶质的静电荷排斥破坏疏水结合。用于 HCIC 的合适配体的实例包括任何可离子化的芳族或杂环结构(例如、具有吡啶环的结构、如 2-氨基甲基吡啶、3-氨基甲基吡啶和 4-氨基甲基吡啶、2-巯基吡啶、4-巯基吡啶或 4-硫醇基-乙基吡啶)、巯基酸、巯基醇、巯基甲基咪唑、2-巯基苯并咪唑、氨基苯并咪唑、组胺、巯基苯并咪唑、二甲基丙二胺、氨基丙基吗啉、氨基丙基咪唑、氨基己酸、羟基硝基苯甲酸、硝基酪氨酸/乙醇胺、二氯水杨酸、二溴酪胺、氯羟基苯乙酸、羟基苯乙酸、酪胺、苯硫酚、谷胱甘肽、硫酸氢盐、以及染料、还包括其衍生物。

[0189] 在目的颗粒中表达的一种或多种蛋白质可具有其序列所来源的原生蛋白质的特异活性的至少 20%、30% 或 40%, 合适地具有所述活性的至少 50%、60% 或 70%, 最合适地为至少 80%、90% 或 95%。进一步地,其底物特异性 (k_{cat}/K_m) 可选地与原生蛋白质基本上类似。通常, k_{cat}/K_m 为原生蛋白质的至少 30%、40% 和 50%;更合适地为至少 60%、70%、80% 或 90%。对蛋白质和蛋白质活性以及底物特异性 (k_{cat}/K_m) 的测定和定量的方法对本领域技术人员是熟知的。

[0190] 可将重组蛋白质的活性与先前确定的原生蛋白质的标准活性相比较。备选地,重组蛋白质的活性可以在与原生蛋白质同时或基本上同时的竞争性测定中得到确定。例如,体外测定可用于确定重组蛋白质和靶标之间的任何可检测的相互作用,例如在表达的酶和底物之间、在表达的激素和激素受体之间、在表达的抗体和抗原之间,等等。这样的检测可包括对热量变化、增殖变化、细胞死亡、细胞排斥、放射性变化、溶解性变化、分子量变化的测量,可通过凝胶电泳或凝胶排除方法、磷酸化能力、抗体特异性测定如 ELISA 测定等等进行测量。此外,体内测定包括但不限于这些测定法,其检测所产生的蛋白质相比原生蛋白质的生理学效应,例如对免疫应答或炎症的诱导情况。通常,任何体外或体内测定都可用于确定目的颗粒的活性特质。备选地,可测定本发明生产的蛋白质刺激或抑制蛋白质和正常与所述蛋白质相互作用的分子间的相互作用的能力,所述蛋白质为例如底物。所述测定法通常可包括将蛋白质与底物分子在允许其相互作用的条件下组合,并检测所述相互作用的生化结果的步骤。

[0191] 如果所表达的蛋白质是作为不可溶蛋白质表达的,则可经过复性或重新折叠生成二级和四级蛋白质结构构象。如有必要,可使用蛋白质重折叠步骤以完成重组产物的构象。

重折叠和复性可使用本领域已知试剂完成,以促进蛋白质的解离/结合。例如,可将蛋白质与二硫苏糖醇一同孵育,随后与氧化谷胱甘肽二钠盐孵育,其后与含有重折叠试剂如尿素的缓冲液一同孵育。

[0192] 重组蛋白质还可通过例如在磷酸缓冲液(PBS)或加有 200mM NaCl 的 50mM 乙酸钠(pH6)缓冲液中透析得到复性。备选地,蛋白质在固定化于柱子(例如 Ni NTA 柱子)上的时候也可进行重折叠,其中使用线性梯度为 6M-1M 的尿素,溶于含有蛋白酶抑制剂的 500mM NaCl、20% 甘油、20mM Tris/HCl(pH7.4)的缓冲液中。复性过程可进行 1.5 小时或更久。复性后,可添加 250mM 的咪唑洗脱蛋白质。可通过对磷酸缓冲液(PBS)或加有 200mM NaCl 的 50mM 乙酸钠(pH6)缓冲液进行最后的透析步骤以移除咪唑。纯化的蛋白可储存于 4℃,或冷冻于 -80℃。

[0193] 可通过与可选的药物可接受载体、辅料或稳定剂(见 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))相混合,将根据本发明获得或可根据本发明获得的具有所需的纯度的目的颗粒制备成冻干制剂或水溶液的制剂进行储存。可接受载体、辅料或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接收者是无毒的,其包括缓冲液如磷酸、柠檬酸及其他有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯基、丁基或苄基醇;烷基对羟基苯甲酸酯,如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;以及 m-甲酚);低分子量多肽(少于大约 10 个残基);蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;疏水多聚体如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖,以及其他的碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如 EDTA;糖类,例如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;盐形成抗衡离子,例如钠;金属复合物(例如锌-蛋白质复合物);或非离子表面活性剂如 TWEEN™, PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0194] 本发明将在以下实施例中进行进一步描述,以下实施例不意欲限制权利要求中描述的本发明的范围。

实施例

[0195] 提供以下实施例进行阐述,但不限制于此。除非另有指出,本发明采用的都是生物化学、分子生物学和植物生物学的常规技术和方法。

[0196] 实施例 1. 流感病毒样颗粒在本氏烟草中的瞬时表达

[0197] 如 D' Aoust, M. -A., Lavoie, P. -O., Couture, M. M. -J., **Trépanier, S.**, Guay, J. -M., Dargis, M., Mongrand, S., Landry, N., Ward, B. J., **Vézina, L. -P** 所描述的,在本氏烟草植物中生产流感病毒样颗粒。由本氏烟草中瞬时表达生产的流感病毒样颗粒诱导针对致死性病毒攻击的保护性免疫应答。Plant Biotechnology Journal 6 (2008) 930-940。

[0198] 实施例 2. 血凝素的检测

[0199] 如 W02004/098533 中所描述的,将样品与血红细胞一同孵育,测量血细胞凝集情况。使用标准方法进行 ELISA,检测血凝素蛋白质。使用来自 Immunetech 的兔的抗 -H5 抗体(目录号 IT-003-005V)和来自 Jackson 的辣根过氧化物酶标记的二抗(目录号 11-035-046)检测血凝素 H5 蛋白质。

[0200] 实施例 3. 本氏烟草的提取

[0201] 如实施例 1 中所描述的,通过 D' Aoust 等人(2008,见上文)的方法浸润本氏烟草植物,将浸润后的植物在温室中孵育 6 天并收获。在收获叶子时,将生物质在避光条件下于 4℃ 过夜,使用螺旋压榨机 (Vincent CP-4) 在 15-20Kg/hr 下进行均质化,锥体施加的压力为至少 45-psi。收集绿汁提取物,并将焦亚硫酸钠加入绿汁,达到终浓度为 10mM。测量电导率,必要时在用于捕获实验前用水对提取物进行稀释。

[0202] 实施例 4. 用于结合来自植物汁液提取物中病毒样颗粒的配体

[0203] 如实施例 3 中所描述的,使用螺旋压榨机获得含有血凝素 H5 病毒样颗粒的本氏烟草绿汁提取物 (D' Aoust 等人, (2008), 见上文)。用去离子水将所述绿汁提取物稀释 5 倍,最终 pH 为 7,测量电导率。电导率为 5.6mS/cm。测试四种不同配体的结合情况:二乙氨基乙基 (DEAE) 离子交换剂、葡聚糖基的 DEAE 离子交换剂、葡聚糖基的 2- 氯甲基苯并咪唑和葡聚糖基的 1-(2- 氯乙基) 哌啶盐酸盐配体。所使用的多种吸附剂对样品的比率为 1:5。静止模式中批式孵育后,收集上清液,并根据实施例 2 的步骤测量凝血活性。

[0204] 结果。与 DEAE、葡聚糖基的 DEAE、葡聚糖基的 2- 氯甲基苯并咪唑和葡聚糖基的 1-(2- 氯乙基) 哌啶盐酸盐的配体一同孵育,使用血凝测定法测量的上清中以及结合于配体的血凝素的量在表 1 中给出。在此实验中,植物绿汁提取物中包含血凝素的病毒样颗粒对 DEAE 基的离子交换吸附剂的结合最好。

[0205] 表 1. 多种吸附剂对含有血凝素病毒样颗粒的绿汁提取物的比率,以及静态模式下,上清液和已结合材料在提取物与多种吸附剂一同孵育时检测的血凝活性(起始提取物%)。

[0206]

配体	比率	凝血活性(起始提取物%)	
		上清	已结合
DEAE	1:5	13	87
葡聚糖基的 DEAE	1:5	13	87
葡聚糖基的 2-氯甲基苯并咪唑	1:5	67	33
葡聚糖基的 1-(2-氯乙基) 哌啶盐酸盐	1:5	67	33

[0207] 实施例 5. 电导率对与 DEAE 离子交换剂结合的影响

[0208] 测量根据实施例 1 和 3 的描述获得的含有血凝素 H5 的病毒样颗粒的绿汁提取物的电导率对病毒样颗粒与 DEAE 配体在静止结合模式下的结合的影响,以研究绿汁提取物中病毒样颗粒的电导率有多高时仍能结合于 DEAE 离子交换剂。

[0209] 以 5 倍床体积的 0.5M Tris/HCl (pH7) 缓冲液平衡 DEAE 离子交换剂,之后用 10 倍床体积的 2mM NaCl (pH7) 缓冲液进行平衡。用去离子水将绿汁提取物稀释 2.5、3、3.4、4、5、6 和 7 倍,并将 pH 调整至 7。测量多种稀释的绿汁提取物的电导率,在静态结合 / 批式模式下将提取物与 DEAE 离子交换剂一同孵育 2h。表 2 中给出了多种电导率值。每种电导率值下对应未稀释提取物的比率为 1:1。在批式孵育后,收集上清液并根据实施例 2 的方法测量凝血活性。在此实验中,绿汁提取物中的病毒样颗粒的结合在低的和高的电导率下效率相同,在高倍稀释或低倍稀释的绿汁提取物中也相同。

[0210] 表 2. 静态模式中,在绿汁提取物的不同电导率下血凝素对 DEAE 离子交换剂的结

合情况。

[0211]

稀释度	电导率(mS/cm)	血凝活性 (%)	
		上清	已结合
7	3.52	9	91
6	4.51	9	91
5	5.47	9	91
4	6.34	9	91
3.4	7.04	9	91
3	8.31	9	91
2.5	9.41	9	91

[0212] 实施例 6. 对植物来源的病毒样颗粒的两步捕获过程

[0213] 两步过程。根据实施例 3 中描述的方法获得的植物绿汁提取物使用了预捕获步骤,因为提取物,尤其是提取物中任何引起绿色的材料粘到大多数配体中并引起柱子的结块和堵塞。因此,对植物来源的病毒样颗粒建立了两步捕获过程,所述过程包括:

[0214] 步骤 1, 在静态结合 / 批式孵育模式中,使杂质及决定植物绿汁提取物中绿色的材料结合于聚乙烯亚胺(PEI)离子交换剂(平均颗粒大小为 150 μ m, pH 为 7);

[0215] 步骤 2, 以膨胀床吸附模式使用 DEAE 离子交换剂(平均颗粒大小为 50 μ m, pH 为 7)结合自步骤 1 的上清液中的病毒样颗粒。

[0216] 实验安排。在使用前,对实施例 3 所述获得的本氏烟草提取物进行过滤并用去离子水稀释 5 倍。最终 pH 为 7,用于步骤 1 中孵育的总体积为 150mL。电导率为 5.3mS/cm。以 5 倍床体积的 0.5M Tris/HCl(pH7)缓冲液,之后用 10 倍床体积的 10mM Tris/HCl(pH7.0)的缓冲液对 PEI 离子交换剂进行平衡。静态模式下,PEI 吸附剂对绿汁提取物的比率为 1:15。使用的 PEI 吸附剂总体积为 9.5mL。在室温下孵育 30min,孵育后收集 140mL 的上清液,用于步骤 2。步骤 2 中,将 120mL 的步骤 1 中的上清液调整至 pH7.0,并以膨胀床吸附模式运行。电导率为 5.4mS/cm,以 5 倍床体积的 0.5M Tris/HCl (pH7)缓冲液,之后用 10 倍床体积的 10mM Tris/HCl (pH7.0)的缓冲液对膨胀床模式中使用的 DEAE 离子交换剂进行平衡。总共使用了 12mL 的 DEAE 吸附剂。膨胀床珠子直径为 1cm,柱高为 70cm。床高度为 15cm。DEAE 吸附剂对样品的比率为 1:10。将步骤 1 中的上清液以 3.8cm/min 的流速加样上柱,加样后,用含有 10mM Tris/HCl (pH7.0)的洗涤缓冲液洗涤珠子。使用含有 50mM Tris/HCl 和 1M NaCl (pH9.0)的洗脱缓冲液洗脱所结合的材料。以 25mL 的体积收集流穿级分和洗涤级分。将洗脱液收集于一个级分,并在收集洗脱液前向管中添加 1/10 体积的 1M Tris/HCl (pH6.5)溶液将洗脱过程中的 pH 调整至 pH7。

[0217] 血凝活性的检测。按实施例 2 中描述的方法对以下样品的血凝素蛋白的量进行评估:在进入步骤 1 前的过滤后的本氏烟草绿汁提取物;静态模式孵育后的上清液;流穿液;膨胀床模式吸附和洗脱后的洗涤液及洗脱液。使用标准操作流程评估提取物和部分中的总蛋白质含量。

[0218] 结果。表 3 中给出了使用血凝活性测定法测量的以下样品中血凝素的量,以及所述级分和样品中蛋白质总含量:过滤后的绿汁提取物、用于静态模式中 PEI 离子交换剂孵育的起始材料、提取物和 PEI 离子交换剂孵育时获得的上清液、用于使用 DEAE 离子交换

剂的膨胀床吸附的起始材料、膨胀床柱子洗脱后的流穿液和洗脱液。在此实验中,大多数引起绿色并引起柱子中结块的材料可在使用了 PEI 吸附剂的步骤 1 中移除,其中血凝素蛋白质没有损失,可在使用 DEAE 离子交换剂的膨胀床吸附模式中捕获包含血凝素蛋白质的病毒样颗粒。

[0219] 表 3. 步骤 1 和 2 中多种提取物和部分的凝血活性(起始提取物%)及蛋白质总含量(mg/mL)。ND. 未确定。

[0220]

部分	步骤 1 稀释的 提取物	步骤 1 PEI 起始材 料	步骤 1 PEI 后的上 清液	步骤 2 DEAE 起 始材料	步骤 2 流穿+ 洗涤级分	步骤 2 DEAE 洗脱液
测定						
凝血活性 (以 %表示)	100	100	100	100	0	67
总蛋白质(以 mg/mL 表示)	0.22	0.25	0.14	0.14	ND	0.06

[0221] 实施例 7. DEAE 离子交换剂洗脱条件的优化

[0222] 实验安排。如实施例 6 中所描述的,在用 PEI 离子交换剂进行预捕获后,用 DEAE 离子交换剂以填充床模式对根据实施例 3 中描述的方法获得的植物绿汁提取物中存在的病毒样颗粒进行结合和洗脱,使用含有 50mM Tris/HCl, pH8.5 并分别加入了 1M NaCl、0.8M NaCl、0.6M NaCl、0.4M NaCl、0.2M NaCl 或 0.1M NaCl 的洗脱缓冲液对所述的结合和洗脱进行测试。在加样提取物前,用去离子水将植物绿汁提取物稀释 5 倍,并将 pH 调整至 pH7。电导率为 5.1mS/cm。将过滤的植物绿汁提取物首先与平均颗粒大小为 150 μ m 的 PEI 离子交换剂在批式孵育的模式下进行孵育,提取物与配体的比率为 15:1,孵育 30min,如实施例 6 的步骤 1 中所描述的。所使用的 DEAE 离子交换剂的平均颗粒大小为 50 μ m,上清液对吸附剂的比率为 5:1。按实施例 2 中所描述的方法测量血凝素蛋白质的量。表 4 给出了流穿液、洗涤液、结合于 DEAE 离子交换剂的血凝素的相对量以及洗脱液中血凝素的相对量。在此实验中,使用分别含有 0.4、0.6、0.8 或 1.0M NaCl 的洗脱缓冲液产生的病毒样颗粒的捕获结果类似于使用凝血测定测量的结果。

[0223] 表 4. 在填充床模式中使用 DEAE 离子交换剂用不同洗脱缓冲液得到的流穿液、洗涤液、结合级分及洗脱级分中的相对凝血活性。

洗脱缓冲液 50 mM Tris/HCl, pH 8.5 plus	相对凝血活性 (%)		
	流穿液和洗涤液	结合部分	洗脱液
1 M NaCl	0	100	67
0.8 M NaCl	0	100	67
0.6 M NaCl	0	100	67
0.4 M NaCl	0	100	67
0.2 M NaCl	0	100	45
0.1 M NaCl	0	100	9

[0224]

[0225] 实施例 8. 膨胀床吸附模式中不同流速下的突破曲线

[0226] 在膨胀床吸附模式的一步结合过程中测量了根据实施例 3 所描述的方法获得的植物绿汁提取物中存在的病毒样颗粒的结合情况,其中流速为 228cm/h 和 450cm/h。使用了 DEAE 离子交换剂,以 5 倍床体积的 0.5M Tris/HCl (pH7) 缓冲液,以及 10 倍床体积的 10mM Tris/HCl (pH7) 的缓冲液对其进行平衡。所使用的 DEAE 离子交换剂的平均颗粒大小为 50 μ m。吸附剂对植物绿汁提取物的比率总是 1:20。床高度为 50cm,柱子含有 39.3mL 的吸附剂 DEAE 离子交换剂。用去离子水将植物绿汁提取物稀释 5 倍,并在加样前测量电导率。洗涤缓冲液为 10mM Tris, pH7.0, 洗脱缓冲液为 50mM Tris/HCl; 1M NaCl, pH9.0。

[0227] 以 228cm/h 加样时植物绿汁提取物的电导率为 4.96mS/cm。以等价于 228cm/h 的 3.8cm/min 的流速加样总体积 786mL 的样品。洗涤和洗脱过程也是在 3.8cm/min 的流速下进行的。

[0228] 以 450cm/h 加样时植物绿汁提取物的电导率为 4.61mS/cm。以等价于 450cm/h 的 7.6cm/min 的流速加样总体积 786mL 的样品。洗涤过程在 7.6cm/min 下进行,而洗脱过程是在 3.8cm/min 下进行。

[0229] 分为 4 个级分收集流穿液和洗涤液。在收集洗脱液级分之前通过向容器中添加 1/10 体积的 1M Tris/HCl 缓冲液 (pH6.5) 将洗脱液中和至 pH7。在一个峰的时间内收集洗脱液。

[0230] 根据实施例 2 中描述的方法测量血凝素的量。

[0231] 根据 Bradford 法测量总蛋白质含量。

[0232] 表 5 中给出了流穿液级分 1-3,流穿液和洗涤级分组合以及流穿液、洗涤液组合,以及洗脱液在两种流速下的血凝素测定结果。表 6 中给出了入口提取物、总的流穿液和洗涤液以及洗脱液中总蛋白的 Bradford 测定结果。在此实验中,在一步结合和洗脱过程中,以 450cm/h 的流速加样提取物时效果最好,相对于进入的绿汁提取物,凝血活性得到 45% 的恢复。

[0233] 表 5. 相对凝血活性 C/C_0 (以 % 表示), 其中 C 为出口部分(流穿液 1-3,流穿液及洗涤部分 4 的组合、总的流穿液和洗涤液,或洗脱液)的凝血活性, C_0 为入口溶液的凝血活性, 设为 100%。

[0234]

级分		流穿液 1	流穿液 2	流穿液 3	流穿和洗涤 级分 4	总的流穿 和洗涤液	洗脱 液
流速	228	0	0	20	22	13	45
(cm/h)	450	0	0	0	55	20	45

[0235] 表 6. 以不同速率加样和洗脱的多种部分的总蛋白质含量。

流速(cm/h)	总蛋白质(mg/mL)		
	入口提取物	总的流穿液&洗涤液	洗脱液
228	0.11	0.05	0.15
450	0.11	0.03	0.19

[0237] 实施例 9. 450cm/h 的流速下经预处理的样品的突破曲线

[0238] 在膨胀床吸附模式的一步结合过程中测量了根据实施例 3 所描述的方法获得的植物绿汁提取物中存在的病毒样颗粒的结合情况, 其中流速为 450cm/h, 基本上按照实施例 8 中所描述的方法进行。所有实验条件都类似于实施例 8 中所使用的条件, 只是起始提取物在稀释后电导率为 5.36mS/cm, 且在应用于膨胀床吸附模式的一步结合步骤前对提取物进行了酸沉淀及过滤。进行了两项独立的实验。

[0239] 表 7 中给出了两项实验中流穿液级分 1-3, 流穿液和洗涤级分组合以及流穿液、洗涤液组合, 以及洗脱液的血凝素测定结果。表 8 中给出了入口提取物、总的流穿液和洗涤液以及洗脱液中总蛋白的 Bradford 测定结果。在此实验中, 用凝血测试测量出在一步结合和洗脱过程中从植物绿汁提取物中对病毒样颗粒的捕获为 100%。

[0240] 表 7. 相对凝血活性 C/C_0 (以 % 表示), 其中 C 为出口级分(流穿液 1-3, 组合的流穿液及洗涤级分 4, 总的流穿液和洗涤液的组合, 或洗脱液)的凝血活性, C_0 为入口溶液的凝血活性, 设为 100%。流速为 450cm/h。

[0241]

部分		流穿液 1	流穿液 2	流穿液 3	流穿和洗 涤级分 4	总的流穿液 和洗涤液	洗脱 液
实验	1	0	0	0	0	0	100
	2	0	0	0	0	0	100

[0242] 表 8. 以 450cm/h 流速的多种级分的总蛋白质含量。ND, 未确定。

实验	总蛋白质 (mg/mL)		
	入口提取物	总的流穿液和洗涤液	洗脱液
1	0.07	0.02	0.16
2	ND	ND	ND

[0244] 实施例 10. 使用膨胀床色谱进行大规模的病毒样颗粒捕获

[0245] 提取物。按所描述的方法 (D'Aoust 等人, (2008), 见上文) 对 7,500 株本氏烟草植物进行浸润, 生成 250kg 的含有血凝素 H5 病毒样颗粒的粗生物物质。浸润后, 在温室中对植物进行 6 天的孵育, 随后进行收获。在收获叶子时, 将生物物质避光于 4°C 下过夜, 并使用螺旋

压榨机 (Vincent CP-4) 在 15-20Kg/hr 下将其均质化, 锥体的压力为至少 45-psi, 基本上如实施例 3 中描述的方法进行。收集绿汁, 并向绿汁中加入焦亚硫酸钠, 使其终浓度为 10mM。在使用前测量电导率并用水将提取物稀释至最终电导率为近似 10。将提取物保存于室温。稀释后的总体积为近似 1, 250L 的提取物。

[0246] 柱子特性。珠子组合物: 环氧氯丙烷交联琼脂糖 (4%w/v)。内核: 碳化钨 (占据珠子体积的近似 10-15%)。配体: DEAE 离子交换剂。颗粒平均直径: 50 μ m。吸附颗粒的平均密度: 16kg/L。柱直径: 45cm。沉积状态的孔隙体积: 近似为堆积体积的 40%。总体积: 将 63L 吸附剂材料加至 45cm 直径的柱子中。用 5 倍柱体积的 0.5M Tris-Cl 缓冲液 (pH7), 随后用 10 倍柱体积的 10mM Tris-Cl 缓冲液 (pH7) 平衡柱子。

[0247] 加样。通过将 1, 250L 提取物以 450cm/h (等价于 653L/h) 的流速向上泵入进行加样, 基本上如实施例 8 和 9 所描述。膨胀系数维持在 2.0-2.5, 用 10mM Tris/HCl, pH7 以相同的膨胀速率洗出未结合材料。

[0248] 洗脱。通过用 50mM Tris-Cl 和 1M NaCl (pH9) 以膨胀速率 1.2 进行洗脱而回收流感病毒样颗粒。通过在收集洗脱峰前向容器中添加 1/10 体积的 1M Tris/HCl, pH6.5 中和洗脱级分。汇合含有包含血凝素的病毒样颗粒的级分进行进一步捕获和纯化, 根据如实施例 2 的方法对其中血凝素进行测量。

[0249] 运行监测。色谱的运行是通过在 280nm 和 600nm 处测量 UV 吸收, 以及测量电导率和 pH 而监测的。对含有血凝素 H5 的病毒样颗粒的捕获是通过 ELISA 以及实施例 2 中描述的凝血活性或根据 D'Aoust 等人的方法 (2008, 见上文) 进行定量测量的。使用 Bradford 测定确定各级分的总蛋白质含量。使用 SDS-PAGE 确定纯度, 并使用 Western 印记进行鉴别和定性, 使用如实施例 2 中描述的的血凝素 H5 特异性抗体并根据 D'Aoust 等人 (2008, 见上文) 的方法进行确定。

[0250] 实施例 11. 膨胀床柱子的清洁和再生

[0251] 洗脱后, 通过用 4 倍柱体积的 0.5M NaOH 进行洗涤, 随后使用 4 倍柱体积的蒸馏水洗涤, 对树脂进行清洁和再生。在 10mM Tris-Cl 缓冲液 (pH7) 中完成再平衡。

[0252] 实施例 12. 进一步优化

[0253] 表达 H5-VLP 的本氏烟草植物在农癌杆菌浸润后 6 天进行收获, 并避光于 4°C 过夜。使用螺旋压榨机 (Green Star Corrupad, GS1000, Korea Co.) 对植物生物质, 包括叶子和茎, 进行均质化。添加 MBS 至终浓度为 10mM 以避免样品氧化。使用 20% 的稀释的乙酸快速将获自螺旋压榨机的粗汁调整至 pH5.3。不加搅拌, 将提取物置于室温 20-30min, 进行部分澄清。进行过滤, 使之通过预包被 3mm 高的 Celpure P300 (MBS (10mM) 中有 10% Celpure P300 浆液) 的 Whatman 滤纸。维持真空度为 508mbar。向提取物中添加 Celpure P300 (10%), 并混合 1 分钟。最后, 逐步加入提取物-celpure 浆液 (滤饼液相不超过 2cm) 缓慢过滤提取物。

[0254] 选择了四种潜在的吸附剂, 优化其在批式模式中静态结合条件下的结合条件。表 9 中的结果显示, 离子交换剂吸附剂的结合能力受到两个因素的影响: (i) 低离子强度 (2.3mS/cm 或更低), 因此也受到 (ii) 高的每单位质量吸附剂的植物提取物体积 (每 1g 吸附剂对应 20ml 提取物) 的影响。

[0255] 此外的实验是在静态结合条件下以批式模式进行的, 以研究珠子大小以及在其中并入一个起始的负吸附步骤对整个过程的影响。在一个实验中, 使用包含配体聚乙烯亚胺

(PEI) 的颗粒进行负吸附的第一步,其尺寸范围为小于 250 μm , 随后进行第二步,正向吸附于 PEI 颗粒,其尺寸范围 $<50\ \mu\text{m}$ 。其表明, $>50\%$ 的可溶蛋白质杂质及色素可使用平均颗粒大小为 150 μm 的 PEI 从澄清的提取物中移除,而 H5-VLP 只吸附于较小颗粒大小的吸附剂。提取物的稀释也被优化至 1:10 和 1:20 的比率,其中 100% 的 H5 可被吸附,而比率为 1:40 时,只有 70% 的 H5 能够结合。然而,尽管 PEI 可被视为良好的吸附剂,然而 H5-VLP 的洗脱却不是最佳的。

[0256] 在另一个实验中,批式模式的静态结合条件下的一步和两步方法中使用 DEAE 葡聚糖是优化的方法。其显示,大约 87% 的 H5-VLP 可被吸附于 DEAE 离子交换珠子上,所述珠子的平均尺寸为大约 50 μm 。然而,在一步结合过程中,VLP 的洗脱很差。在第二个实验中,使用了 PEI 珠子的第一负吸附步骤,随后使用 DEAE 葡聚糖珠子进行第二正向吸附步骤,17% 的 VLP 得到洗脱和回收。

[0257] 然后使用两步过程进行了进一步实验。在一项实验中,将均质化的植物材料(也称为绿汁)在水中稀释五倍,所得的电导率为 5.9mS/cm,并使用 Celpure3000 进行过滤。使用 PEI 离子交换树脂作为吸附剂以从植物材料中移除色素和杂质,使用比率为 1g 吸附剂对 15ml 的绿汁。所述 PEI 离子交换树脂在 pH7 下的平均颗粒大小为 150 μm 。第二个步骤包括使用此方式获得的烟草材料在膨胀床模式下流动,流动条件为:使用平均颗粒大小为大约 50 μm 的 DEAE 离子交换剂,床高度为 15cm、流速为 3.8cm/min,使用了洗脱缓冲液(50mM Tris 和 1M NaCl(pH9))。收集流穿液和洗涤液,通过在单一峰下收集洗脱液之前添加 1/10 体积的 1M Tris/HCl pH6.5 将包含 VLP 的树脂中和至 pH7。所述洗脱物中血凝素含量为 67%(相对于起始材料 100%)。在另一个实施方式中,均质化的植物材料不经过滤而使用,其中在相同条件下采用了两步过程,22% 的总血凝素在洗脱液中得到回收,但在流穿液和洗涤部分中也检测到有 13%。

[0258] 上文说明书中提到的所有出版物都通过引用并入本文。本领域技术人员会清楚本发明的多种修饰和变动,不偏离本发明的范围和精神。尽管本发明已经关联合适的实施方式进行描述,然而应当理解,如所要求的,本发明不应当不适当地局限于所述特异实施方式。事实上,所描述的用于实行本发明的模式有多种对于细胞、分子和植物生物学或相关领域技术人员明显的修饰,其也在以下权利要求的范围内。

[0259] 表 9

[0260]

	VLP/H5 结合 (%) (*)	比率 吸附剂相对提取物	电导率	pH
Fast line Sp 离子交换剂	70	1: 20	2.39	5
QAE 葡聚糖基的离子 交换剂	96	1: 20	2.3	7
Fast line PEI 离子交换剂	100%	1: 20	2.3	7
DEAE 离子交换剂	100%	1: 20	2.2	7