



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102164945 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 200980136852. 0

(22) 申请日 2009. 09. 22

(30) 优先权数据

2008221604 2008. 09. 22 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 03. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2009/001253 2009. 09. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/031144 EN 2010. 03. 25

(73) 专利权人 联邦科学及工业研究组织

地址 澳大利亚首都直辖区

专利权人 蒙纳什大学

(72) 发明人 B·W·伍恩顿 M·T·W·赫恩

P·马哈詹 K·德西尔瓦

W·R·杰克森

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 关立新 林毅斌

(51) Int. Cl.

C07K 1/18(2006. 01)

B01D 15/08(2006. 01)

C08B 37/12(2006. 01)

B01D 15/04(2006. 01)

(续)

(56) 对比文件

CN 1658902 A, 2005. 08. 24,

US 2004134846 A1, 2004. 07. 15,

W0 9957134 A1, 1999. 11. 11,

Aslam Khan. Preparation and

characterization of N-isopropylacrylamide/
acrylic acid copolymer core-shell microgel
particles.《Journal of Colloid and Interface

Science》. 2007, 第 313 卷(第 2 期), 第 697-704
页.

Gheorghe Fundueanu 等. Preparation
and characterization of pH- and
temperature-sensitive pullulan

microspheres for controlled release of
drugs.《Biomaterials》. 2008, 第 29 卷(第 18
期), 第 2767-2775 页.

Hua Yu 等. Modified release of
hydrophilic, hydrophobic and peptide agents
from ionized amphiphilic gel networks.

《Journal of Controlled Release》. 1995, 第 34
卷(第 2 期), 第 117-127 页.

Nagase et al. Preparation of
thermoresponsive adsorption chromatography
matrices and application to separation of
blood proteins with them.《Proceedings of
symposium on macromolecules》. 2008, 第 57 卷
(第 2 期),

Pankaj Maharjan 等. Novel
chromatographic separation — The potential
of smart polymers.《Innovative Food Science
and Emerging Technologies》. 2008, 第 9 卷(第
2 期), 第 232-242 页.

Peter John Dowding 等. Preparation
and Swelling Properties of

Poly(NIPAM “Minigel” Particles Prepared by
Inverse Suspension Polymerization.《Journal
of Colloid and Interface Science》. 2000, 第
221 卷(第 2 期), 第 268-272 页.

陈瑜等. N-异丙基丙烯酰胺共聚物的温度敏
感性研究.《胶体与聚合物》. 2001, 第 19 卷(第
3 期), 第 5-7 页.

审查员 梁婧文

权利要求书3页 说明书25页 附图18页

(54) 发明名称

蛋白分离应用中的温度响应型聚合物颗粒

(57) 摘要

本发明涉及一种用于从含有蛋白的溶液中分

离蛋白的方法。本发明还涉及一种用于色谱分离
蛋白的方法。本发明还涉及用温度响应型共聚物
功能化的交联的羟基聚合物颗粒、以及制备此类
颗粒的方法。

[转续页]

[接上页]

(51) Int. Cl.

C08F 226/00(2006.01)

C08B 15/10(2006.01)

1. 一种用于从含有多种蛋白的溶液中分离这些蛋白的方法,该方法包括:

a. 将含有这些蛋白的溶液与用温度响应型共聚物功能化的交联的羟基聚合物颗粒进行接触,其中该温度响应型共聚物包括一个比例的可电离的化学基团并且所述接触发生在 30° C 与 80° C 之间的温度以协助通过这些交联的羟基聚合物颗粒的这些蛋白的截留;

b. 用一种漂洗溶液替换含有该蛋白的溶液;

c. 用一种释放溶液替换该漂洗溶液,该释放溶液对于将这些蛋白从这些交联的羟基聚合物颗粒释放是有效的,其中该释放溶液的温度低于含有这些蛋白的溶液与用温度响应型共聚物功能化的交联的羟基聚合物颗粒进行接触的温度;和

d. 分离该含有蛋白的释放溶液;并且

其中:

所述交联的羟基聚合物颗粒选自交联的琼脂糖颗粒、交联的纤维素颗粒、亲水性交联的乙烯基聚合物颗粒和基于甲基丙烯酸酯的聚合物树脂颗粒;且

所述温度响应型共聚物包括(i)向所述共聚物提供了温度响应型特性的 N- 异丙基丙烯酰胺单体单元;和(ii)选自以下的向所述共聚物提供了可电离的化学基团的单体单元:丙烯酸单元、甲基丙烯酸单元、乙基丙烯酸单元、N, N- 二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯单元和 N, N- 二甲基氨基乙基丙烯酸酯单元。

2. 根据权利要求 1 所述的一种方法,其中该蛋白溶液和该漂洗溶液是处于 30° C 与 60° C 之间的温度。

3. 根据权利要求 1 所述的一种方法,其中该蛋白溶液和该漂洗溶液是处于 40° C 与 60° C 之间的温度。

4. 根据权利要求 1 所述的一种方法,其中该释放溶液是处于 0° C 与 30° C 之间的温度。

5. 根据权利要求 1 所述的一种方法,其中该释放溶液是处于 0° C 与 20° C 之间的温度。

6. 根据权利要求 1 所述的一种方法,其中该释放溶液包含一种离子溶质。

7. 根据权利要求 6 所述的一种方法,其中该离子溶质是一种碱金属卤化物或一种碱土金属卤化物。

8. 根据权利要求 7 所述的一种方法,其中该离子溶质是氯化钠。

9. 根据权利要求 1 所述的一种方法,其中该提供了可电离的化学基团的单体单元是丙烯酸单元。

10. 根据权利要求 1 所述的一种方法,其中该温度响应型共聚物进一步包括至少一种双官能的单体单元,该双官能的单体单元选自乙二醇二甲基丙烯酸酯单元、1, 4- 丁二醇二甲基丙烯酸酯单元、1, 6- 己二醇二甲基丙烯酸酯单元、乙二醇二丙烯酸酯单元、1, 4- 丁二醇二丙烯酸酯单元、1, 6- 己二醇二丙烯酸酯单元、以及 N, N- 亚甲基双丙烯酰胺单元。

11. 根据权利要求 1 所述的一种方法,其中该温度响应型共聚物进一步包括至少一种额外的单体单元,该额外的单体单元选自丙烯酸甲酯单元、丙烯酸乙酯单元、丙烯酸丙酯单元、丙烯酸丁酯单元、甲基丙烯酸甲酯单元、甲基丙烯酸乙酯单元、甲基丙烯酸丙酯单元、N- 异丙基甲基丙烯酸酯单元、甲基丙烯酸丁酯单元、N- 叔丁基丙烯酸酯单元、N, N- 二甲基丙烯酸酯单元、N, N- 二乙基丙烯酸酯单元、以及 N- 苯基丙烯酸酯单元。

12. 根据权利要求 11 所述的一种方法,其中该额外的单体单元是 *N*-叔丁基丙烯酰胺单元。

13. 根据权利要求 11 所述的一种方法,其中该温度响应型共聚物包括处于从 84:8:8 至 96:2:2 比例的 *N*-异丙基丙烯酰胺单元、叔丁基丙烯酰胺单元以及丙烯酸单元。

14. 根据权利要求 11 所述的一种方法,其中该温度响应型共聚物包括处于从 84:8:8 至 96:2:2 比例的 *N*-异丙基丙烯酰胺单元、*N*-苯基丙烯酰胺单元以及丙烯酸单元。

15. 根据权利要求 1 所述的一种方法,其中这些交联的羟基聚合物颗粒选自 Sepharose、Sephacel、Toyopearl、以及 Fractogel。

16. 根据权利要求 1 所述的一种方法,其中步骤 (a)-(c) 在具有一个入口和一个出口的一个色谱柱中发生。

17. 根据权利要求 16 所述的一种方法,其中这些用温度响应型共聚物功能化的交联的羟基聚合物颗粒被包含在该入口与出口之间的路径中。

18. 根据权利要求 16 所述的一种方法,其中该含有蛋白的溶液、该漂洗溶液以及该释放溶液通过该入口而顺序地引入并且从该出口收集。

19. 根据权利要求 16 所述的一种方法,其中该释放溶液是以多个离散的体积等分部分而收集的。

20. 根据权利要求 19 所述的一种方法,其中确定每个等分部分中的蛋白浓度。

21. 根据权利要求 20 所述的一种方法,其中该蛋白在该释放溶液中的浓度是连续地测量的。

22. 根据权利要求 16 所述的一种方法,其中该含有蛋白的溶液、该漂洗溶液以及该释放溶液是通过泵送而引入到该入口的。

23. 根据权利要求 16 所述的一种方法,其中该含有蛋白的溶液、该漂洗溶液以及该释放溶液是通过重力而引入到该入口的。

24. 根据权利要求 1 所述的一种方法,其中该蛋白是选自乳铁蛋白、乳过氧化物酶、木瓜蛋白酶以及细胞色素 C。

25. 根据权利要求 1 所述的一种方法,其中该蛋白是乳铁蛋白。

26. 用温度响应型共聚物功能化的交联的羟基聚合物颗粒,其中该温度响应型共聚物包括一个比例的可电离的化学基团,其中所述交联的羟基聚合物颗粒选自交联的琼脂糖颗粒、交联的纤维素颗粒、亲水性交联的乙烯基聚合物颗粒和基于甲基丙烯酸酯的聚合物树脂颗粒;且

该温度响应型共聚物包括:

a. 向该共聚物提供了温度响应型特性的 *N*-异丙基丙烯酰胺单体单元;以及

b. 向该共聚物提供了可电离的化学基团的单体单元,其选自丙烯酸单元、甲基丙烯酸单元、乙基丙烯酸单元、*N,N*-二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯单元和 *N,N*-二甲基氨基乙基丙烯酸酯单元。

27. 根据权利要求 26 所述的交联的羟基聚合物颗粒,其中提供了可电离的化学基团的单体单元是丙烯酸单元。

28. 根据权利要求 26 所述的交联的羟基聚合物颗粒,其中该温度响应型共聚物进一步包括至少一种双官能的单体单元,其中该双官能的单体单元选自乙二醇二甲基丙烯酸酯单

元、1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯单元、1,6-己二醇二甲基丙烯酸酯单元、乙二醇二丙烯酸酯单元、1,4-丁二醇二丙烯酸酯单元、1,6-己二醇二丙烯酸酯单元、以及 N,N-亚甲基双丙烯酸酰胺单元。

29. 根据权利要求 28 所述的交联的羟基聚合物颗粒,其中该双官能的单体单元是 N,N-亚甲基双丙烯酸酰胺单元。

30. 根据权利要求 26 所述的交联的羟基聚合物颗粒,其中该温度响应型共聚物进一步包括至少一种额外的单体单元,其中该额外的单体单元是选自丙烯酸甲酯单元、丙烯酸乙酯单元、丙烯酸丙酯单元、丙烯酸丁酯单元、甲基丙烯酸甲酯单元、甲基丙烯酸乙酯单元、甲基丙烯酸丙酯单元、N-异丙基甲基丙烯酸酰胺单元、甲基丙烯酸丁酯单元、N-叔丁基丙烯酸酰胺单元、N,N-二甲基丙烯酸酰胺单元、N,N-二乙基丙烯酸酰胺单元、以及 N-苯基丙烯酸酰胺单元。

31. 根据权利要求 30 所述的交联的羟基聚合物颗粒,其中这些额外的单体单元是 N-叔丁基丙烯酸酰胺单元。

32. 根据权利要求 28 所述的交联的羟基聚合物颗粒,其中该温度响应型共聚物包括处于从 84:8:8 至 96:2:2 比例的 N-异丙基丙烯酸酰胺单元、叔丁基丙烯酸酰胺单元以及丙烯酸单元。

33. 根据权利要求 28 所述的交联的羟基聚合物颗粒,其中该温度响应型共聚物包括处于从 84:8:8 至 96:2:2 比例的 N-异丙基丙烯酸酰胺单元、N-苯基丙烯酸酰胺单元以及丙烯酸单元。

34. 一种用于制备根据权利要求 26 所述的交联的羟基聚合物颗粒的方法,该方法包括:

a. 提供交联的羟基聚合物颗粒,其选自交联的琼脂糖、交联的纤维素、羟基-官能的交联的乙烯基聚合物、羟基-官能的交联的丙烯酸聚合物以及羟基-官能的交联的甲基丙烯酸聚合物;

b. 将这些交联的羟基聚合物颗粒进行化学上修饰以提供具有能够引发聚合反应的官能团的交联的羟基聚合物颗粒;

c. 使这些具有能够引发聚合反应的官能团的交联的羟基聚合物颗粒与一种单体溶液进行接触,该单体溶液包括(i)能够向该共聚物提供温度响应型特性的 N-异丙基丙烯酸酰胺单体;以及(ii)至少一种能够向该共聚物提供可电离的化学基团的单体,其选自丙烯酸、甲基丙烯酸、乙基丙烯酸、N,N-二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯和 N,N-二甲基氨基乙基丙烯酸酯,其中所述接触引发了这些单体的聚合反应;

d. 将选自交联的琼脂糖、交联的纤维素、羟基-官能的交联的乙烯基聚合物、羟基-官能的交联的丙烯酸聚合物以及羟基-官能的交联的甲基丙烯酸聚合物的交联的羟基聚合物颗粒进行分离,该交联的羟基聚合物颗粒是用温度响应型共聚物功能化的,该温度响应型共聚物具有一个比例的向该共聚物提供温度响应型特性的 N-异丙基丙烯酸酰胺单体单元;以及选自以下的提供可电离的化学基团的单体单元:丙烯酸单元、甲基丙烯酸单元、乙基丙烯酸单元、N,N-二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯单元和 N,N-二甲基氨基乙基丙烯酸酯单元。

蛋白分离应用中的温度响应型聚合物颗粒

[0001] 本申请要求了澳大利亚专利申请 2008221604 的优先权,其全部披露内容通过引用结合在此。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种用于从含有蛋白的溶液中分离蛋白的方法。本发明还涉及一种用于色谱分离蛋白的方法。此外,本发明还涉及用温度响应型共聚物功能化的交联的羟基聚合物颗粒、以及制备此类颗粒的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 色谱法是一种用于分离分子混合物的技术。它涉及将混合物溶解在一种溶剂或多种溶剂的组合(一种所谓的流动相)中以形成一个溶液并且随后使该溶液穿过一种固体(所谓的固定相)。流动相和固定相的正确组合允许了这些分子被分离(通过允许各分子与固定相优选地或选择性地相互作用到一个不同的程度)。这种不同的相互作用允许了分子被分离并且从而被分开、分析或鉴定。色谱法流动相和固定相两者都被改变以适合(i)被分离的分子的类型,(ii)分离的规模(例如分析的、制备的或工业的),以及(iii)被分离的分子的所希望的功能性(例如生物活性)。流动相的例子包括乙腈、水、水性盐溶液、甲醇、或它们的混合物,而通常的固定相包括离子交换、疏水性相互作用或亲和性相互作用树脂。出于分析型目的,并且还有为了以制备的和商业的规模来分离有价值的分子,在药物和食品行业中广泛地使用色谱法。

[0005] “聪明的”或“智能的”聚合物是响应于外部的物理的、化学的或电学的刺激在它们的结构和功能上经历快速、可逆变化的材料。在“聪明聚合物”体系中,温度是最广泛研究的刺激因素,并且聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PolyNIPAAm)是一种通常的并且广泛研究的温度响应型聚合物。

[0006] 温度响应型材料在离子交换色谱法(作为一种通用的分离工具)中具有潜力,其中所结合的目标生物分子的洗脱可以通过一种温和的物理变化来诱导,例如在温度上的调节。这些聪明的聚合物色谱体系在有价值的组分(特别是来自农业食品、药物的、化学的、以及水以及其他复合原料)的有成本效益的、以环境友好的方式的分离中作出了保证。

[0007] PolyNIPAAm 以及相关聚合物已经被用于分离领域中以产生温度响应型固定相用于离子色谱法(Kobayashi *et al.*, *Analytical Chemistry*, 2003, 75 (13), 3244-3249; Sakamoto *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 2004, 1030, 247-253; Ayano *et al.*, *Journal of Separation Science*, 2006, 29, 738-749)、尺寸排阻(Hosoya *et al.*, *Macromolecules*, 1994, 27, 3973-3976; Adrados *et al.*, *Journal of Chromatography A* 2001, 930 (1-2), 73-78)、疏水性相互作用(Kanazawa, *et al.*, *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 5961-5966)、以及基于亲和性的色谱分离法(Hoffman and Stayton, *Macromolecular Symposia*, 2004, 207, 139-151),它们使用了一系列不同的支撑材料。

[0008] 此外,接枝到硅石珠粒上的聚(N-异丙基丙烯酰胺-共聚-丙烯酸-共聚-叔丁基丙烯酰胺)的一种 pH 和温度响应型共聚物已经被评定为一种阴离子的温度响应型色谱介

质(Kobayashi *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 2002, 958, 109-119 ;Kobayashi *et al.* *Analytical Chemistry*, 2003, 75 (13), 3244-3249)。使用阴离子的温度 /pH 响应型聚合物修饰的表面,在专有地水性条件下达到了碱性的生物活性肽的有效分离。类似地,用聚(N-异丙基丙烯酰胺-共聚-丁基甲基丙烯酸酯-共聚-N,N'-二甲基氨基丙基丙烯酰胺)接枝的硅石珠粒已经被评定为一种阳离子的温度响应型色谱介质(Sakamoto *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 2004, 1030, 247-253 ;Ayano *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 2006, 1119, 58-65)。该介质被设计用于使用无梯度的水性流动相来有效地分离生物活性化合物和药物。

[0009] 存在许多显示接枝到硅石珠粒上的聪明的聚合物用于离子交换色谱的用途的报道。然而,由于成本、在高 pH 下的不稳定性以及在食品和其他行业中经常使用的用来清洗设备的条件下缺乏操作稳健性,食品和其他行业倾向于避免硅石基的基质。此外,基于硅石的吸附剂通常适用于分析型分离并且缺少食品和其他行业的方法应用中所要求的灵活性。

[0010] 此外,仅仅已经使用小的化合物(像氨基酸和类固醇)进行了上述对聪明的聚合物在阳离子交换色谱法(用修饰的硅石珠粒)中的潜力的研究。存在很少的公开文献检测使用温度响应型离子交换色谱树脂的对食品、药物、化学或水工业重要的大的蛋白(例如,乳铁蛋白)的截留和释放。

[0011] 存在对于非硅石基质上的聪明的聚合物离子交换树脂的需要。确切地,存在对于基于一种基质的聪明的聚合物离子交换介质的需要,该介质与现在被食品、药物和其他行业所使用的体系(如交联的琼脂糖)是相容的。此外,存在对于基于热响应型阳离子交换琼脂糖的色谱法的需要,用于食品和其他行业中具有商业重要性的大的蛋白(例如,乳铁蛋白)的分离中的应用。

[0012] 在此对于本发明的背景的讨论被包括以解释本发明的环境。这并不被认为任何所提到的材料在任何权利要求的优先权日时是公开的、已知的或通常的公知知识的一部分。

[0013] 在本说明的说明书和权利要求中的各处,单词“包括”以及该单词的变体(如“包括了”以及“包含”)并不旨在排除其他添加物、组分、整体或步骤。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明提供了一种用于从含有多种蛋白的溶液中分离这些蛋白的方法,该方法包括:

[0016] (a) 将含有这些蛋白的溶液与用温度响应型共聚物功能化的交联的聚合物颗粒进行接触,其中该温度响应型共聚物包括一个比例的可电离的化学基团并且所述接触发生在 30° C 与 80° C 之间的温度以协助通过这些交联的聚合物颗粒的这些蛋白的截留;

[0017] (b) 用一种漂洗溶液替换含有该蛋白的溶液;

[0018] (c) 用一种释放溶液替换该漂洗溶液,该释放溶液对于将这些蛋白从这些交联的聚合物颗粒释放到该溶液中是有效的;

[0019] (d) 分离该含有蛋白的释放溶液。

[0020] 从另一个方面考虑,本发明提供了用温度响应型共聚物功能化的交联的羟基聚合物颗粒,其中该温度响应型共聚物包括一个比例的可电离的化学基团。

[0021] 从另一个方面考虑,本发明提供了用温度响应型共聚物功能化的交联的羟基聚合物颗粒,其中该温度响应型共聚物包括:

[0022] (a) 向该共聚物提供了温度响应型特性的单体单元 ; 以及

[0023] (b) 向该共聚物提供了可电离的化学基团的单体单元。

[0024] 从另一个方面考虑, 本发明提供了一种用于从含有多种蛋白的溶液中分离这些蛋白的方法, 该方法包括 :

[0025] (a) 将含有这些蛋白的溶液与用温度响应型共聚物功能化的交联的聚合物颗粒进行接触, 其中该温度响应型共聚物包括一个比例的可电离的化学基团并且所述接触发生在 30° C 与 80° C 之间的温度以协助通过这些交联的聚合物颗粒的这些蛋白的截留 ;

[0026] (b) 用一种漂洗溶液替换含有该蛋白的溶液 ;

[0027] (c) 用一种释放溶液替换该漂洗溶液, 该释放溶液对于将这些蛋白从这些交联的聚合物颗粒释放到该溶液中是有效的 ; 并且

[0028] (d) 分离该含有蛋白的释放溶液。

[0029] 其中步骤 (a)-(c) 在具有一个入口和一个出口的一个色谱柱中发生。

[0030] 从另一个方面考虑, 本发明提供了一种用于制备用温度响应型共聚物功能化的交联的羟基聚合物颗粒的方法, 该温度响应型共聚物具有一个比例的可电离的化学基团, 该方法包括 :

[0031] (a) 提供交联的羟基聚合物颗粒 ;

[0032] (b) 将这些交联的羟基聚合物颗粒进行化学上修饰以提供具有能够引发聚合反应的官能团的交联的羟基聚合物颗粒 ;

[0033] (c) 使这些具有能够引发聚合反应的官能团的交联的羟基聚合物颗粒与一种单体溶液进行接触, 其中该单体溶液包括至少一种能够向该共聚物提供温度响应型特性的单体以及至少一种能够向该共聚物提供可电离的化学基团的单体, 其中所述接触引发了这些单体的聚合反应 ; 并且

[0034] (d) 将交联的羟基聚合物颗粒进行分离, 该交联的羟基聚合物颗粒是用具有一个比例的可电离的化学基团温度响应型共聚物功能化的。

[0035] 附图简要说明

[0036] 图 1 示出了在 20° C 和 50° C 下, 分别对于聚 (N- 异丙基丙烯酰胺 - 共聚 - 叔丁基丙烯酰胺 - 共聚 - 丙烯酸) - 功能化的琼脂糖 (ItBA) 和羧甲基功能化的琼脂糖 (CM) 的乳铁蛋白吸附等温线。

[0037] 图 2 示出了对于 ItBA 在 20° C 和 50° C 下的乳过氧化物酶吸附等温线。

[0038] 图 3 示出了对于 ItBA 在 20° C 和 50° C 下的木瓜蛋白酶吸附等温线。

[0039] 图 4 示出了在 20° C 和 50° C 下, 盐浓度对于乳铁蛋白分别在 ItBA 和 CM 上的截留的影响。

[0040] 图 5 示出了在 20° C 和 50° C 下, 钠浓度对于乳铁蛋白的在 ItBA 上的截留的影响。对于 13 mM 和 20 mM 钠, 示出了结果。

[0041] 图 6 是一个色谱图, 该图是在以下情况时产生 : 乳铁蛋白动态装入 CM (1) 和 ItBA (2) 上, A : 在 20° C 下持续 12 分钟 (0-12 min), 随后在 20° C 下洗脱 10 分钟 (12-22 min), 接着用 0.1 M NaCl 持续 10 分钟 (23-33 min), 并且 1 M NaCl 持续 10 分钟 (35-45 min); B : 在 50° C 下持续 12 分钟 (0-12 min), 随后在 20° C 下洗脱 10 分钟 (12-22 min), 接着用 0.1 M NaCl 持续 10 分钟 (23-33 min), 并且 1 M NaCl 持续 10 分钟 (35-45 min); 以及 C : 在 50° C

下持续 12 分钟(0-12 min),随后在 50℃下洗脱 10 分钟(12-22 min),接着用 0.1M NaCl 持续 10 分钟(23-33 min),并且 1M NaCl 持续 10 分钟(35-45 min)。

[0042] 图 7 示出了在 4℃与 50℃之间的温度下被四种不同的树脂配制品所截留的乳铁蛋白的量(mg/mL 树脂并且总共的%)。这些树脂是聚(N-异丙基丙烯酰胺-共聚-丙烯酸)(IA)、ItBA、聚(N-乙烯基己内酰胺-共聚-N-叔丁基丙烯酰胺-共聚-丙烯酸)(CtBA)以及聚(N-异丙基丙烯酰胺-共聚-N-叔丁基丙烯酰胺-共聚-丙烯酸)(IPhA)。

[0043] 图 8 示出了对于乳铁蛋白在用聚(N-异丙基丙烯酰胺-共聚-丙烯酸)功能化的交联的琼脂糖上的吸附等温线。该聚合反应混合物包含 5%的丙烯酸。示出了对于 20° C 和 50° C 的结果。

[0044] 图 9 示出了对于乳铁蛋白在用聚(N-异丙基丙烯酰胺-共聚-N-苯基丙烯酰胺-共聚-丙烯酸)功能化的交联的琼脂糖上的吸附等温线。该聚合反应混合物包含 5%的丙烯酸。示出了对于 4° C 和 50° C 的结果。

[0045] 图 10 示出了对于乳铁蛋白在用聚(N-异丙基丙烯酰胺-共聚-N-苯基丙烯酰胺-共聚-丙烯酸)功能化的交联的琼脂糖上的吸附等温线。该聚合反应混合物包含 10%的丙烯酸。示出了对于 4° C 和 50° C 的结果。

[0046] 图 11 示出了在 20℃和 50℃下,被 ItBA 和用基于聚(N-异丙基丙烯酰胺-共聚-叔丁基丙烯酰胺-共聚-丙烯酸)的温度响应型聚合物树脂功能化的 Toyopearl(Toyopearl-ItBA)所截留的乳铁蛋白的量。

[0047] 图 12 是一个色谱图,该图是在以下情况时产生的:α-乳清蛋白(12 mg)、β-乳球蛋白(13 mg)和乳铁蛋白(24 mg)的一种混合物装入充满了 ItBA 与 10 mM 磷酸盐缓冲液流动相的一个柱上,在 20℃持续 12 min(0-12 min),随后在 20℃洗脱 10 min(12-22 min),随后应用从 0 M 到 0.1 M 的 NaCl 梯度超过 30 min(22-52 min),并且 1 M NaCl 持续 14 min(52-66 min)。

[0048] 图 13 是一个色谱图,该图是在以下情况时获得的:α-乳清蛋白(12 mg)、β-乳球蛋白(13 mg)和乳铁蛋白(24 mg)的一种混合物装入充满了 ItBA 与 10 mM 磷酸盐缓冲液流动相的一个柱上,在 50℃持续 12 min(0-12 min),随后在 20℃洗脱 10 min(12-22 min),随后应用从 0 M 到 0.1 M 的 NaCl 梯度超过 30 min(22-52 min),并且 1M NaCl 持续 14 min(52-66 min)。

[0049] 图 14 示出了分别在 20℃和 50℃下被 ItBA 截留的细胞色素 C 的量。

[0050] 图 15 示出了当相似量的(i)在没有其他蛋白下的乳铁蛋白,(ii)在一种新鲜的乳清溶液中的乳铁蛋白,以及(iii)在浓缩的乳清溶液(大约 10 倍)中的乳铁蛋白被动态装入并且从 ItBA 洗脱时所获得的色谱图。样品溶液(1 mL)被装入一个充满 1.7 mL 的 ItBA(在 10 mM 磷酸盐缓冲液流动相中)的柱上,在 50° C 持续 12 min(0-12 min),随后用 0.1 M NaCl 在 20℃下洗脱 10 min(13-23 min),并且 1 M NaCl 持续 10 min(25-35 min)。

[0051] 图 16 示出了从仅含有处于不同浓度的乳铁蛋白的溶液所截留的乳铁蛋白的量和百分比。乳铁蛋白被装入一个充满 1.7 mL 的 ItBA(在 10 mM 磷酸盐缓冲液流动相中)的柱上,在 50° C 持续 12 min(0-12 min),随后用 0.1 M NaCl 在 20℃下洗脱 10 min(13-23 min),并且 1 M NaCl 持续 10 min(25-35 min)。

[0052] 图 17 示出了从含有处于不同浓度的乳铁蛋白的新鲜的粗制凝乳酶乳清溶液所截

留的乳铁蛋白的量和百分比。乳清被装入一个充满 1.7 mL 的 ItBA (在 10 mM 磷酸盐缓冲液流动相中) 的柱上, 在 50° C 持续 12 min (0-12 min), 随后用 0.1 M NaCl 在 20°C 下洗脱 10 min (13-23 min), 并且 1 M NaCl 持续 10 min (25-35 min)。

[0053] 图 18 示出了从含有处于不同浓度的乳铁蛋白的纯粹的浓缩的粗制凝乳酶乳清溶液所截留的乳铁蛋白的量和百分比。该浓缩的乳清被装入一个充满 1.7 mL 的 ItBA 与 10 mM 磷酸盐缓冲液流动相的柱上, 在 50° C 持续 12 min (0-12 min), 随后用 0.1 M NaCl 在 20°C 下洗脱 10 min (13-23 min), 并且 1 M NaCl 持续 10 min (25-35 min)。

[0054] 发明详细说明

[0055] 如在此所定义的“蛋白”是由氨基酸构成的有机化合物, 这些氨基酸以直链排列并且通过相邻氨基酸残基的羧基与氨基之间的肽键连接在一起。蛋白典型地是从二十种基本氨基酸而形成的, 但是还可以包括其他变体如硒代半胱氨酸和吡咯赖氨酸、或其他通过合成而产生的化学部分。蛋白可以或者是单独的分子或者可替代地它们可以与一个或多个其他蛋白或分子相连以产生稳定的蛋白复合体。本发明中的蛋白可以是天然的、通过基因工程方法和发酵或细胞培养而产生的或可以是化学上或物理上修饰的。用于本发明的蛋白可能以一个、两个或多个同种型而存在。

[0056] 术语“蛋白溶液”被认为是其中存在蛋白分子的任何的水性或非水性液体。蛋白溶液可以或可以不包括另外的生物学分子、溶质、共溶剂、缓冲剂或添加剂。它可以仅含有一种或多种类型的蛋白。蛋白溶液可以是一种产物或另一个过程的副产物, 并且可以是一种天然发生的或合成的液体。蛋白溶液中的蛋白可能以单个的或以聚集的形式而存在。乳清溶液和浓缩的乳清溶液是蛋白溶液的实例。

[0057] 如在此所定义的“温度响应型聚合物”是具有较低临界溶解温度(LCST)的聚合物。一种聚合物的 LCST 是该聚合物溶液的相转变发生时的温度, 典型地是超过该温度该聚合物不再在一种特定的溶剂中溶解的温度。可以通过将疏水的或亲水的部分整合到该聚合物结构上来操纵温度响应性。疏水的或亲水的部分到该结构上的加入可以通过该温度响应型聚合物的后合成修饰来发生, 或通过在聚合物合成中使用一种共聚单体来发生, 该共聚单体赋予一个比例的亲水基团或一个比例的疏水基团。给出了温度响应型聚合物的一种单体与亲水单体的共聚反应导致了聚合物亲水性的增加以及共聚物的 LCST 上的增加。相比之下, 给出了温度响应型聚合物的一种单体与疏水单体的共聚反应导致了聚合物亲水性的降低以及共聚物的 LCST 上的降低。用于制备温度响应型聚合物的典型单体包括 N- 异丙基丙烯酰胺、乙烯基甲基醚、N- 乙烯基己内酰胺以及 N, N- 二乙基丙烯酰胺。温度响应型聚合物的实例包括聚(N- 异丙基丙烯酰胺)、聚(乙烯基甲基醚)。

[0058] 如在此所定义的术语“单体”是指任何化学分子, 从该分子可以形成含有衍生自该单体的多个重复单元的一种聚合物。用于本发明的单体典型地包括具有一种不饱和基团的那些, 该不饱和基团可以通过自由基的、阳离子的或阴离子的机理而经历聚合反应。用于本发明的单体典型地是丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、苯乙烯系塑料、丙烯酰胺或甲基丙烯酰胺家族的成员。可能适合用于本发明的其他单体包括烯丙基和乙烯家族中的单体。术语“单体单元”被认为是一种聚合物或共聚物中的重复单元, 该聚合物或共聚物是从相应单体的聚合反应而产生的。

[0059] 术语“能够向共聚物提供温度响应型特性的单体”被认为指本领域已知的任何单

体,这些单体已知为当进行聚合(或是当均聚或是当共聚)时形成一种温度响应型聚合物。能够向共聚物提供温度响应型特性的单体的实例包括 N- 异丙基丙烯酰胺、乙烯基甲基醚或 N- 乙烯基己内酰胺。在一个具体实施方案中,能够提供温度响应型特性的单体是 N- 异丙基丙烯酰胺。术语“向共聚物提供温度响应型特性的单体单元”被认为是该共聚物中的单体单元,这些单体单元是衍生自能够向共聚物提供温度响应型特性的单体。

[0060] 术语“可电离的化学基团”包括可以给出一个带电部分的任何化学部分。由于质子化(如一个胺基团形成一个铵基团)或通过去质子化(如一个羧酸或磺酸基团形成羧酸盐基团或磺酸盐基团),这些种类可以变得带电。其他可电离的化学基团可以是在一种水性环境中离子化的化学基团,如碱金属和碱土金属阳离子的聚合物的聚合盐(如丙烯酸钠、丙烯酸钙或丙烯酸锂)。

[0061] 术语“能够向共聚物提供可电离的化学基团的单体”包括任何单体,这些单体当被合并入一种聚合物中时向该聚合物提供了在该聚合物上侧挂或侧接的(pendant to or on)化学基团,这些化学基团能够变得离子化并且由此在该聚合物上提供了一个带电部分。向共聚物提供了可电离的化学基团的单体单元的典型例子包括:丙烯酸、甲基丙烯酸、乙基丙烯酸、2- 丙烯酰氨基 -2- 甲基丙烷磺酸钠、3- 丙烯酰氨基 -3- 甲基丁酸钠、(3- 丙烯酰氨基丙基) 三甲基氯化铵、N, N- 二甲基氨基丙基丙烯酰胺、N, N- 二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯、N, N- 二甲基氨基乙基丙烯酸酯、以及 4- 乙烯基苄基三甲基氯化铵。在一个具体实施方案中,提供了可电离的化学基团的单体是丙烯酸。术语“向共聚物提供可电离的化学基团的单体单元”是指该共聚物中的单元,这些单体单元是衍生自能够向共聚物提供可电离的化学基团的单体。

[0062] “双官能的单体”被认为是指具有两个不饱和基团的单体,这两个不饱和基团各自能够参与聚合反应。双官能的单体可以但不必须是对称的。在本发明中使用的典型的双官能的单体包括:乙二醇二甲基丙烯酸酯、1, 4- 丁二醇二甲基丙烯酸酯、1, 6- 己二醇二甲基丙烯酸酯、乙二醇二丙烯酸酯、1, 4- 丁二醇二丙烯酸酯、1, 6- 己二醇二丙烯酸酯、以及 N, N- 亚甲基双丙烯酰胺。在本发明的一个具体实施方案中,双官能的单体是 N, N- 亚甲基双丙烯酰胺。术语“双官能的单体单元”被认为是指一种聚合物或共聚物中的重复单元,该聚合物或共聚物是从相应双官能的单体单元的聚合反应而产生的。

[0063] “一种或多种额外的单体单元”被认为是指合并入温度响应型共聚物中的任何额外的单体单元。可以加入额外的单体以改变聚合物的亲水性和 / 或疏水性,或通过稀释这些向共聚物提供可电离的基团的单体单元以影响共聚物上的电荷密度。额外的单体单元的典型例子包括:丙烯酸甲酯单元、丙烯酸乙酯单元、丙烯酸丙酯单元、丙烯酸丁酯单元、甲基丙烯酸甲酯单元、甲基丙烯酸乙酯单元、甲基丙烯酸丙酯单元、N- 异丙基甲基丙烯酰胺单元、甲基丙烯酸丁酯单元、N- 叔丁基丙烯酰胺单元、N, N- 二甲基丙烯酰胺基团、N, N- 二乙基丙烯酰胺单元、以及 N- 苄基丙烯酰胺单元。在一个具体的实施方案中,这些额外的单体单元是 N-叔丁基丙烯酰胺单元。

[0064] 术语“色谱柱”包括任何玻璃、陶瓷、金属或聚合物圆筒,包含有待分离的蛋白的溶液穿过该圆筒。该色谱柱可以收容多个用温度响应型聚合物功能化的交联的羟基聚合物颗粒。该柱可以是一个自动的系统的一部分(该蛋白溶液、漂洗溶液和释放溶液通过该系统被泵送),或可以手动地使用如同重力进料和一个常规旋塞头。通过将该柱收容在一个烘箱或

温度控制的浴内、或通过使用本领域已知的任何其他的热交换机制,可以将该柱维持在任何特定的温度下。该温度控制的浴可以是一种温度控制的水浴或一种温度控制的油浴。在温度浴中使用的流体可以包含被本领域的普通技术人员所理解的任何其他添加剂。通过将该柱包含在一个热交换夹套内(具有所调解的温度的一种流体穿过该夹套),同样可以使得该柱是温度控制的。该流体可以是液体或气体。在某些实施方案中,该流体是液体水。该柱可以具有被认为对于有效分离有必要的任何尺寸(长度、内径、外径)。所使用的具体尺寸对于本领域的普通技术人员将是明显的。

[0065] 如在此所使用的术语“聚合物颗粒”包括主要地从一种基于碳的聚合物形成的任何颗粒。聚合物颗粒可以包括合成的聚合物如从乙烯的、烯丙基的、丙烯酸的、甲基丙烯酸酯的、苯乙烯系塑料、丙烯酰胺或甲基丙烯酸酯基氨基单体的聚合反应形成的那些,或可以包括多糖或纤维素材料。在本发明中使用的聚合物颗粒可以是亲水的或疏水的。在本发明中使用的聚合物颗粒的例子包括:交联的琼脂糖颗粒、交联的纤维素颗粒、亲水性交联的乙烯基聚合物颗粒、以及基于甲基丙烯酸酯的聚合物树脂颗粒。在某些具体实例中,这些交联的聚合物颗粒是选自下组,其组成为:Sephacel、Sephacel、Toyopearl、以及 Fractogel。在本发明的一个具体实施方案中,这些交联的聚合物颗粒是交联的琼脂糖颗粒如琼脂糖(Sephacel)颗粒。

[0066] 如在此所使用的术语“羟基聚合物颗粒”是指任何聚合物颗粒,在该颗粒上存在至少一个羟基。羟基聚合物颗粒可以包括羟基功能化的合成的聚合物如从适当的乙烯的、烯丙基的、丙烯酸的、甲基丙烯酸酯的、苯乙烯系塑料、丙烯酰胺或甲基丙烯酸酯基氨基单体的聚合反应形成的那些,或可以包括多糖或纤维素材料。通过具有一个羟基官能度或具有一个羟基官能度的前体(它可以随后被转化为一个羟基官能度)的一种单体或共聚单体(comonomer)的聚合反应,可以向聚合物赋予羟基官能度。可替代地,通过可以向该聚合物赋予一个羟基官能度的任何化学或物理方法,该聚合物可以被修饰后聚合反应。用于本发明的羟基聚合物颗粒可以是离散的颗粒或可以连接或融合在一起,或可以通过桥而互联,从而形成羟基聚合物颗粒的连续网络。在本发明的某些实施方案中,可以将这些羟基聚合物颗粒连接、融合或互联在一起从而形成一个所谓的整块料。在这样一种情况下,颗粒之间的连接它们本身可以用温度响应型聚合物功能化、或可以是未改性的聚合物材料。在本发明中使用的羟基聚合物颗粒可以是亲水的或疏水的。在本发明中使用的羟基聚合物颗粒的实例包括:交联的琼脂糖颗粒、交联的纤维素颗粒、具有羟基的亲水性交联的乙烯基聚合物颗粒、以及具有羟基的基于甲基丙烯酸酯的聚合物树脂颗粒。在某些具体实例中,这些交联的聚合物颗粒是选自下组,其组成为:Sephacel、Sephacel、Toyopearl、以及 Fractogel。在本发明的一个具体实施方案中,这些交联的聚合物颗粒是交联的琼脂糖颗粒如琼脂糖(Sephacel)颗粒。

[0067] 贯穿本说明书和权利要求,术语“聚合反应”及其衍生物(如“使聚合”以及“聚合”)被认为是从单体分子形成聚合物分子的任何过程。聚合反应不仅是指其中存在一种单个类型的单体的情况,并且还是指其中存在多种类型的单体导致形成一种所谓的“共聚物”的情况。“聚合反应”被认为包括自由基聚合、阳离子聚合以及阴离子聚合。聚合反应还被认为包括那些变体,其中在聚合反应中存在额外的添加剂,这些聚合反应包括原子转移聚合、原子转移自由基聚合、催化链转移聚合、链转移聚合、基团转移聚合、碘介导(mediated)聚合、

氮氧自由基介导聚合、可逆加成断裂链转移聚合、硫代引发-转移-终止剂聚合、引发-转移-终止剂聚合、开环易位聚合、非环状二烯烃易位聚合以及交替二烯烃易位聚合。

[0068] “能够引发聚合反应的官能团”被认为包括可以给出一个能够引发聚合反应的任何化学部分。在自由基聚合、原子转移聚合、原子转移自由基聚合、催化链转移聚合、链转移聚合、基团转移聚合、碘介导聚合、氮氧自由基介导聚合、可逆加成断裂链转移聚合、硫代引发-转移-终止剂聚合、引发-转移-终止剂聚合、开环易位聚合、非环状二烯烃易位聚合以及交替二烯烃易位聚合的情况下,能够引发聚合反应的官能团是那些可以从其形成一个自由基的基团。在某些情况下,在升高温度之后,自由基的形成立即发生。在其他情况下,通过应用紫外线辐射,触发了自由基的形成。在仍然其他情况下,通过应用电离辐射如伽马辐射或 X 射线辐射形成了自由基。

[0069] 本发明提供了用于分离蛋白的批量的以及色谱的方法。本发明还提供了用温度响应型共聚物功能化的交联的羟基聚合物颗粒(该温度响应型共聚物具有一个比例的可电离的化学基团)及其制作方法。

[0070] 从一个方面,本发明提供了一种用于从含有多种蛋白的溶液中分离这些蛋白的方法,该方法包括:

[0071] (a) 将含有这些蛋白的溶液与用温度响应型共聚物功能化的交联的聚合物颗粒进行接触,其中该温度响应型共聚物包括一个比例的可电离的化学基团并且所述接触发生在 30° C 与 80° C 之间的温度以协助通过这些交联的聚合物颗粒的这些蛋白的截留;

[0072] (b) 用一种漂洗溶液替换含有该蛋白的溶液;并且

[0073] (c) 用一种释放溶液替换该漂洗溶液,该释放溶液对于将这些蛋白从这些交联的聚合物颗粒释放到该溶液中是有效的;并且

[0074] (d) 分离该含有蛋白的释放溶液。

[0075] 在某些实施方案中,该释放溶液的温度是低于含有这些蛋白的溶液与交联的聚合物颗粒接触的温度。在某些情况下,该蛋白溶液和该漂洗溶液是处于 30° C 与 60° C 之间的温度。在其他情况下,该蛋白溶液和该漂洗溶液是处于 40° C 与 60° C 之间的温度。在某些实施方案中,该释放溶液是处于 0° C 与 30° C 之间的温度。在其他实施方案中,该释放溶液是处于 0° C 与 20° C 之间的温度。

[0076] 在某些实施方案中,该释放溶液含有一种离子溶质。这种离子溶质可以是本领域中已知的任何离子溶质,它在该释放溶液中是可溶的。在某些优选的实施方案中,该离子溶质是一种碱金属卤化物或碱土金属卤化物。在一个更优选的实施方案中,该离子溶质是一种锂、钠或钾的卤化物。在一个甚至更优选的实施方案中,该离子溶质是氯化锂、氯化钾、氯化钠、溴化锂、溴化钾、溴化钠、碘化锂、碘化钾或碘化钠。在某些实施方案中,该离子溶质是选自氯化钠和氯化钾。在某些具体实施方案中,该离子溶质是氯化钠。

[0077] 在本发明的又一个实施方案中,该温度响应型共聚物包括:

[0078] (i) 向该共聚物提供了温度响应型特性的单体单元;以及

[0079] (ii) 向该共聚物提供了可电离的化学基团的单体单元。

[0080] 在某些实施方案中,向该共聚物提供了温度响应型特性的单体单元可以是选自下组,该组的组成为:N-异丙基丙烯酰胺单元、乙烯基甲基醚单元或N-乙烯基己内酰胺单元。在一个具体的实施方案中,提供了温度响应型特性的单体单元是N-异丙基丙烯酰胺单元。

[0081] 提供了可电离的化学基团的单体单元的优选实例可以是选自下组,该组的组成为:丙烯酸的单元、甲基丙烯酸单元、乙基丙烯酸单元、2-丙烯酰氨基-2-甲基丙烷磺酸钠单元、3-丙烯酰氨基-3-甲基丁酸钠单元、(3-丙烯酰氨基丙基)三甲基氯化铵单元、N,N-二甲基氨基丙基丙烯酰胺单元、N,N-二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯单元、N,N-二甲基氨基乙基丙烯酸酯单元、以及4-乙烯基苄基三甲基氯化铵单元。在一个具体的实施方案中,提供了可电离的化学基团的单体单元是丙烯酸单元。

[0082] 在本发明的另一个实施方案中,该温度响应型共聚物进一步包括至少一种双官能的单体单元。该双官能的单体单元可以是选自下组,其组成为:乙二醇二甲基丙烯酸酯单元、1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯单元、1,6-己二醇二甲基丙烯酸酯单元、乙二醇二丙烯酸酯单元、1,4-丁二醇二丙烯酸酯单元、1,6-己二醇二丙烯酸酯单元、以及N,N-亚甲基双丙烯酰胺单元。在一个具体的实施方案中,该双官能的单体单元是N,N-亚甲基双丙烯酰胺单元。

[0083] 在本发明的又一个实施方案中,该温度响应型共聚物进一步包括至少一种额外的单体单元。这一种或多种额外的单体单元可以是选自下组,其组成为:丙烯酸甲酯单元、丙烯酸乙酯单元、丙烯酸丙酯单元、丙烯酸丁酯单元、甲基丙烯酸甲酯单元、甲基丙烯酸乙酯单元、甲基丙烯酸丙酯单元、N-异丙基甲基丙烯酰胺单元、甲基丙烯酸丁酯单元、N-叔丁基丙烯酰胺单元、N,N-二甲基丙烯酰胺基团、N,N-二乙基丙烯酰胺单元、以及N-苯基丙烯酰胺单元。在某些具体的实施方案中,这些额外的单体单元是N-叔丁基丙烯酰胺单元。在其他具体的实施方案中,这些额外的单体单元是N-苯基丙烯酰胺单元。

[0084] 在本发明的某些实施方案中,这些交联的聚合物颗粒可以是选自下组,其组成为:交联的琼脂糖颗粒、交联的纤维素颗粒、亲水性交联的乙烯基聚合物颗粒、以及基于甲基丙烯酸酯的聚合物树脂颗粒。在本发明的某些实施方案中,这些交联的聚合物颗粒是选自下组,其组成为:Sephacel、Sephacel、Toyopearl、以及Fractogel。在本发明的一个具体实施方案中,这些交联的聚合物颗粒是交联的琼脂糖颗粒如琼脂糖(Sephacel)颗粒。

[0085] 在某些实施方案中,通过一种色谱法将蛋白从溶液中分离。因此,本发明的另一个方面是提供用于分离蛋白的色谱法。

[0086] 从一个方面,本发明提供了一种用于从含有多种蛋白的溶液中分离这些蛋白的方法,该方法包括:

[0087] (a) 将含有这些蛋白的溶液与用温度响应型共聚物功能化的交联的聚合物颗粒进行接触,其中该温度响应型共聚物包括一个比例的可电离的化学基团并且所述接触发生在30°C与80°C之间的温度以协助通过这些交联的聚合物颗粒的这些蛋白的截留;

[0088] (b) 用一种漂洗溶液替换含有该蛋白的溶液;

[0089] (c) 用一种释放溶液替换该漂洗溶液,该释放溶液对于将这些蛋白从这些交联的聚合物颗粒释放到该溶液中是有效的;并且

[0090] (d) 分离该含有蛋白的释放溶液。

[0091] 其中步骤(a)-(c)在具有一个入口和一个出口的一个色谱柱中发生。

[0092] 在某些实施方案中,该释放溶液的温度是低于含有这些蛋白的溶液与交联的聚合物颗粒接触的温度。在某些情况下,该蛋白溶液和该漂洗溶液是处于30°C与60°C之间的温度。在其他情况下,该蛋白溶液和该漂洗溶液是处于40°C与60°C之间的温度。在

某些实施方案中,该释放溶液是处于 0° C 与 30° C 之间的温度。在其他实施方案中,该释放溶液是处于 0° C 与 20° C 之间的温度。

[0093] 在某些实施方案中,这些用温度响应型共聚物功能化的交联的聚合物颗粒被包含在该入口与出口之间的路径中。

[0094] 在某些实施方案中,该含有蛋白的溶液、该漂洗溶液以及该释放溶液可以顺序地通过该入口而引入的并且从该出口收集。在某些实施方案中,该产品溶液可以是以多个离散的体积等分部分而收集的。在仍然其他实施方案中,蛋白在各等分部分中的浓度是确定的。在又一个实施方案中,蛋白在该释放溶液中的浓度是连续地测量的。

[0095] 在某些实施方案中,该释放溶液含有一种离子溶质。这种离子溶质可以是本领域中已知的任何离子溶质,它在该释放溶液中是可溶的。在某些优选的实施方案中,该离子溶质是一种碱金属卤化物或碱土金属卤化物。在一个更优选的实施方案中,该离子溶质是一种锂、钠或钾的卤化物。在一个甚至更优选的实施方案中,该离子溶质是氯化锂、氯化钾、氯化钠、溴化锂、溴化钾、溴化钠、碘化锂、碘化钾或碘化钠。在某些实施方案中,该离子溶质是氯化钠或氯化钾。在某些具体实施方案中,该离子溶质是氯化钠。

[0096] 在本发明的某些实施方案中,该含有蛋白的溶液、该漂洗溶液以及该释放溶液是通过泵送而引入到色谱柱的。在其他实施方案中,该含有蛋白的溶液、该漂洗溶液以及该释放溶液是通过重力而引入的。

[0097] 在本发明的某些实施方案中,该温度响应型共聚物包括:

[0098] (i) 向该共聚物提供了温度响应型特性的单体单元;以及

[0099] (ii) 向该共聚物提供了可电离的化学基团的单体单元。

[0100] 向该共聚物提供了温度响应型特性的单体单元可以是选自下组,该组的组成为: N- 异丙基丙烯酰胺单元、乙烯基甲基醚单元或 N- 乙烯基己内酰胺单元。在一个具体的实施方案中,提供了温度响应型特性的单体单元是 N- 异丙基丙烯酰胺单元。

[0101] 提供了可电离的化学基团的单体单元可以是选自下组,该组的组成为: 丙烯酸单元、甲基丙烯酸单元、乙基丙烯酸单元、2- 丙烯酰氨基-2- 甲基丙烷磺酸钠单元、3- 丙烯酰氨基-3- 甲基丁酸钠单元、(3- 丙烯酰氨基丙基) 三甲基氯化铵单元、N, N- 二甲基氨基丙基丙烯酰胺单元、N, N- 二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯单元、N, N- 二甲基氨基乙基丙烯酸酯单元、以及 4- 乙烯基苄基三甲基氯化铵单元。在一个具体的实施方案中,提供了可电离的化学基团的单体单元是丙烯酸单元。

[0102] 在本发明的另一个实施方案中,该温度响应型共聚物进一步包括至少一种双官能的单体单元。该双官能的单体单元可以是选自下组,其组成为: 乙二醇二甲基丙烯酸酯单元、1, 4- 丁二醇二甲基丙烯酸酯单元、1, 6- 己二醇二甲基丙烯酸酯单元、乙二醇二丙烯酸酯单元、1, 4- 丁二醇二丙烯酸酯单元、1, 6- 己二醇二丙烯酸酯单元、以及 N, N- 亚甲基双丙烯酰胺单元。在一个具体的实施方案中,该双官能的单体单元是 N, N- 亚甲基双丙烯酰胺单元。

[0103] 在本发明的又一个实施方案中,该温度响应型共聚物进一步包括至少一种额外的单体单元。这一种或多种额外的单体单元可以是选自下组,其组成为: 丙烯酸甲酯单元、丙烯酸乙酯单元、丙烯酸丙酯单元、丙烯酸丁酯单元、甲基丙烯酸甲酯单元、甲基丙烯酸乙酯单元、甲基丙烯酸丙酯单元、N- 异丙基甲基丙烯酰胺单元、甲基丙烯酸丁酯单元、N- 叔丁基

丙烯酰胺单元、N, N- 二甲基丙烯酰胺基团、N, N- 二乙基丙烯酰胺单元、以及 N- 苯基丙烯酰胺单元。在某些具体的实施方案中, 这些额外的单体单元是 N-叔丁基丙烯酰胺单元。在其他具体的实施方案中, 这些额外的单体单元是 N- 苯基丙烯酰胺单元。

[0104] 在本发明的某些实施方案中, 这些交联的聚合物颗粒可以是选自下组, 其组成为: 交联的琼脂糖颗粒、交联的纤维素颗粒、亲水性交联的乙烯基聚合物颗粒、以及基于甲基丙烯酸酯的聚合物树脂颗粒。在本发明的某些实施方案中, 这些交联的聚合物颗粒可以是选自下组, 其组成为: Sepharose、Sephacel、Toyopearl、以及 Fractogel。在本发明的一个具体实施方案中, 这些交联的聚合物颗粒是交联的琼脂糖颗粒如琼脂糖 (Sepharose) 颗粒。

[0105] 在某些实施方案中, 有待分离的蛋白是选自下组, 其组成为: 细胞色素 C、乳铁蛋白、木瓜蛋白酶以及乳过氧化物酶。在一个具体实施方案中, 该蛋白是乳铁蛋白。

[0106] 本发明的另一个方面是提供用温度响应型共聚物功能化的交联的羟基聚合物颗粒, 其中该温度响应型共聚物包括一个比例的可电离的化学基团。在本发明的某些实施方案中, 该温度响应型共聚物包括:

[0107] (ii) 向该共聚物提供了温度响应型特性的单体单元; 以及

[0108] (iii) 向该共聚物提供了可电离的化学基团的单体单元。

[0109] 向该共聚物提供了温度响应型特性的单体单元可以是选自下组, 该组的组成为: N- 异丙基丙烯酰胺单元、乙烯基甲基醚单元或 N- 乙烯基己内酰胺单元。在一个具体的实施方案中, 提供了温度响应型特性的单体单元是 N- 异丙基丙烯酰胺单元。

[0110] 提供了可电离的化学基团的单体单元可以是选自下组, 该组的组成为: 丙烯酸的单元、甲基丙烯酸单元、乙基丙烯酸单元、2- 丙烯酰氨基 -2- 甲基丙烷磺酸钠单元、3- 丙烯酰氨基 -3- 甲基丁酸钠单元、(3- 丙烯酰氨基丙基) 三甲基氯化铵单元、N, N- 二甲基氨基丙基丙烯酰胺单元、N, N- 二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯单元、N, N- 二甲基氨基乙基丙烯酸酯单元、以及 4- 乙烯基苄基三甲基氯化铵单元。在一个具体的实施方案中, 提供了可电离的化学基团的单体单元是丙烯酸单元。

[0111] 在本发明的另一个实施方案中, 该温度响应型共聚物进一步包括至少一种双官能的单体单元。该双官能的单体单元可以是选自下组, 其组成为: 乙二醇二甲基丙烯酸酯单元、1, 4- 丁二醇二甲基丙烯酸酯单元、1, 6- 己二醇二甲基丙烯酸酯单元、乙二醇二丙烯酸酯单元、1, 4- 丁二醇二丙烯酸酯单元、1, 6- 己二醇二丙烯酸酯单元、以及 N, N- 亚甲基双丙烯酰胺单元。在一个具体的实施方案中, 该双官能的单体单元是 N, N- 亚甲基双丙烯酰胺单元。

[0112] 在本发明的又一个实施方案中, 该温度响应型共聚物进一步包括至少一种额外的单体单元。这一个或多个额外的单体单元可以是选自下组, 其组成为: 丙烯酸甲酯单元、丙烯酸乙酯单元、丙烯酸丙酯单元、丙烯酸丁酯单元、甲基丙烯酸甲酯单元、甲基丙烯酸乙酯单元、甲基丙烯酸丙酯单元、N- 异丙基甲基丙烯酰胺单元、甲基丙烯酸丁酯单元、N- 叔丁基丙烯酰胺单元、N, N- 二甲基丙烯酰胺基团、N, N- 二乙基丙烯酰胺单元、以及 N- 苯基丙烯酰胺单元。在某些具体的实施方案中, 这些额外的单体单元是 N-叔丁基丙烯酰胺单元。在其他具体的实施方案中, 这些额外的单体单元是 N- 苯基丙烯酰胺单元。

[0113] 在某些实施方案中, 该交联的羟基聚合物是选自下组, 其组成为: 交联的琼脂糖、交联的纤维素、亲水性交联的乙烯基聚合物、羟基 - 官能的交联的乙烯基聚合物、羟基 - 官

能的交联的丙烯酸聚合物以及羟基-官能的交联的甲基丙烯酸的聚合物。在优选的实施方案中,该交联的羟基聚合物是交联的琼脂糖或亲水性交联的乙烯基聚合物。在一个具体实施方案中,该交联的羟基聚合物是交联的琼脂糖。

[0114] 本发明的另一个方面提供了一种用于制备用具有一个比例的可电离的化学基团的温度响应型共聚物功能化的交联的羟基聚合物颗粒的方法,该方法包括:

[0115] (a) 提供交联的羟基聚合物颗粒;

[0116] (b) 将这些交联的羟基聚合物颗粒进行化学上修饰以提供具有能够引发聚合反应的官能团的交联的羟基聚合物颗粒;

[0117] (c) 使这些具有能够引发聚合反应的官能团的交联的羟基聚合物颗粒与一种单体溶液进行接触,其中该单体溶液包括至少一种能够向该共聚物提供温度响应型特性的单体以及至少一种能够向该共聚物提供可电离的化学基团的单体,其中所述接触引发了这些单体的聚合反应;

[0118] (d) 将交联的羟基聚合物颗粒进行分离,该交联的羟基聚合物颗粒是用具有一个比例的可电离的化学基团温度响应型共聚物功能化的。

[0119] 在某些实施方案中,将这些交联的羟基聚合物颗粒进行化学上修饰以提供具有能够引发聚合反应的官能团的交联的羟基聚合物颗粒的步骤包括以下步骤:

[0120] (i) 将这些交联的羟基聚合物颗粒用一种环氧化物基团进行功能化;

[0121] (ii) 使该环氧化物基团与氨进行反应以提供用胺基团功能化的交联的羟基聚合物颗粒;

[0122] (iii) 使这些胺基团与具有至少一个羧酸基团的一种聚合反应引发剂进行反应。

[0123] 在本发明的一个具体实施方案中,将这些交联的羟基聚合物颗粒用一种环氧化物基团进行功能化的步骤包括使羟基聚合物颗粒用环氧氯丙烷在氢氧化钠和硼氢化钠的存在下进行反应的步骤。在另一个实施方案中,使这些胺基团与具有一个羧酸基团的一种聚合反应引发剂进行反应的步骤是在一种缩合剂的存在下进行的。在一个具体实施方案中,该缩合剂是 1-(乙氧碳酰基)-2-乙氧基-1,2-二氢喹啉。

[0124] 在某些实施方案中,具有至少一个羧酸基团的一种聚合反应引发剂是具有一个羧酸基团的一种过氧基引发剂。在其他实施方案中,具有至少一个羧酸基团的一种聚合反应引发剂是具有一个羧酸基团的一种偶氮引发剂。在仍然其他实施方案中,具有至少一个羧酸基团的一种聚合反应引发剂是具有一个羧酸基团的一种光敏引发剂。在本发明的某些实施方案中,具有至少一个羧酸基团的聚合反应引发剂是 4,4'-偶氮双(4-氰戊酸)。

[0125] 能够向该共聚物提供温度响应型特性的单体可以是选自下组,该组的组成为: N-异丙基丙烯酰胺、乙烯基甲基醚或 N-乙烯基己内酰胺。在一个具体实施方案中,能够提供温度响应型特性的单体是 N-异丙基丙烯酰胺。

[0126] 能够提供可电离的化学基团的单体可以是选自下组,该组的组成为: 丙烯酸、甲基丙烯酸、乙基丙烯酸、2-丙烯酰氨基-2-甲基丙烷磺酸钠、3-丙烯酰氨基-3-甲基丁酸钠、(3-丙烯酰氨基丙基)三甲基氯化铵、N,N-二甲基氨基丙基丙烯酰胺、N,N-二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯、N,N-二甲基氨基乙基丙烯酸酯、以及 4-乙烯基苄基三甲基氯化铵。在一个具体实施方案中,提供了可电离的化学基团的单体是丙烯酸。

[0127] 在本发明的另一个实施方案中,该单体溶液进一步包括至少一种双官能的单体。

该双官能的单体可以是选自下组,其组成为:乙二醇二甲基丙烯酸酯、1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯、1,6-己二醇二甲基丙烯酸酯、乙二醇二丙烯酸酯、1,4-丁二醇二丙烯酸酯、1,6-己二醇二丙烯酸酯、以及N,N-亚甲基双丙烯酰胺。在一个具体的实施方案中,该双官能的单体是N,N-亚甲基双丙烯酰胺。

[0128] 在本发明的又一个实施方案中,该单体溶液进一步包括至少一种额外的单体。这一种或多种额外的单体可以是选自下组,其组成为:丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丙酯、丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸丙酯、N-异丙基甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸丁酯、N-叔丁基丙烯酰胺、N,N-二甲基丙烯酰胺、N,N-二乙基丙烯酰胺、以及N-苯基丙烯酰胺。在某些具体的实施方案中,这些额外的单体是N-叔丁基丙烯酰胺。在其他具体的实施方案中,这些额外的单体是N-苯基丙烯酰胺。

[0129] 使这些具有能够引发聚合反应的官能团的交联的羟基聚合物颗粒与一种单体溶液进行接触的步骤典型地发生在这样的温度下,能够引发聚合反应的官能团在该温度下引发聚合反应,该单体溶液包括至少一种能够向该共聚物提供温度响应型特性的单体以及至少一种能够向该共聚物提供可电离的化学基团的单体。具体的温度选择将取决于能够引发聚合反应的具体的官能团,并且对于本领域的普通技术人员将是容易明显的。在某些实施方案中,该温度将是室温。在其他实施方案中,该温度可以选自下组,其组成为:30° C、31° C、32° C、33° C、34° C、35° C、36° C、37° C、38° C、39° C、40° C、41° C、42° C、43° C、44° C、45° C、46° C、47° C、48° C、49° C、50° C、51° C、52° C、53° C、54° C、55° C、56° C、57° C、58° C、59° C、60° C、61° C、62° C、63° C、64° C、65° C、66° C、67° C、68° C、69° C、70° C、71° C、72° C、73° C、74° C、75° C、76° C、77° C、78° C、79° C、80° C、81° C、82° C、83° C、84° C、85° C、86° C、87° C、88° C、89° C、90° C、91° C、92° C、93° C、94° C、95° C、96° C、97° C、98° C、99° C、以及100° C。在一个具体实施方案中,该温度是80° C。如将被本领域的普通技术人员理解的是,颗粒上的引发剂基团的密度是可以改变的。

[0130] 在其他实施方案中,使具有能够引发聚合反应的官能团的交联的羟基聚合物颗粒与一种单体溶液进行接触的步骤发生在紫外光下。在仍然其他实施方案中,使具有能够引发聚合反应的官能团的交联的羟基聚合物颗粒与一种单体溶液进行接触的步骤发生在电离辐射下。在仍然其他实施方案中,使具有能够引发聚合反应的官能团的交联的羟基聚合物颗粒与一种单体溶液进行接触的步骤发生在伽马辐射下。在仍然其他实施方案中,使具有能够引发聚合反应的官能团的交联的羟基聚合物颗粒与一种单体溶液进行接触的步骤发生在X射线辐射下。

[0131] 将被有技能的读者理解的是,可以对本发明进行修改用于带正电的和带负电的蛋白的分离的应用。例如,在具有一个正电荷的蛋白的分离中,一种能够向共聚物提供可电离的化学基团的单体的使用将是可适用的,其中那些可电离的基团当电离时携带一个负电荷。相反地,在具有一个负电荷的蛋白的分离中,一种能够向共聚物提供可电离的化学基团的单体的使用将是可适用的,其中那些可电离的基团当电离时携带一个正电荷。

[0132] 如有技能的读者将会理解的,通过功能化的交联的颗粒的蛋白的截留是指蛋白与这些颗粒结合到这样一种程度以使它们从有待纯化的溶液中被去除。同样将被有技能的读者理解的是,除了颗粒与蛋白之间的静电(即正的/负的)相互作用外,颗粒与蛋白之间的其

他相互作用也可以发生。例如,金属-配体相互作用、疏水性相互作用、氢键相互作用、立体络合相互作用或电荷转移相互作用也可以对蛋白与本发明的颗粒之间的相互作用有影响,该颗粒引起了蛋白在本发明的颗粒上的截留。

[0133] 如对于特定的温度响应型共聚物和有待分离的特定蛋白所适合的,蛋白溶液与用具有一个比例的可电离的化学基团的温度响应型共聚物功能化的交联的聚合物颗粒接触的温度可以进行变化。该温度将是这样的,使得一个比例的蛋白将被这些功能化的交联的聚合物颗粒截留。典型地,该温度将在 30° C 与 80° C 之间。在一些实施方案中,该温度将在 30° C 与 60° C 之间,并且在另外的实施方案中,该温度将在 45° C 与 55° C 之间。在某些实施方案中,蛋白溶液与交联的聚合物颗粒接触的温度是选自下组,其组成为:30° C、31° C、32° C、33° C、34° C、35° C、36° C、37° C、38° C、39° C、40° C、41° C、42° C、43° C、44° C、45° C、46° C、47° C、48° C、49° C、50° C、51° C、52° C、53° C、54° C、55° C、56° C、57° C、58° C、59° C、60° C、61° C、62° C、63° C、64° C、65° C、66° C、67° C、68° C、69° C、70° C、71° C、72° C、73° C、74° C、75° C、76° C、77° C、78° C、79° C 以及 80° C。在其他实施方案中,该温度是选自下组,其组成为:30° C、31° C、32° C、33° C、34° C、35° C、36° C、37° C、38° C、39° C、40° C、41° C、42° C、43° C、44° C、45° C、46° C、47° C、48° C、49° C、50° C、51° C、52° C、53° C、54° C、55° C、56° C、57° C、58° C、59° C、以及 60° C。在仍然其他实施方案中,该温度是选自下组,其组成为:45° C、46° C、47° C、48° C、49° C、50° C、51° C、52° C、53° C、54° C 以及 55° C。在某些具体实施方案中,蛋白与功能化的交联的聚合物颗粒接触的温度是 50° C。在其他具体实施方案中,蛋白与功能化的交联的聚合物颗粒接触的温度是 40° C。在仍然其他具体实施方案中,蛋白与功能化的交联的聚合物颗粒接触的温度是 60° C。

[0134] 这些颗粒随后在该漂洗溶液下的暴露可以发生在与初始的与蛋白溶液的接触相同的温度下、更高的温度下或更低的温度下。漂洗溶液的温度是这样的,使得当颗粒暴露于漂洗溶液下时一个比例的蛋白将被这些功能化的聚合物颗粒截留。典型地,该漂洗溶液的温度将在 30° C 与 80° C 之间。在一些实施方案中,该温度将在 30° C 与 60° C 之间,并且在另外的实施方案中,该温度将在 45° C 与 55° C 之间。在某些实施方案中,该漂洗溶液的温度是选自下组,其组成为:30° C、31° C、32° C、33° C、34° C、35° C、36° C、37° C、38° C、39° C、40° C、41° C、42° C、43° C、44° C、45° C、46° C、47° C、48° C、49° C、50° C、51° C、52° C、53° C、54° C、55° C、56° C、57° C、58° C、59° C、60° C、61° C、62° C、63° C、64° C、65° C、66° C、67° C、68° C、69° C、70° C、71° C、72° C、73° C、74° C、75° C、76° C、77° C、78° C、79° C 以及 80° C。在其他实施方案中,该漂洗溶液的温度是选自下组,其组成为:30° C、31° C、32° C、33° C、34° C、35° C、36° C、37° C、38° C、39° C、40° C、41° C、42° C、43° C、44° C、45° C、46° C、47° C、48° C、49° C、50° C、51° C、52° C、53° C、54° C、55° C、56° C、57° C、58° C、59° C、以及 60° C。在仍然其他实施方案中,该漂洗溶液的温度是选自下组,其组成为:45° C、46° C、47° C、48° C、49° C、50° C、51° C、52° C、53° C、54° C 以及 55° C。在某些具体实施方案中,该漂洗溶液的温度是 50° C。在其他具体实施方案中,该漂洗溶液的温度是 40° C。在仍然其他具体实施方案中,该漂洗溶液的温度是 60° C。

[0135] 这些颗粒随后在该释放溶液下的暴露典型地发生在低于初始的与蛋白溶液的接

触的温度下。释放溶液的温度是这样的,使得一个比例的蛋白从这些功能化的聚合物颗粒释放到该释放溶液中。典型地,该释放溶液的温度将在 0°C 与 80°C 之间。在一些实施方案中,该温度将在 0°C 与 30°C 之间。在其他实施方案中,该温度将在 0°C 与 20°C 之间。在仍然其他实施方案中,该温度将在 0°C 与 10°C 之间。在一些实施方案中,该释放溶液的温度是选自下组,其组成为: 0°C 、 1°C 、 2°C 、 3°C 、 4°C 、 5°C 、 6°C 、 7°C 、 8°C 、 9°C 、 10°C 、 11°C 、 12°C 、 13°C 、 14°C 、 15°C 、 16°C 、 17°C 、 18°C 、 19°C 、 20°C 、 21°C 、 22°C 、 23°C 、 24°C 、 25°C 、 26°C 、 27°C 、 28°C 、 29°C 以及 30°C 。在其他实施方案中,该释放溶液的温度是选自下组,其组成为: 0°C 、 1°C 、 2°C 、 3°C 、 4°C 、 5°C 、 6°C 、 7°C 、 8°C 、 9°C 、 10°C 、 11°C 、 12°C 、 13°C 、 14°C 、 15°C 、 16°C 、 17°C 、 18°C 、 19°C 以及 20°C 。在仍然其他实施方案中,该释放溶液的温度是选自下组,其组成为: 0°C 、 1°C 、 2°C 、 3°C 、 4°C 、 5°C 、 6°C 、 7°C 、 8°C 、 9°C 、 10°C 。在某些具体实施方案中,该释放溶液的温度是 20°C 。在其他具体实施方案中,该释放溶液的温度是在 0°C 与 4°C 之间。

[0136] 在某些情况下,该释放溶液不含有离子溶质。在某些情况下,该释放溶液含有一种离子溶质。这种离子溶质可以是本领域中已知的任何离子溶质,它在该释放溶液中是可溶的。在某些优选的实施方案中,该离子溶质是一种碱金属卤化物或碱土金属卤化物。在一个更优选的实施方案中,该离子溶质是一种锂、钠或钾的卤化物。在一个甚至更优选的实施方案中,该离子溶质是氯化锂、氯化钾、氯化钠、溴化锂、溴化钾、溴化钠、碘化锂、碘化钾或碘化钠。在一个最优选的实施方案中,该离子溶质是氯化钠。

[0137] 在某些情况下,所希望的是,当释放溶液与用具有一个比例的可电离的化学基团的温度响应型共聚物功能化的交联的聚合物颗粒接触时,改变释放溶液中的离子溶质的浓度。释放溶液中的离子溶质的浓度可以是 0 M 与 2 M 之间的任何浓度。在一些实施方案中,释放溶液中的离子溶质的浓度可以是 0 M 与 1 M 之间的任何浓度。在一些具体实施方案中,离子溶质的浓度可以从 0 M 改变到 0.01 M 到 0.1 M 到 1.0 M 。该变化可以是连续的、增量的或阶梯式的。在一些具体实施方案中,该浓度从 0 M 阶梯式到 0.1 M 到 1.0 M NaCl 。

[0138] 向共聚物提供可电离的化学基团的单体单元、向共聚物提供温度响应型特性的单体单元、双官能的单体单元与额外的单体单元的比例可以取决于所要求的特定的操作条件和/或有待分离的蛋白的要求而变化。在某些实施方案中,该双官能的单体单元可以是省略的。在其他实施方案中,该额外的单体单元可以是省略的。在仍然另外的实施方案中,该双官能的单体单元和该额外的单体单元两者都是省略的。在某些实施方案中,温度响应型单体单元与额外的单体单元与提供可电离的基团的单体单元的比率是从 $80 : 10 : 10$ 至 $98 : 1 : 1$ 。在其他实施方案中,温度响应型单体单元与额外的单体单元与提供可电离的基团的单体单元的比率是从 $84 : 8 : 8$ 至 $96 : 2 : 2$ 。在某些具体实施方案中,温度响应型单体单元是 N-异丙基丙烯酰胺 单元,额外的单体单元是叔丁基丙烯酰胺单元,并且提供可电离的基团的单体单元是丙烯酸单元,并且 N-异丙基丙烯酰胺 单元 : 叔丁基丙烯酰胺单元 : 丙烯酸单元的比率是从 $80 : 10 : 10$ 至 $98 : 1 : 1$ 。在其他具体实施方案中,温度响应型单体单元是 N-异丙基丙烯酰胺 单元,额外的单体单元是 N-苯基丙烯酰胺 单元,并且提供可电离的基团的单体单元是丙烯酸单元,并且 N-异丙基丙烯酰胺 单元 : N-苯基丙烯酰胺 单元 : 丙烯酸单元的比率是从 $80 : 10 : 10$ 至 $98 : 1 : 1$ 。在某些其他具体实施

方案中,温度响应型单体单元是 N- 异丙基丙烯酰胺单元,额外的单体单元是叔丁基丙烯酰胺单元,并且提供可电离的基团的单体单元是丙烯酸单元,并且 N- 异丙基丙烯酰胺单元 : 叔丁基丙烯酰胺单元 : 丙烯酸单元的比率是从 84 : 8 : 8 至 96 : 2 : 2。在仍然其他具体实施方案中,温度响应型单体单元是 N- 异丙基丙烯酰胺单元,额外的单体单元是 N- 苯基丙烯酰胺单元,并且提供可电离的基团的单体单元是丙烯酸单元,并且 N- 异丙基丙烯酰胺单元 : N- 苯基丙烯酰胺单元 : 丙烯酸单元的比率是从 84 : 8 : 8 至 96 : 2 : 2。

[0139] 本发明的方法可以应用于分离食品、药物、化学和水工业、或任何其他工业中任何感兴趣的蛋白。可以适合通过本发明进行分离的蛋白包括:抗体;非抗体蛋白;免疫球蛋白;免疫球蛋白样蛋白;非人类生长因子;酶;激素;细胞因子;Fc- 衍生的蛋白;以及重组抗原。其他候选者包括:粒细胞集落刺激因子(GCSF)、干细胞因子、瘦蛋白、造血因子、非人类生长因子、抗肥胖因子、营养因子、抗炎性因子、任何这些蛋白的受体或可溶的受体、酶、变体、衍生物、或类似物。其他实例包括:胰岛素、胃泌素、催乳激素、促肾上腺皮质激素(ACTH)、促甲状腺激素(TSH)、促黄体激素(LH)、促滤泡素(FSH)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、促胃动素、干扰素(α 、 β 、 γ 、 ω)、白细胞介素(IL-I 至 IL-12)、肿瘤坏死因子(TNF)、肿瘤坏死因子结合蛋白(TNF-bp)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经胶质源性神经营养因子(GDNF)、神经营养因子 3 (NT3)、成纤维细胞增长因子(FGF)、神经营养生长因子(NGF)、骨生长因子如骨保护素(OPG)、胰岛素样生长因子(IGFs)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨核细胞衍生生长因子(MGDF)、角质形成细胞生长因子(KGF)、促红细胞生成素、血小板生成素、血小板衍生生长因子(PGDF)、集落刺激生长因子(CSF)、骨形态发生蛋白(BMP)、超氧化物歧化酶(SOD)、尿激酶、溶栓酶、或激肽释放酶、任何这些蛋白的受体或可溶受体、酶、变体、衍生物、或类似物。其他实例包括:清蛋白、血清白蛋白、胰岛素、核糖核酸酶 A、肌红蛋白、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶原、血红蛋白、己糖激酶、免疫球蛋白 G、RNA 聚合酶、DNA 聚合酶、载脂蛋白 B、谷氨酸脱氢酶、脂蛋白、糖蛋白、磷蛋白、血红素蛋白、黄素蛋白以及金属蛋白。在某些优选的实施方案中,适合用本发明进行分离的蛋白包括:乳铁蛋白、乳过氧化物酶以及木瓜蛋白酶。在本发明的某些具体实施方案中,该蛋白是乳铁蛋白。

[0140] 本发明的一个特征在于,可电离的基团是通过并入具有可电离的化学基团的单体单元作为温度响应型共聚物的一部分而提供的(即不是来自或通过羟基聚合物基质颗粒的改性)。这是不同于其他方法,在这些方法中可能存在将基质颗粒进行独立的改性以提供不依赖于温度响应型共聚物的可电离的基团。例如,在用聚(N- 异丙基丙烯酰胺 - 共聚 - 叔丁基丙烯酰胺 - 共聚 - 丙烯酸) 功能化的琼脂糖颗粒的情况下,可电离的基团是由聚合物中的丙烯酸单体单元来提供的、而不是由琼脂糖基质颗粒的直接改性而提供的。

[0141] 用具有一个比例的可电离的化学基团的温度响应型共聚物功能化的聚合物颗粒对于食物、药物、化学、水以及其他工业中所采用的碱清洗条件可以是稳定的。此外,可以将聚合物颗粒的性质进行改变以适应过程变量,如极端的 pH 或溶质的高浓度。

[0142] 实例

[0143] 材料

[0144] 交联的琼脂糖(agarose) 颗粒(Sepharose® 6 Fast Flow) 是从 Pharmacia Biotech (Sweden) 得到,乳铁蛋白样品是由 Food Science Australia (Werribee) 提

供的。*N*-异丙基丙烯酰胺(97%)、叔丁基丙烯酰胺(97%)、丙烯酸($\geq 98\%$)、1-(乙氧碳酰基)-2-乙氧基-1,2-二氢-喹啉($\geq 99\%$)、4,4'-偶氮双(4-氰戊酸)($\geq 98\%$)、*N,N*-二甲基甲酰胺($\geq 99.8\%$)以及*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺($\geq 98\%$)是从 Sigma Aldrich (USA) 得到的。

[0145] 本发明的交联的琼脂糖颗粒的制备

[0146] 使用*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)作为溶剂并且1-(乙氧碳酰基)-2-乙氧基-1,2-二氢喹啉(EEDQ)作为缩合剂(从 Yakushiji *et al.*, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 1125 - 1130 调整而得),将一种聚合引发剂4,4'-偶氮双(4-氰戊酸)(ACV)共价地固定到氨基功能化的 Sepharose 6 FF 上。通过自由基聚合,使用*N*-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm)、丙烯酸(AAc)以及叔丁基丙烯酰胺(tBAAm)作为单体并且*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺(MBBA)作为交联剂,将一种交联的聚合物基质在 ACV 固定的 Sepharose 上发展。这些颗粒表示为 ItBA。

[0147] 以下描述了合成步骤的细节

[0148] 1. Sepharose 6 FF 的氨基功能化

[0149] 1.1 用环氧氯丙烷活化 Sepharose 6 FF

[0150] 将 Sepharose 6 FF (100 g) 收集到烧结的玻璃漏斗上并且用蒸馏水($5 \times$ 湿凝胶的体积)洗涤。将洗过的凝胶抽吸干燥并且转移到一个 500 mL Schott 瓶中。加入含有 NaBH_4 (0.187 g) 的 2 M NaOH 溶液(100 mL),并且在速度为 175 rpm 的一个摇动平台上将该悬浮液在 28°C 下混合 2h。将环氧氯丙烷(60 mL)加入到凝胶浆料中,然后将其在 28°C 下在速度为 175 rpm 的一个摇动平台上混合另一个 21 h。然后通过真空过滤将环氧化物活化的凝胶进行收集并且用蒸馏水进行洗涤。

[0151] 1.2 将环氧化物活化的 Sepharose 与氨偶联

[0152] 将环氧化物活化的 Sepharose 6 (95 g) 收集到烧结的玻璃漏斗上并且用蒸馏水($5 \times$ 湿凝胶的体积)洗涤。将洗过的凝胶抽吸干燥并且转移到一个 500 mL Schott 瓶中。加入 2 M 氨水溶液(95 mL)。将浆料在 28°C 下在一个摇动平台上混合 21 h。通过真空过滤将胺化了的 Sepharose 凝胶进行收集并且用大量的蒸馏水进行洗涤直到滤液的 $\text{pH} < 8$ 。然后将该凝胶贮存在 4°C 的 20% v/v 水性乙醇中直到进一步的使用。

[0153] 2. 聚合引发剂的固定化

[0154] 在一个 500 mL 的 3 口圆底烧瓶中,将 ACV (20.25 mmol, 5.67 g) 以及 EEDQ (40.5 mmol, 10.01 g) 溶解在 DMF (270 mL) 中。将氨基功能化的 Sepharose (90 g) 分别用 50%、75% 以及 100% 乙醇(各 100 mL)进行洗涤。将该凝胶加入到含有 ACV 和 EEDQ 的溶液中。通过鼓泡氮气 45 min,随后施加真空(3 min),将该浆料混合物脱气。然后在不断使用一个 IKA® 顶置式搅拌器(RW20, IKA Labortechnik)的恒定搅拌下将该偶联反应在 25°C 下在氩气氛下进行 6 h。将 ACV 固定的凝胶收集在烧结的玻璃漏斗上并且用 DMF 和乙醇进行洗涤。然后将该凝胶贮存在 4°C 的 20% v/v 水性乙醇中直到进一步的使用。

[0155] 3. 聚合物基质在 ACV 固定的 Sepharose 上的发展

[0156] 在一个 250 mL 的 3 口圆底烧瓶中,将 NIPAAm(112.5 mmol, 12.73 g)、tBAAm(6.25 mmol, 0.79 g)、AAc (6.25 mmol, 0.43 mL) 以及 MBBA (1.25 mmol, 0.19 g) 溶解在乙醇(125 mL)中。将 ACV 固定的 Sepharose FF(25 g, 分别用 20%、50%、75% 以及 100% 乙醇进行洗涤) 加入到该溶液混合物中。通过鼓泡氮气 30 min,随后施加真空(3 min),将该混合物脱气。

在不断使用一个 IKA®顶置式搅拌器的恒定搅拌下将该聚合反应在 80℃下在氩气氛中进行 16 h。将该凝胶收集在烧结的玻璃漏斗上并且分别用 100%、75%、50%、20% 乙醇并且最后用冷水进行洗涤。然后将该凝胶贮存在 4℃的 20% v/v 水性乙醇中直到进一步的使用。

[0157] 3.1 使用 ^1H NMR 对 ItBA 进行表征

[0158] 从使用一台 Bruker 400 MHz NMR 分光计(使用 CDCl_3 作为溶剂)而得到的 ^1H -NMR 光谱数据估算了共聚物中的 NIPAAm 与 tBAAm 之比。使用来自颗粒功能化过程中得到的上清液的游离共聚物得到了 ^1H NMR 光谱。 CDCl_3 中的游离共聚物的 ^1H NMR 光谱证实了游离共聚物中的 NIPAAm 与 tBAAm 之比为 23 : 2。假定所检测的溶液中的游离共聚物的构成与固定到树脂上的共聚物的构成相似, ItBA 树脂上的单体的比例(NIPAAm:tBAAm:AA)可以估计为 86 : 8 : 6, 该比例与聚合反应过程中采用的单体比例(90 : 5 : 5)相似。

[0159] 3.2 使用元素分析对 ItBA 进行表征

[0160] 使用元素氮分析(Carlo Erba Elemental Analyser EA 1108, Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy)测定了 ItBA 的总共组合的 NIPAAm 和 tBAAm 含量。使用这种分析, ItBA 中存在的 NIPAAm 和 tBAAm 的组合含量被测定为是 $2060 \pm 62 \mu\text{mol/g}$ 的冻干的凝胶。

[0161] 3.3 使用 UV 可见光谱对 ItBA 的 LCST 进行表征

[0162] 通过在 500 nm 处在 24℃与 38℃之间使用一个 UV/可见分光计(SpectraMax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)与一个温度控制的比色杯腔测量 0.5% (w/w) 水性共聚物溶液的透光度, 测定了共聚物的较低临界溶解温度。被表征的共聚物是来自颗粒功能化过程中得到的上清液。

[0163] 通过研究来自颗粒功能化过程中得到的上清液的共聚物的透光性, 估算了 ItBA 的 LCST。当将聚合物溶液经历一个温度梯度时, 通过观察共聚物溶液的透光性为最大值的 50% 时的温度, 测定了 LCST。在反应溶液中产生的游离(大批)ItBA 共聚物(聚(NIPAAm-共聚-AAc-共聚-tBAAm))的 LCST 被发现为是处于 30℃。假定 ItBA 内的共聚物的构成与反应溶液中的游离种类的构成相似, ItBA 树脂上的共聚物的 LCST 应该大约为 30℃。

[0164] 4. CM Sepharose 的生产方法

[0165] 将 Sepharose 6 FF (15 g)收集到烧结的玻璃漏斗上并且用蒸馏水($5 \times$ 湿凝胶的体积)洗涤。将洗过的凝胶抽吸干燥并且转移到一个 50 mL falcon 管中。将 11M NaOH (15 mL)加入到管中并且使用一个旋转轮(Ratek, Australia)在 28℃下混合 45 min。然后, 将 1.4 M 氯乙酸(15 mL)加入到管中并且混合另外的 3 h。最终通过真空过滤将该树脂进行收集并且用大量的蒸馏水进行洗涤直到滤液的 pH < 8。然后将该凝胶贮存在 4℃的 20% v/v 水性乙醇中直到进一步的使用。将羧甲基改性的 Sepharose 6 FF 指定为 CM。

[0166] 5. 使用碱滴定对 ItBA 和 CM 进行表征

[0167] 通过将树脂用 0.02 M NaOH 进行滴定并且使用一个 Metrohm 自动滴定剂(Metrohm Titrando 808, Switzerland)监测 pH, 测定了被发展的树脂上的酸基团浓度。连接到树脂上的酸基团的浓度被报道为 $\mu\text{mol/g}$ 冻干的树脂。

[0168] ItBA 和 CM 树脂上的酸性基团的浓度分别为 $154 \pm 7 \mu\text{mol/g}$ 冻干的凝胶以及 $171 \pm 4 \mu\text{mol/g}$ 冻干的凝胶。

[0169] 6. 在蛋白分离中使用温度响应型琼脂糖颗粒

[0170] 6.1 平衡吸附等温线

[0171] 6.1a 对于乳铁蛋白的吸附等温线

[0172] 为了证明发展的热响应阳离子交换树脂(ItBA)在低温和高温下有差别地截留的有效性,在 20°C 和 50°C (图 1) 下用 ItBA 测定了对于乳铁蛋白的平衡吸附等温线。作为一个对照实验,还得到了对于具有与 ItBA 类似的离子交换能力的羧甲基 Sepharose (CM) 的平衡吸附等温线。

[0173] 对于 CM,在 20°C 和 50°C 下的吸附等温线之间不存在显著差异。在 20°C 和 50°C 下,对于 CM 的 $B_{\max}$ 值分别是 76 ± 2 mg/mL 和 78 ± 2 mg/mL。对于 ItBA,在 20°C 和 50°C 下的吸附等温线之间存在显著差异,并且在 50°C 下的 $B_{\max}$ 值(24 ± 2 mg/mL)比 20°C 下的 $B_{\max}$ 值(68 ± 2 mg/mL)大约高三倍(图 1)。在 50°C 下在 $B_{\max}$ 上所观察到的增加表明 ItBA 用作一种热响应离子交换树脂的潜力。

[0174] 6.1b 对于乳过氧化物酶的吸附等温线

[0175] 乳过氧化物酶同样用于测定与上述方法制备的 ItBA 的吸附等温线。在 10 mM 磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中制备了乳过氧化物酶溶液(1 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL、以及 40 mg/mL)。将 500 μ l 等分部分与 0.05 g 样品在 20°C 或 50°C 下混合 35 min。将用于在 50°C 下培育的蛋白溶液和树脂样品在混合之前预先平衡到 50°C。

[0176] 然后允许混合物在 20°C 或 50°C 下沉降 10 分钟并且将上清液去除。将上清液在 $15,000 \times g$ 下离心 3 min。通过测量 280 nm 处的吸光度,测定上清液中的乳过氧化物酶浓度。然后从吸附等温线计算了最大截留能力 $B_{\max}$ 。图 2 中的吸附等温线是三次实验的平均值,每次使用不同批次的树脂。

[0177] 可以看出,在 20°C 和 50°C 下用 ItBA 的乳过氧化物酶的吸附等温线之间存在显著差异。 $B_{\max}$ 值分别是 11 ± 5.8 mg/mL 以及 37 ± 5.7 mg/mL (图 2)。

[0178] 6.1c 对于木瓜蛋白酶的吸附等温线

[0179] 木瓜蛋白酶同样用于测定与上述方法制备的 ItBA 的吸附等温线。对于木瓜蛋白酶的吸附等温线是类似于乳过氧化物酶进行制备的,除了在 50°C 下培育的样品在混合之前没有被预先平衡在 50°C。然后从吸附等温线计算了最大截留能力 $B_{\max}$ 。图 3 中的吸附等温线是三次实验的平均值,对于每次实验使用不同批次的树脂。

[0180] 在 20°C 和 50°C 下的木瓜蛋白酶的 ItBA 吸附等温线之间存在差异。对于 20°C 和 50°C, $B_{\max}$ 值分别是 28.9 ± 4.4 和 36.9 ± 4 (图 3)。

[0181] 6.2 不同盐浓度下的截留

[0182] 6.2a 在不同盐浓度下 ItBA 和 CM 之间的比较性研究

[0183] 盐的存在使得蛋白与树脂上的离子交换基团之间的静电相互作用中断,由此减小了离子交换剂对于蛋白吸附的速率和能力(Yamamoto, *et al.* 1988)。盐的存在已知没有减小疏水性相互作用。为了更好地理解乳铁蛋白与树脂之间的相互作用机理,在不同的盐浓度下进行了截留研究。结果示于图 4 中。

[0184] 在 CM 的情况下,在低温和高温下的截留曲线之间不存在显著差异。在两者的温度下,0.1 M 的或更高浓度的 NaCl 溶液几乎完全抑制了乳铁蛋白到 CM 的截留。这意味着在 20°C 和 50°C 两者下,存在 CM 与乳铁蛋白之间的离子相互作用。

[0185] 当改变盐浓度时,ItBA 在 20°C 和 50°C 下显示出显著不同的截留行为。在 20°C 下,

在 0.1 M 下观察到几乎完全抑制了乳铁蛋白截留,这意味着在较低的温度下离子相互作用是对于蛋白截留到树脂上的主要作用力。然而,在 50°C 下,为了达到显著降低被树脂截留的蛋白的量,0.25 M 或更高浓度的 NaCl 是必需的,这意味着在高温下,树脂与蛋白之间存在较强的离子相互作用。此外,在 50°C 和 1 M NaCl 下,仍然存在蛋白的截留。这表明,即使离子相互作用是主要的作用力,存在其他的对于蛋白的截留有影响的作用力,它可能是蛋白的疏水区与坍塌的疏水性聚合物基质之间的疏水性相互作用。

[0186] 6.2b 低盐浓度对由 ItBA 的乳铁蛋白截留的影响

[0187] 通过将含有 20 mM 或大约 13 mM 钠的乳铁蛋白与树脂(0.05 g)在 20°C 和 50°C 下混合 35 min,研究了在钠浓度上的少量差别对乳铁蛋白到 ItBA 的静态截留的影响。然后允许混合物在 20°C 或 50°C 下沉降 10 分钟并且将上清液去除。将上清液在 15,000 × .25 g 下离心 3 min。通过测量 280 nm 处的吸光度,测定上清液中的乳铁蛋白浓度。然后从吸附等温线计算了最大截留能力 $B_{\max}$ 。

[0188] 在 20°C 和 50°C 下,在大约 13 mM 的钠浓度下由 ItBA 的乳铁蛋白的截留比在 20 mM 的钠浓度下的更大(图 5)。因此,在 20°C 和 50°C 两者下,更低的钠浓度增加了树脂的最大截留能力。

[0189] 6.3 乳铁蛋白的动态截留和洗脱

[0190] ItBA 的一个最有希望的应用涉及在 50°C 下接触目标蛋白的溶液,导致目标蛋白的截留,并且仅仅通过将温度降到 20°C 将一个比例的所截留的材料释放。

[0191] 将树脂装到 PEEK 柱(100 × 4.6mm 内径)中并且在 20°C 和 50°C 下研究乳铁蛋白的动态截留和释放特征。用于动态研究的系统是一台 Waters 2525 HPLC 泵、Waters 2767 样品管理器以及 Waters 二极管阵列检测器。通过将一根螺旋金属管(热交换区)和该柱浸入一个设定在所需温度的水浴中而维持了该柱的温度。所采用的水性流动相是 pH 6.5 磷酸盐缓冲液或 1 M NaCl。

[0192] 图 6 中的色谱图和表 1 中的数据展示了 ItBA 树脂截留乳铁蛋白并且然后通过降低温度释放大比例的所截留的乳铁蛋白的潜力。在发展的树脂的动态截留和释放研究中,发现对于 CM,在三个不同测试条件(A - 在 20°C 下接触并且在 20°C 下洗脱;B - 在 50°C 下接触并且在 20°C 下洗脱,以及 C - 在 50°C 下接触并且在 50°C 下洗脱)下的色谱图之间不存在显著差异。温度对蛋白到 CM 上的截留和释放的影响是不显著的。然而,对于 ItBA,在三个不同条件下的色谱图是明显不同的。当接触温度从 20°C 增加到 50°C 时,树脂的截留能力显著地改进。当将蛋白在 50°C 下接触时,通过将柱温降低到 20°C,几乎 50% 的所截留的蛋白可以被洗脱。当在 50°C 下进行释放时,需要更高浓度的 NaCl 以释放大数目的所截留的蛋白,这表明在 50°C 下,树脂与被分析物之间存在更强的相互作用。

[0193]

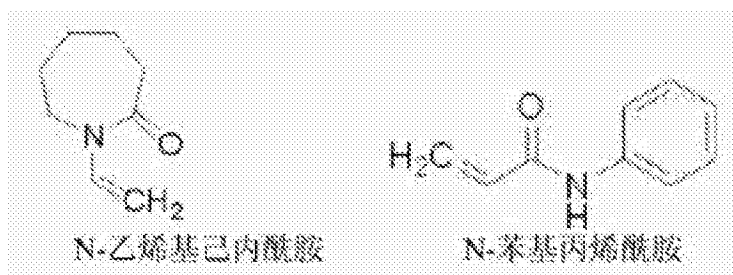
表 1- 使用 CM 或 HBA, 在动态截留和释放之后在不同部分中收集的蛋白 (乳铁蛋白) 的百分比

在不同的收集部分中所注入的乳铁蛋白 (28mg) 的%						
时间	通过流	温度变化	0.1 M NaCl	1 M NaCl	再平衡	总回收
	0-12 min	12-22 min	23-33 min	35-45 min	47-59 min	
CM						
在 20°C 下接触并且 20°C 下洗脱	6	1	89	3	0	99
在 50°C 下接触并且 20°C 下洗脱	9	1	88	2	0	100
在 50°C 下接触并且 50°C 下洗脱	7	0	86	7	0	100
HBA						
在 20°C 下接触并且 20°C 下洗脱	71	7	16	5	0	99
在 50°C 下接触并且 20°C 下洗脱	4	47	39	4	1	95
在 50°C 下接触并且 50°C 下洗脱	6	1	40	43	1	92

[0194] 7. 温度响应型琼脂糖颗粒的替代的配制品

[0195] N- 乙基己内酰胺也是一种单体, 它用于制造具有与 N- 异丙基丙烯酰胺聚合物类似的 LCST 值的温度响应型聚合物。它是可以用于制造温度响应型离子交换树脂的 N- 异丙基丙烯酰胺的一种更便宜的替代物。当与共聚单体叔丁基丙烯酰胺和甲基丙烯酸丁酯相比时, N- 苯基丙烯酰胺是一种更疏水的单体。N- 苯基丙烯酰胺也可以被用作一种共聚单体用来生产具有改进的温度敏感性和截留能力的温度响应型离子交换树脂。

[0196]



[0197] 通过使用 N- 乙炔基己内酰胺作为温度响应型单体,探索了以经济的方式制造温度响应型离子交换树脂的可能性。还探索了 N- 苯基丙烯酰胺作为一种共聚单体用来生产具有改进的温度敏感性和截留能力的温度响应型离子交换树脂的用途。如以上所述制造 ItBA。然而,在制造过程中,用 N- 乙炔基己内酰胺替代了 NIPAAm 以制作基于琼脂糖的聚(N- 乙炔基己内酰胺 - 共聚 -N- 叔丁基丙烯酰胺 - 共聚 - 丙烯酸)(CtBA)。在一个第二制造过程中,将 tBAAm 从配制品中去除并且被更亲水的(hydrophilic)单体 NIPAAm 代替从而制作基于琼脂糖的聚(N- 异丙基丙烯酰胺 - 共聚 - 丙烯酸)(IA)。在一个第三制造过程中,tBAAm 被更疏水的单体 N- 苯基丙烯酰胺替代从而制作基于琼脂糖的聚(N- 异丙基丙烯酰胺 - 共聚 -N- 苯基丙烯酰胺 - 共聚 - 丙烯酸)(IPhA)。使用一种静态截留方法检测了聚合物构成的改变对乳铁蛋白截留曲线的影响。将树脂(0.1 g)与乳铁蛋白溶液(1 mL 的 5 mg/mL)在 4°C 与 50°C 之间的温度下混合 1 h。允许该树脂沉降,并且通过在 280 nm 处测量上清液的吸光度测定了未截留的蛋白的量,这进而给出了通过树脂截留的蛋白的量。结果示于图 7 中。

[0198] 在所有测试温度下,CtBA 截留了多于 95% 的可得的乳铁蛋白。在 4°C 下,所有三种其他树脂(IA、ItBA 和 IPhA)截留了少于 20% 的可获得的乳铁蛋白。在 50°C 下,相同的三种树脂截留了 80% 的或更多的可获得的乳铁蛋白。在这些温度响应型树脂之中,IA 在所有温度下截留了最少量的乳铁蛋白,而 IPhA 在所有温度下截留了最大量的乳铁蛋白。此外,IPhA 在最低温度(40°C)下达到了最大截留状态。这些结果表明,(a) 乳铁蛋白的 CtBA 截留在所研究的条件下不是温度响应型的,(b) N- 苯基丙烯酰胺可以用于制造基于琼脂糖的温度响应型离子交换树脂,(c) 对于温度响应型离子交换树脂的截留和释放温度可以通过将不同的单体(NIPAAm 或 N- 苯基丙烯酰胺)合并到聚合物结构中来改变。

[0199] 7a . 聚(N-异丙基丙烯酰胺 - 共聚 -N-苯基丙烯酰胺 - 共聚 - 丙烯酸)(IPhA)改性的琼脂糖

[0200] 使用类似于合成 ItBA 的方法,合成了新的树脂。然而,改变了单体的类型和浓度。简言之,将 Sepharose 6 FF 用上述的环氧氯丙烷进行活化。然后通过在此所述的方法将环氧化物活化的琼脂糖(sepharose)使用氨水进行氨基功能化。使用 EEDQ 作为偶联剂并且 DMF 作为溶剂,将自由基聚合引发剂(ACV)固定到氨基功能化的琼脂糖上。最后,以上的表中出现的单体加上交联剂 N, N- 亚甲基双丙烯酰胺(MBBA)的聚合反应在惰性气氛中在 80°C 下进行 16 h。

[0201] 所制备的不同单体的构成在以下作成表:

[0202]

单体	比率	缩写
NIPAAm:AA	95:5	(I5A)

NIPAAm:PhAAm:AA	90:5:5	(IPh5A)
NIPAAm:PhAAm:AA	85:5:10	(IPh10A)

[0203] 对于 I5A, 在 20° C 和 50° C 下得到了乳铁蛋白吸附等温线(图 8), 并且对于 IPh5A 和 IPh10A, 在 4° C 和 50° C 下得到了乳铁蛋白吸附等温线(图 9 和图 10)。使用了以下方法。在 10 mM 磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中制备了乳铁蛋白溶液(1 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL、以及 40 mg/mL), 并且将 1 mL 等分部分与 0.1 g 树脂样品在所要求的温度下混合 35 min。使用物料平衡计算了所截留的乳铁蛋白。然后从吸附等温线计算了最大保留能力 $B_{\max}$ 。

[0204] 对于 I5A, 在 20° C ($B_{\max} = 43$ mg/mL)下和在 50° C ($B_{\max} = 90$ mg/mL)下在吸附等温线和 $B_{\max}$ 值上存在显著差异。这在图 8 中被证实。

[0205] 对于 IPh5A, 在 4° C ($B_{\max} = 14$ mg/mL)下和在 50° C ($B_{\max} = 83$ mg/mL)下在吸附等温线和 $B_{\max}$ 值上存在显著差异(图 9)。对于 IPh10A 也是这种情况, 其中在 4° C ($B_{\max} = 84$ mg/mL)下和在 50° C ($B_{\max} = 133$ mg/mL)下在吸附等温线和 $B_{\max}$ 值上存在显著差异(图 10)。

[0206] 增加进料中的丙烯酸含量引起了树脂的截留能力在高温和低温两者下都增加。然而, 当进料中的丙烯酸含量以及因此结合到树脂上的共聚物的丙烯酸含量增加时, 温度敏感性(高温与低温之间的截留和 $B_{\max}$ 值差异)降低。

[0207] 8. 对于本发明的替代的聚合物颗粒

[0208] 将用于发展 ItBA 的方法适应于发展一种基于 Toyopearl 的温度响应型离子交换树脂(Toyopearl-ItBA)。将 ACV 固定到 Toyopearl® AF-Amino-650M 上并且使用与对于 ItBA 所使用的相同的技术发展聚合物(参见以上)。在 20°C 和 50°C 下, 使用实例 6.1 所采用的静态截留方法检测 Toyopearl-ItBA 的温度响应性。如同 ItBA, 与在 20°C 下相比, Toyopearl-ItBA 在 50°C 下截留了 250% 更多的蛋白(图 11)。这些结果表明, 发展的基于 Toyopearl 的温度响应型离子交换树脂表现出与基于 Sepharose 的温度响应型离子交换树脂的相似的方式。

[0209] 9. ItBA 的分级分离能力

[0210] 使用一种模型乳品乳清蛋白溶液(α -乳清蛋白(13 mg/mL)、 β -乳球蛋白(15 mg/mL)以及乳铁蛋白(27 mg/mL)的一种混合物)检测了 ItBA 的分级分离能力。所采用的研究方法类似于实例 6.3 中所采用的方法。图 12 和 13 中的色谱图显示了该模型蛋白溶液的截留和洗脱曲线。当将该模型蛋白溶液装到 20°C 的柱上时, 大多数蛋白没有被截留并且从柱上洗脱在通过流部分中。然而, 当将该模型蛋白溶液装到 50°C 的柱上时, 50% 的乳铁蛋白被树脂截留, 同时没有 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白被截留。反而, 在通过流部分中, α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白从柱上洗脱在通过流部分中。通过将流动相和柱温从 50°C 降到 20°C, 大多数(52%)的所截留的乳铁蛋白被洗脱。在 20°C 下, 使用 0.1 M NaCl, 大部分剩余的(44%)所截留的乳铁蛋白从柱上洗脱(参见表 2 & 3)。这些结果表明, ItBA 在 20°C 下截留了最小量的阳离子的和阴离子的蛋白, ItBA 在 50°C 下能够有选择地截留阳离子的蛋白(例如乳铁蛋白)并且然后随着温度变化(例如降到 20°C)和盐能释放大多数所截留的阳离子的蛋白。

[0211] 表 2 - 在 20°C 下在各个洗脱部分中各蛋白作为装到 ItBA 柱上的各蛋白的总量的

百分比的量。随后在 20℃ 下洗脱并且然后 NaCl 梯度从 0 M 到 1 M。

[0212]

	通过流	温度 变化	0 - 0.1 M NaCl	0.1 - 1 M NaCl	再平衡
时间	0-12 min	12-22 min	22-52 min	52-66 min	66-76 min
α -乳清蛋白	100	0	0	0	0
乳铁蛋白	99	0	1	0	0
β -乳球蛋白	100	0	0	0	0

[0213] 表 3 - 在 50℃ 下在各个洗脱部分中各蛋白作为装到 ItBA 柱上的各蛋白的总量的百分比的量,随后在 20℃ 下洗脱并且然后 NaCl 梯度从 0 M 到 1 M。

[0214]

	通过流	温度 变化	0 - 0.1 M NaCl	0.1 M - 1 M NaCl	再平衡
时间	0-12 min	12-22 min	22-52 min	52-66 min	66-76 min
α -乳清蛋白	100	0	0	0	0
乳铁蛋白	48	25	21	2	0
β -乳球蛋白	100	3	0	0	0

[0215] 10. 细胞色素 C 的截留

[0216] 为了研究在 20℃ 和 50℃ 下其他碱性蛋白被 ItBA 的截留曲线,使用细胞色素 C(pI: 10-10.5)进行了静态截留实验。将 ItBA (0.1 g) 与细胞色素 C 溶液(1mL 的 5 mg/mL)在 20℃ 与 50℃ 的温度下混合 1h。允许该树脂沉降,并且通过在 280 nm 处测量上清液的吸光度测定了未截留的蛋白的量,这进而给出了通过树脂截留的蛋白的量。发现,与在 20℃ 下相比,ItBA 在 50℃ 下截留了多 50% 的细胞色素 C (图 14)。

[0217] 11. 蛋白截留以及从 ItBA 释放的研究

[0218] 使用一种纯的乳铁蛋白溶液(0.9 mg/mL 至 45 mg/mL)、一种含有乳清蛋白和乳铁蛋白的纯的乳清溶液(0.2 mg/mL 至 21.8 mg/mL)以及一种含有浓缩的乳清蛋白(大约 10 倍浓度)和乳铁蛋白的浓缩的乳清溶液(0.6 mg/mL 至 22.2 mg/mL),进一步检测了 ItBA 的动态的乳铁蛋白截留特征。所采用的方法类似于实例 6.3 中所采用的方法,然而,接触仅在 50℃ 下进行并且释放是在 20℃ 下用 0.1M NaCl 进行。

[0219] 图 15 中的色谱图显示了所检测的蛋白溶液的截留和洗脱曲线。从这些色谱图所明显的是,当单独存在、在新鲜的乳清中或在浓缩的乳清中时,乳铁蛋白被 ItBA 截留并且可以被 ItBA 释放。当在没有其他蛋白存在下,将 0.9 mg 至 45 mg 的乳铁蛋白装到柱上,大于 95% 的装入的乳铁蛋白被截留(图 16)。所截留的乳铁蛋白的百分比没有平台,这表明该树脂没有达到完全截留能力(图 16)。当存在乳清蛋白(处于它们的正常浓度)下,将 0.2 mg 至 21.8 mg 的乳铁蛋白装到柱上,大于 70% 的装入的乳铁蛋白被截留(图 17)。在进料中的乳铁蛋白的量与被截留的乳铁蛋白的量之间还存在一种非常线性的关系,再次表明了该树脂没有达到完全截留能力(图 17)。当存在浓缩的乳清蛋白(大约浓缩 10 倍)下,将 0.6 mg 至 22.2 mg 的乳铁蛋白装到柱上,大约 50% 的装入的乳铁蛋白被截留(图 18)。当使用浓缩

的乳清时同样观察到了在进料中的乳铁蛋白的量与被截留的乳铁蛋白的量之间的一种线性的关系(图 18)。

[0220] 这些结果表明,ItBA 截留了乳铁蛋白,单独地以及在乳清蛋白(处于它们的正常浓度并且当浓缩到大约 10 倍时)的存在下。

[0221] 最后,将理解到,在没有偏离本发明的范围和精神下,在此所述的本发明的方法和组合物的不同的改变和变体对于本领域的普通技术人员将是清楚的。虽然已经与具体的优选实施方案相关地描述了本发明,应理解到,所要求的发明不应该过度地限于这些具体实施方案。的确,对于本领域的普通技术人员清楚的用于进行本发明的所描述的模式的不同改变旨在处于本发明的范围之内。

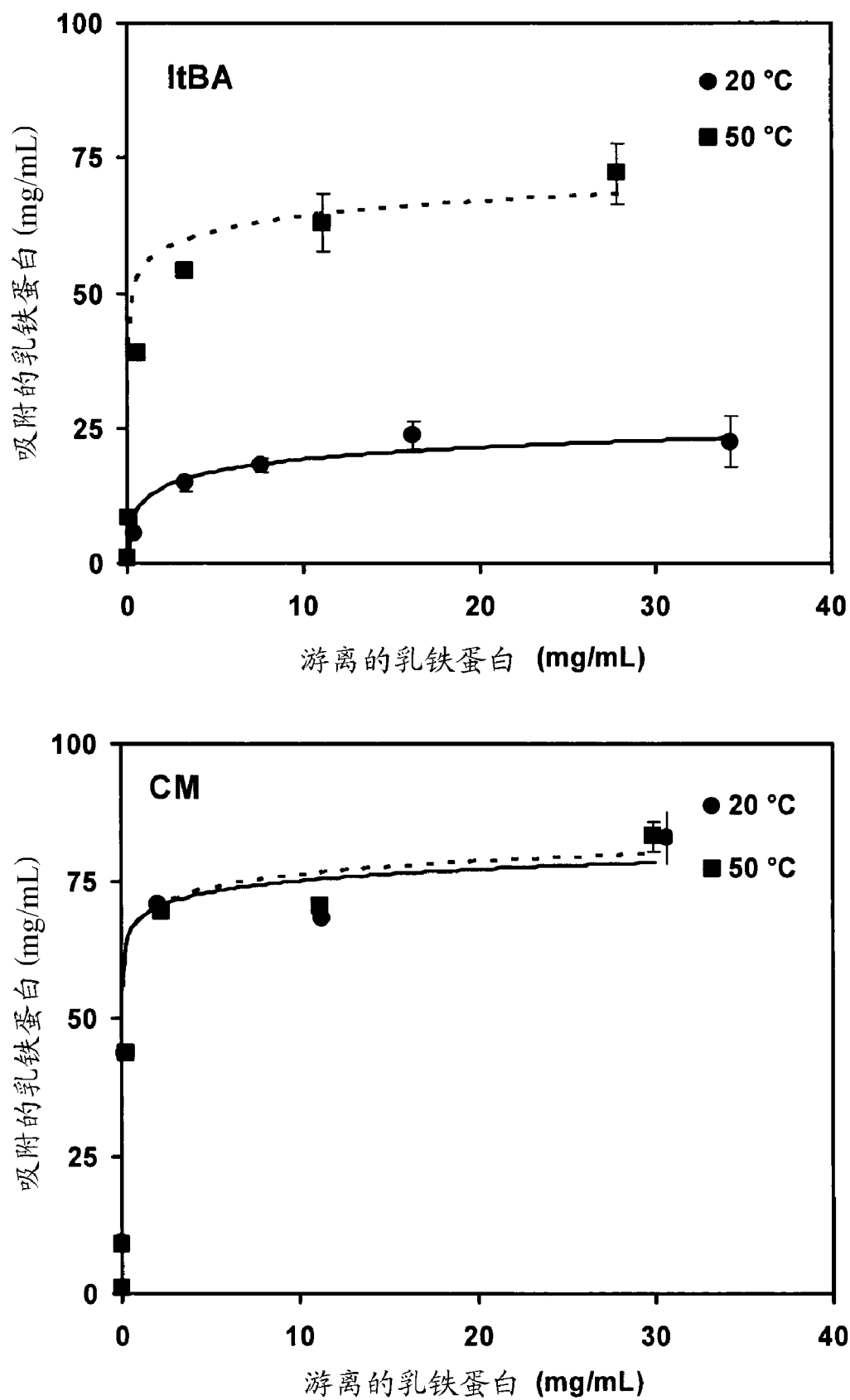


图 1

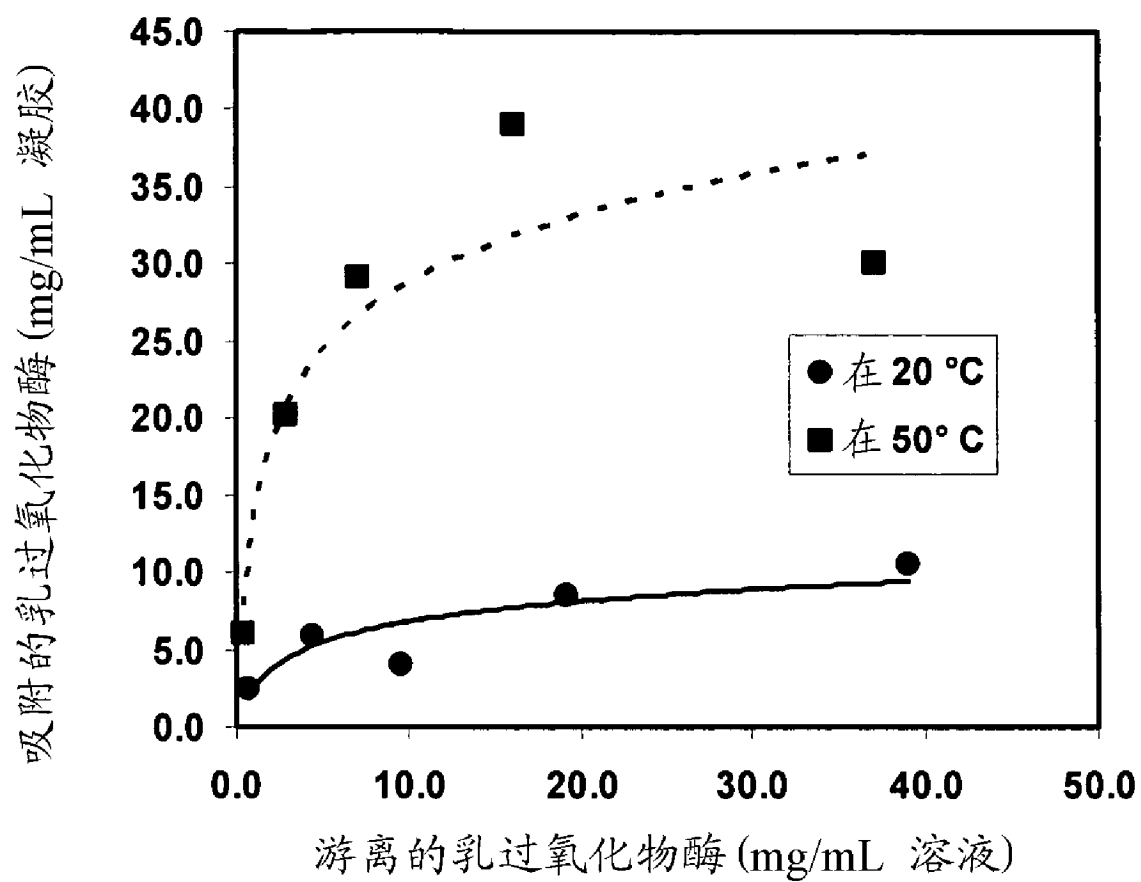


图 2

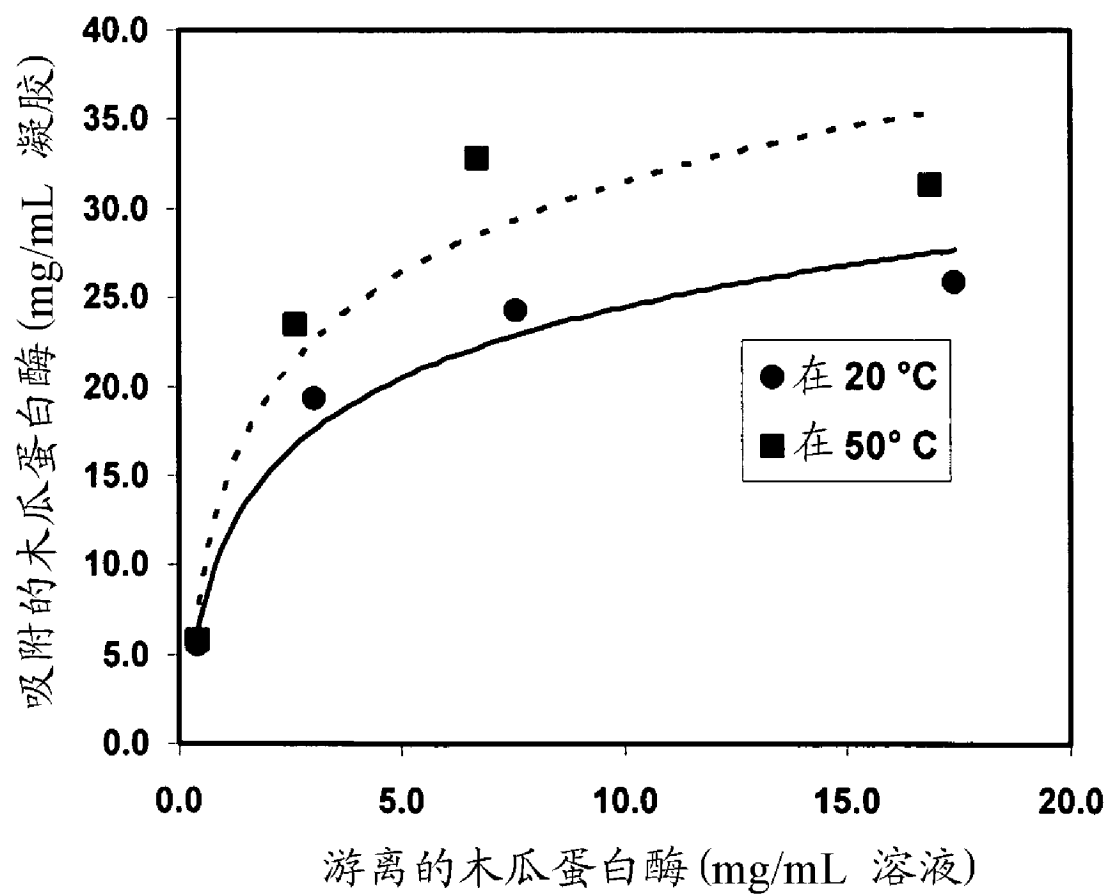


图 3

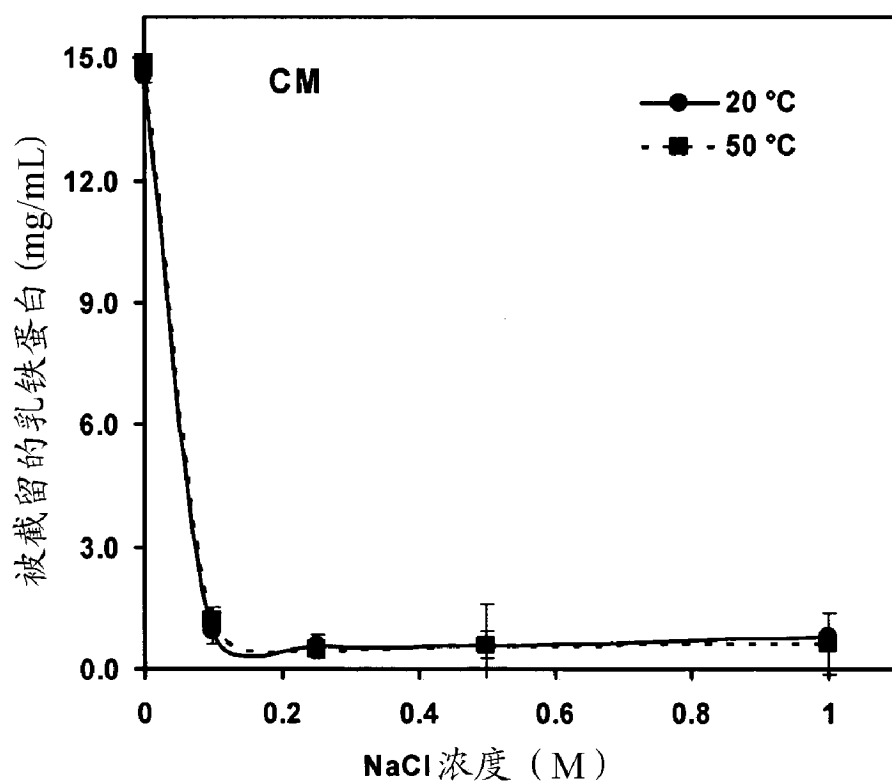
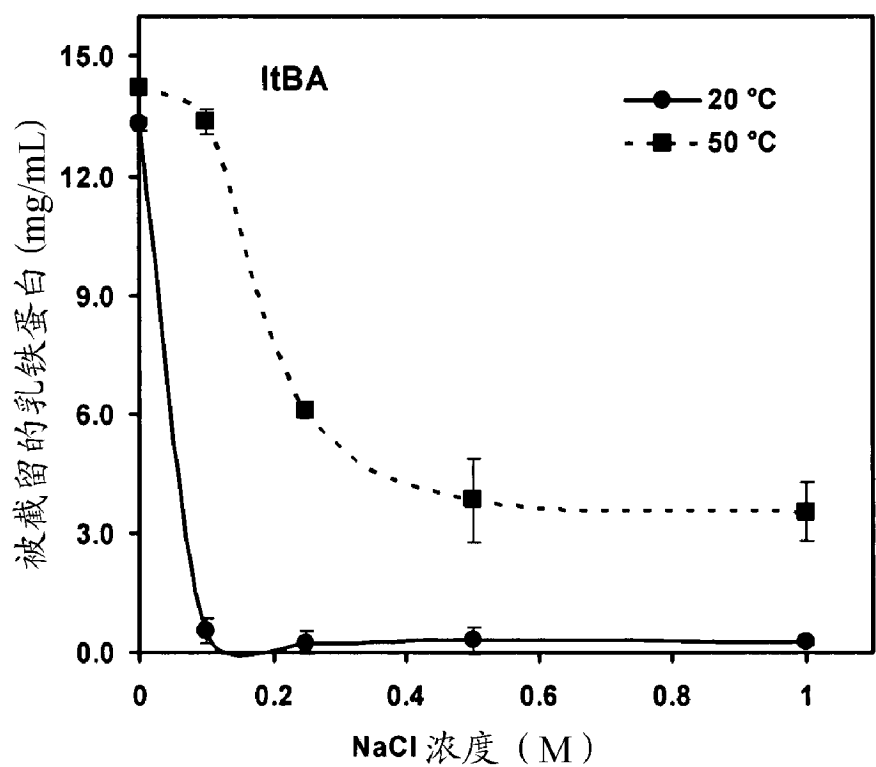


图 4

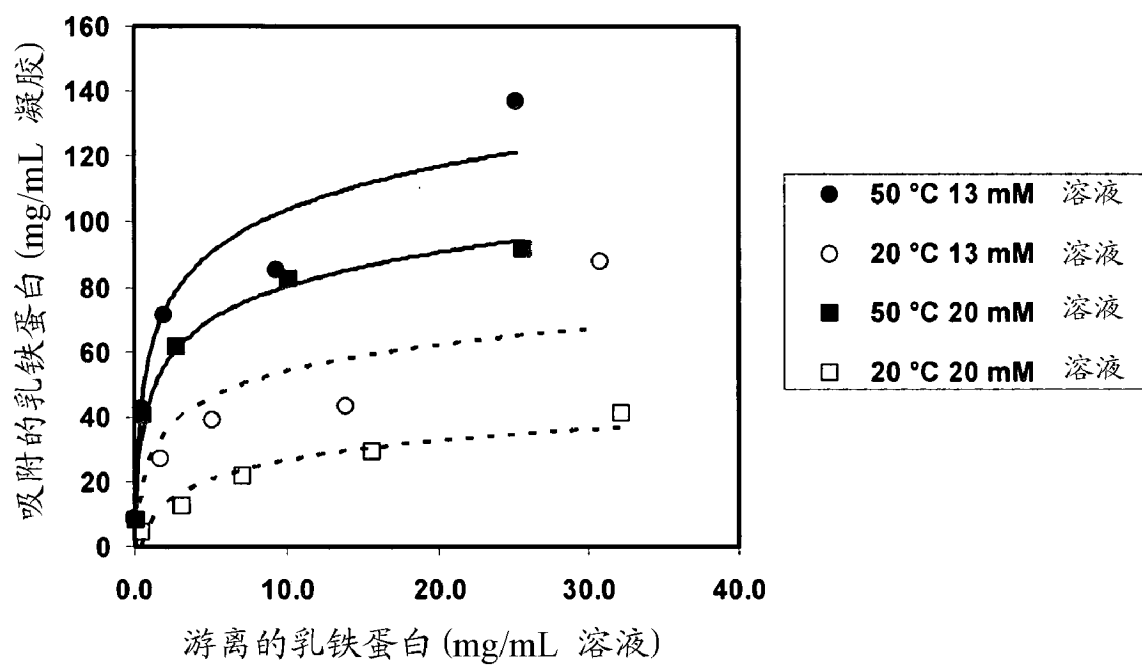


图 5

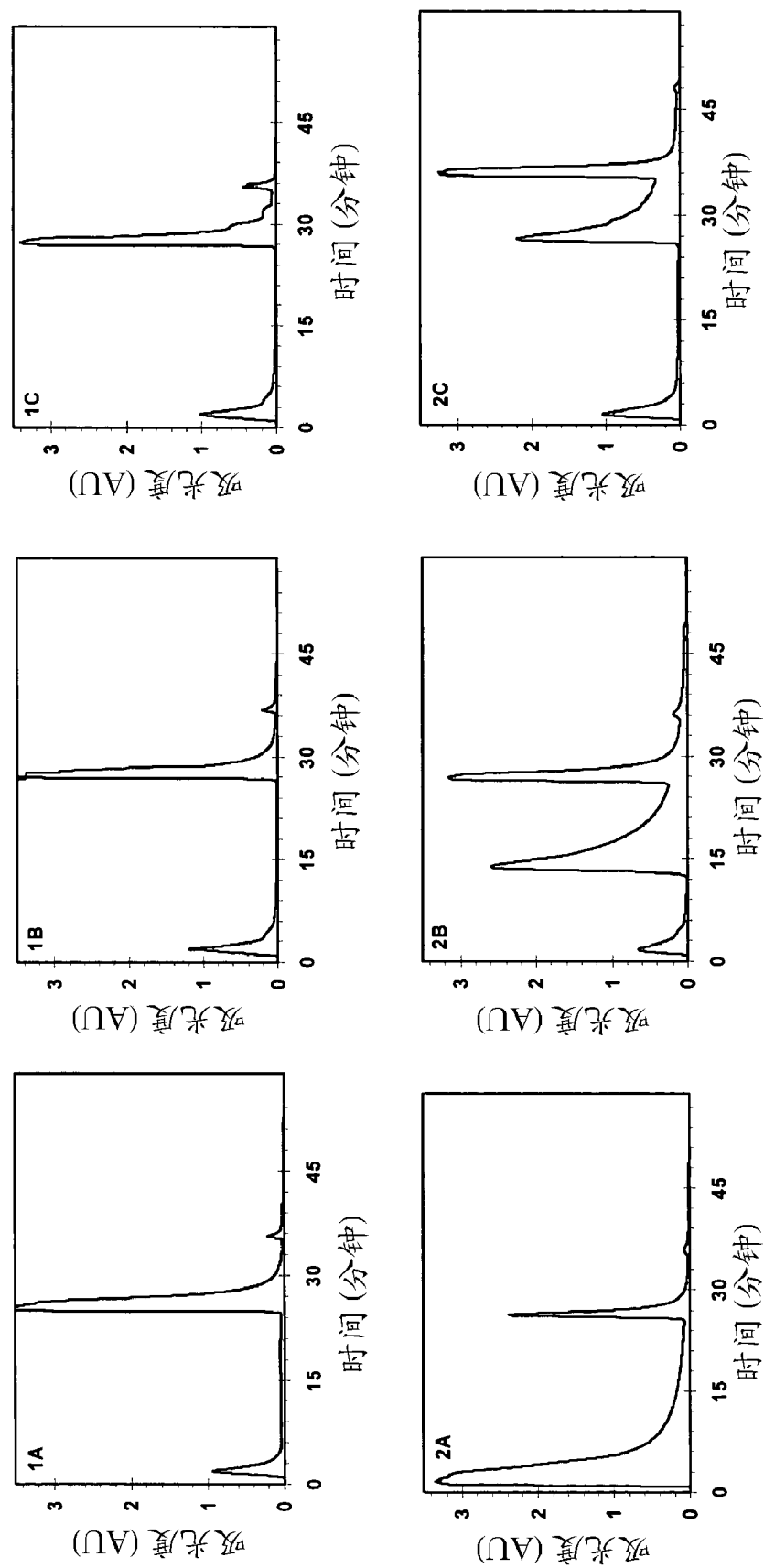


图 6

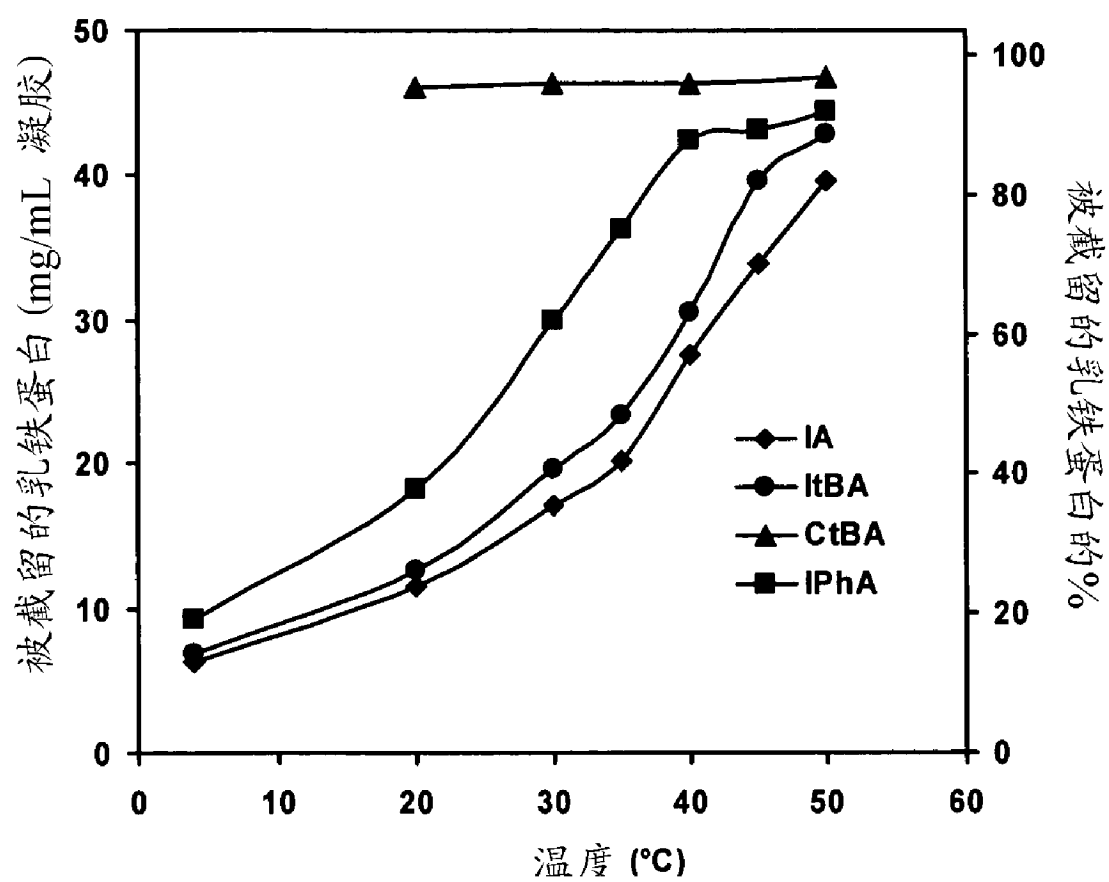


图 7

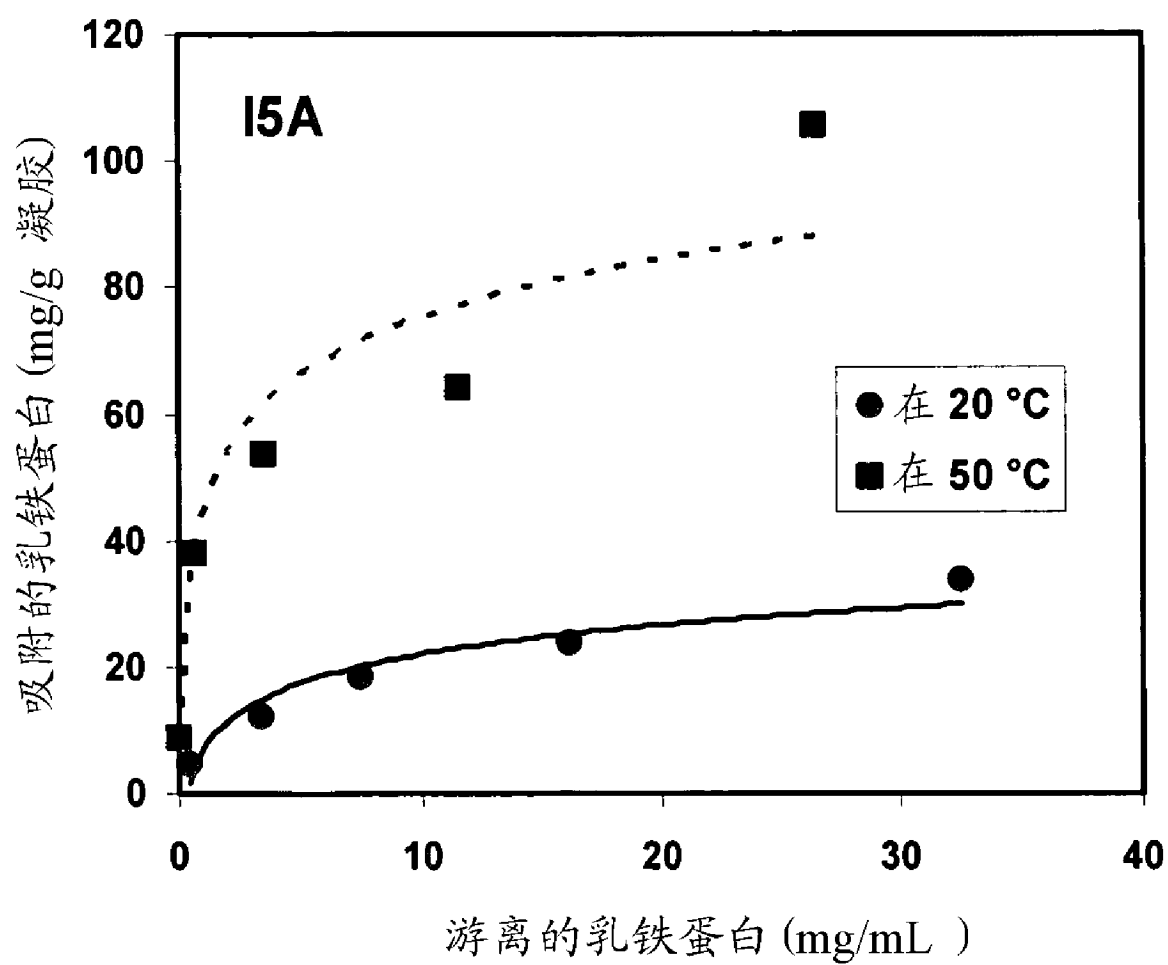


图 8

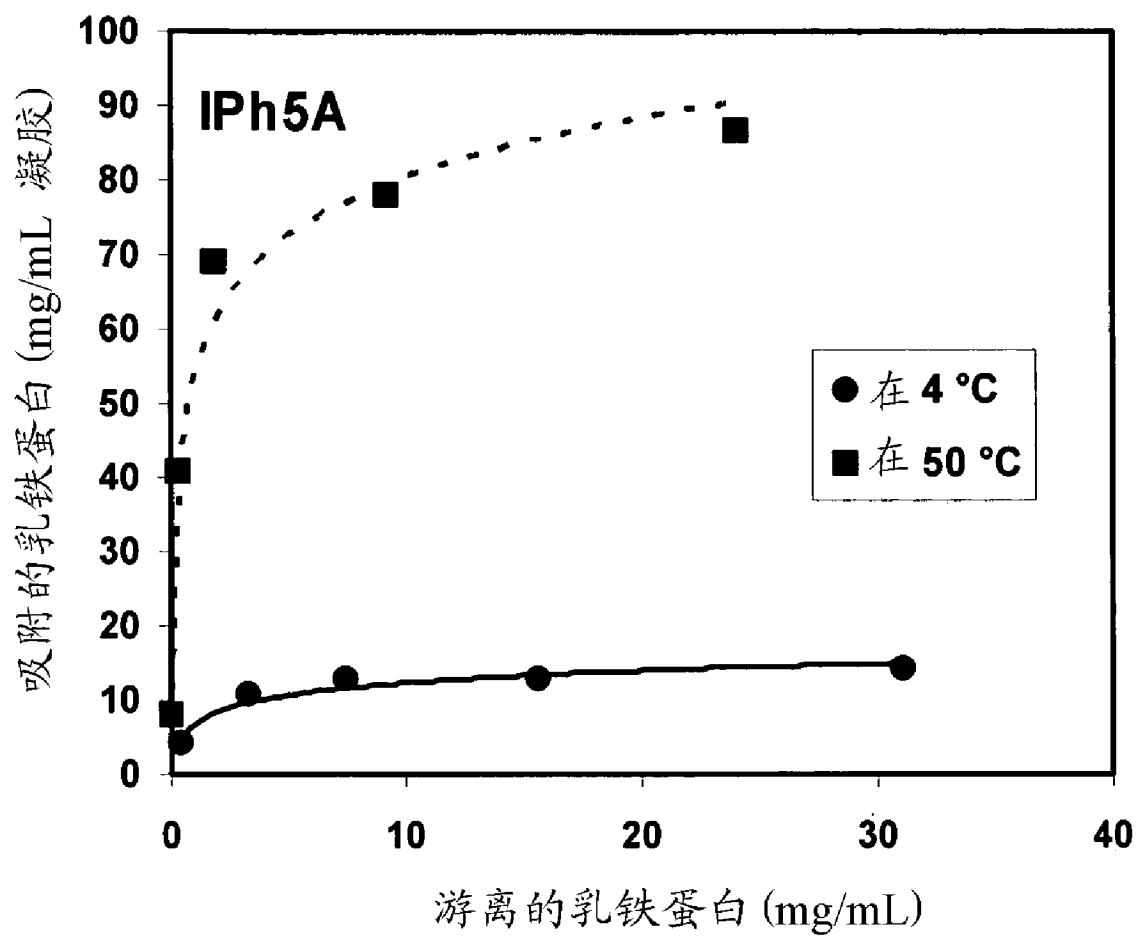


图 9

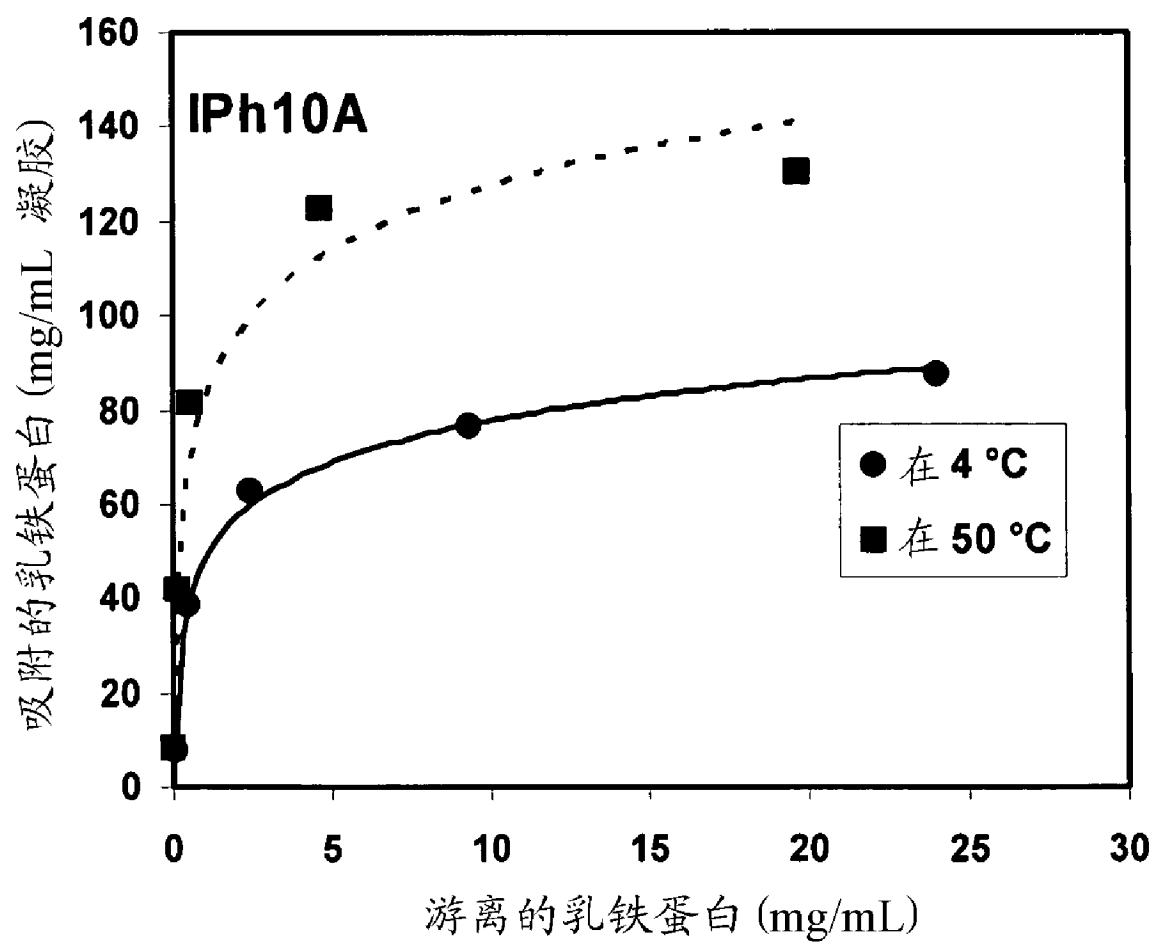


图 10

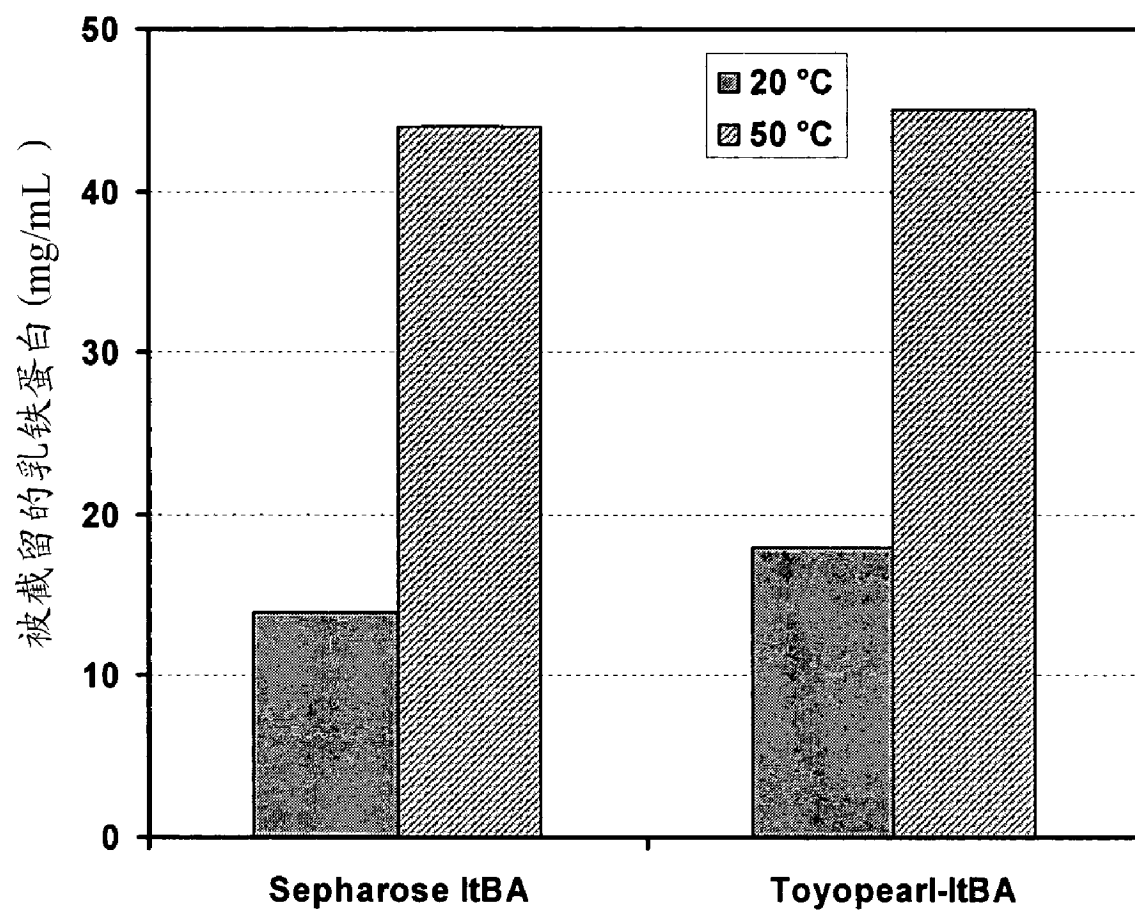


图 11

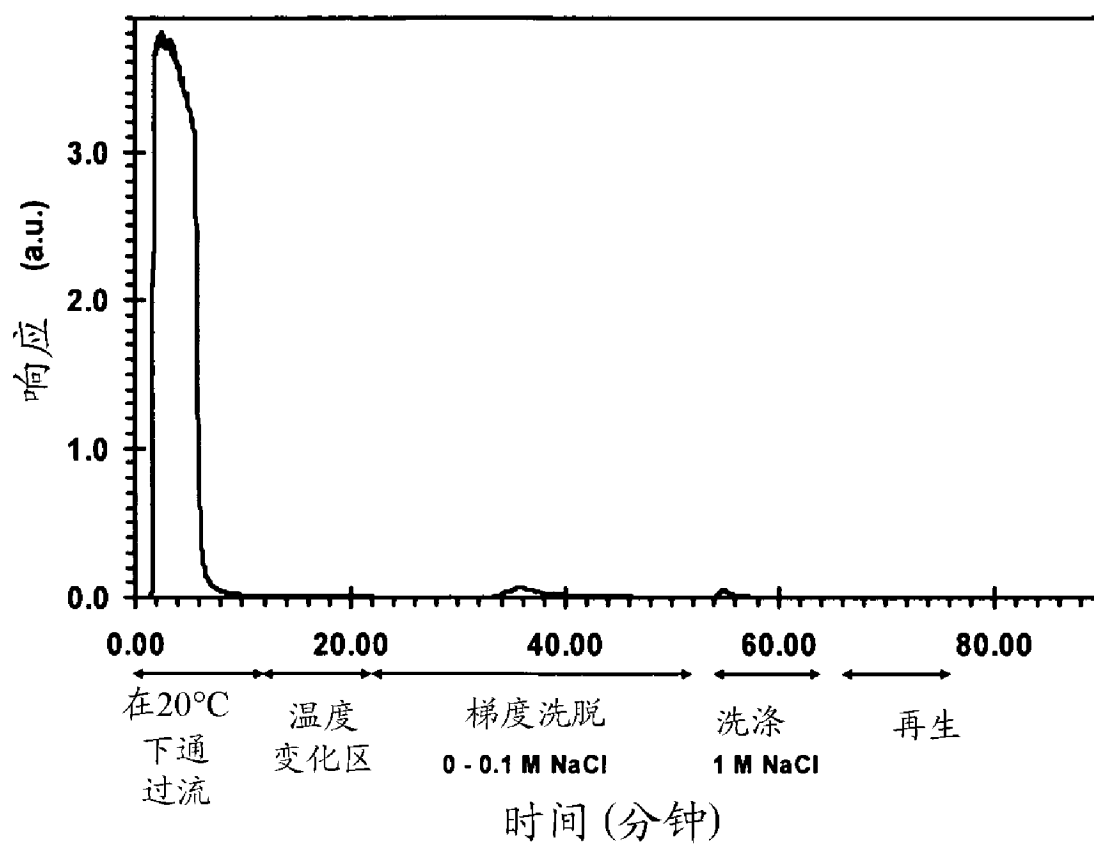


图 12

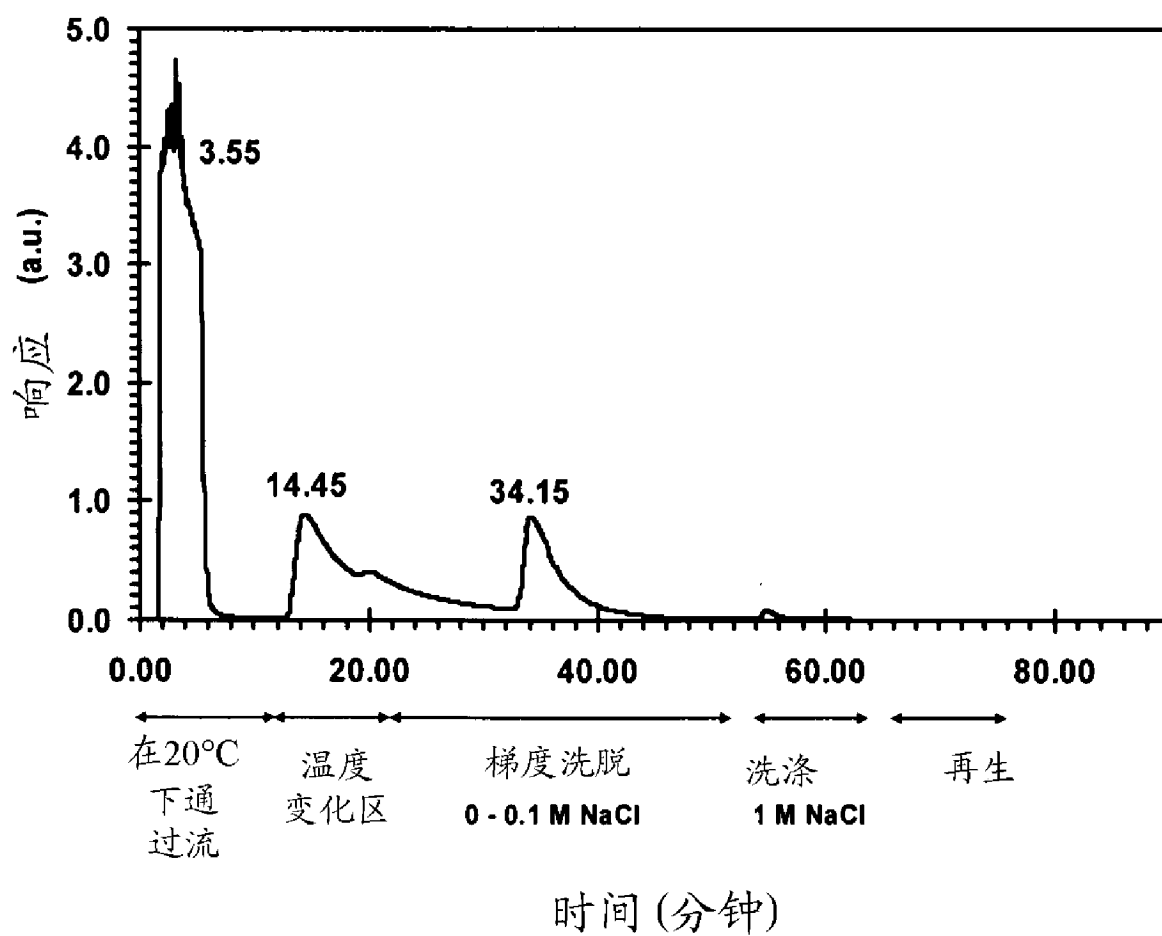


图 13

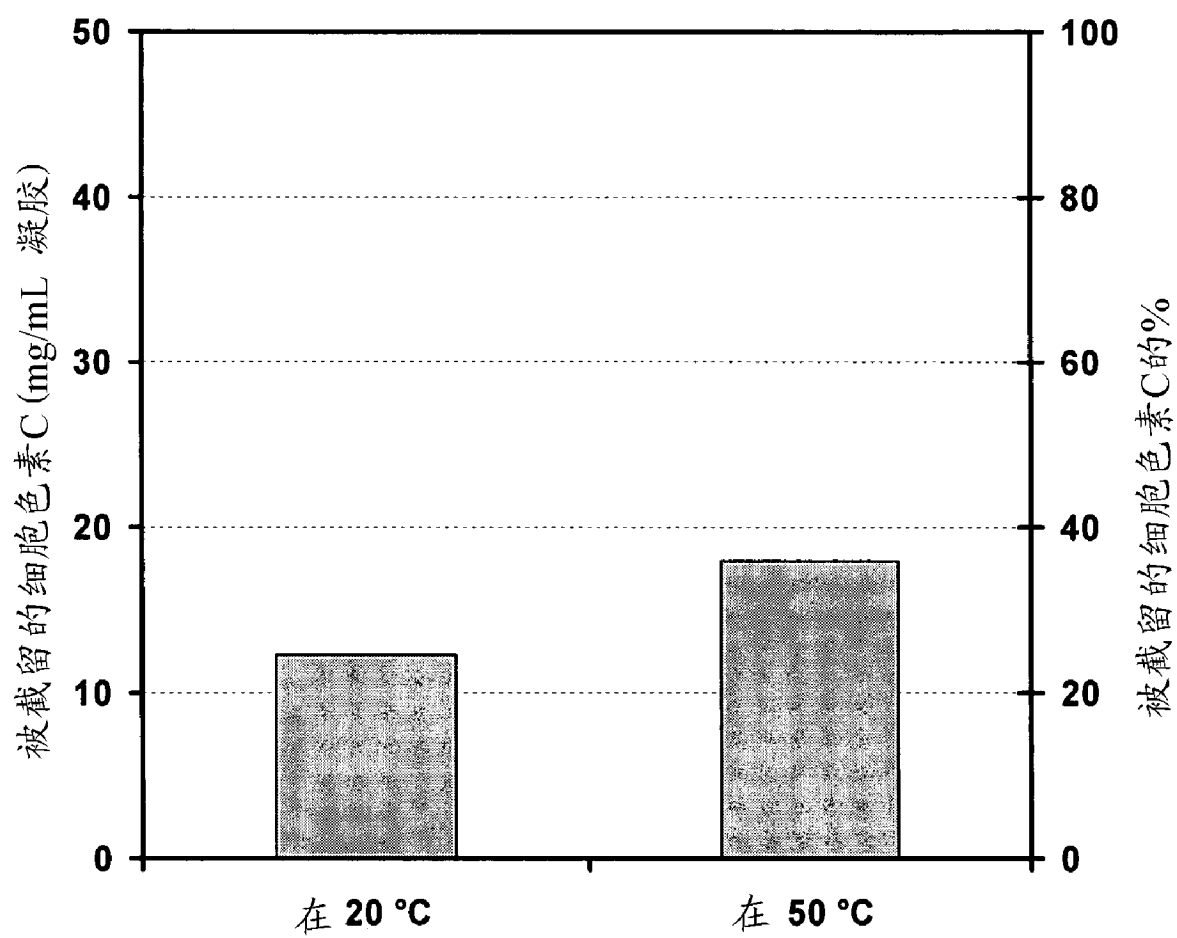


图 14

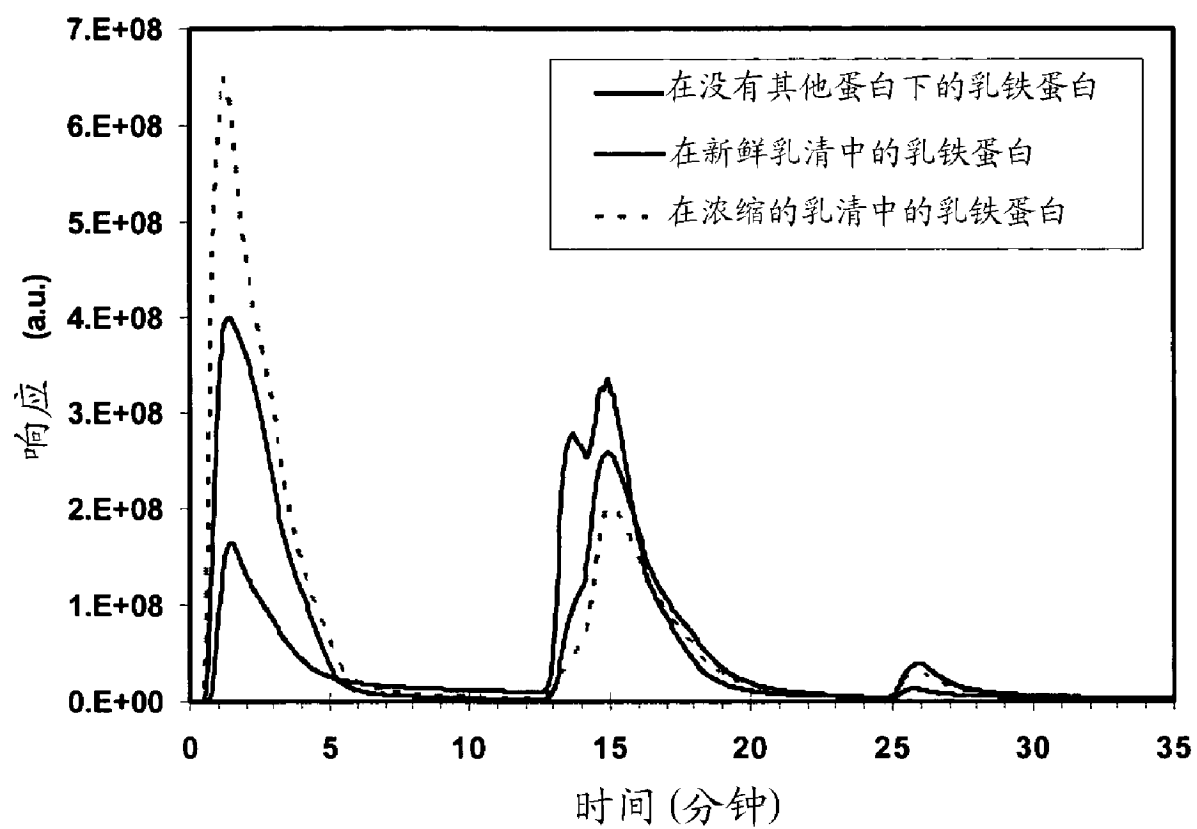


图 15

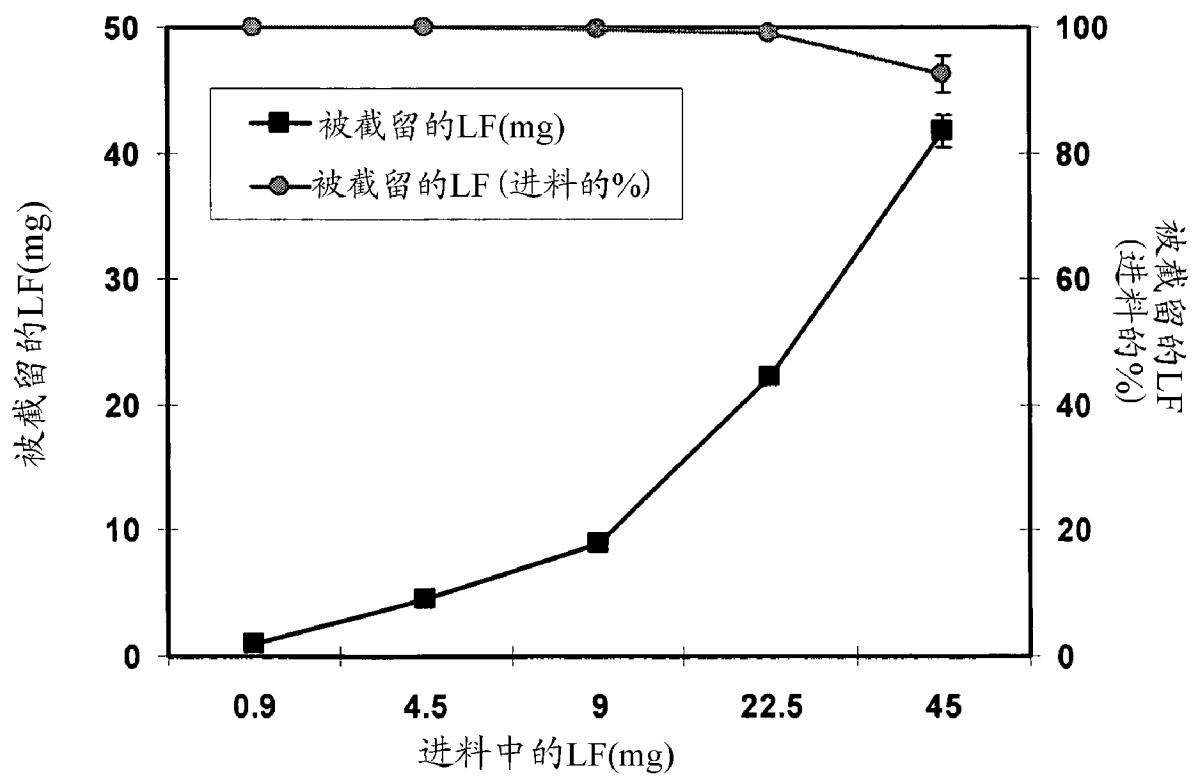


图 16

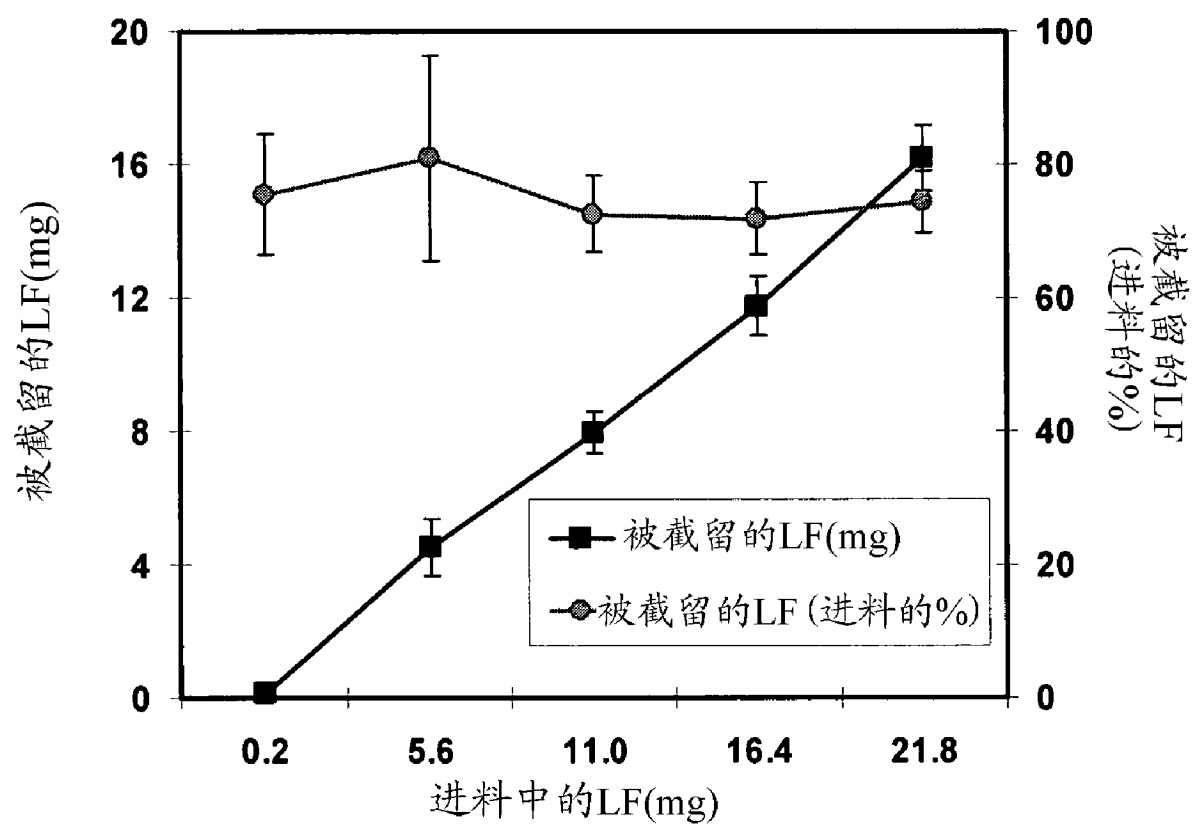


图 17

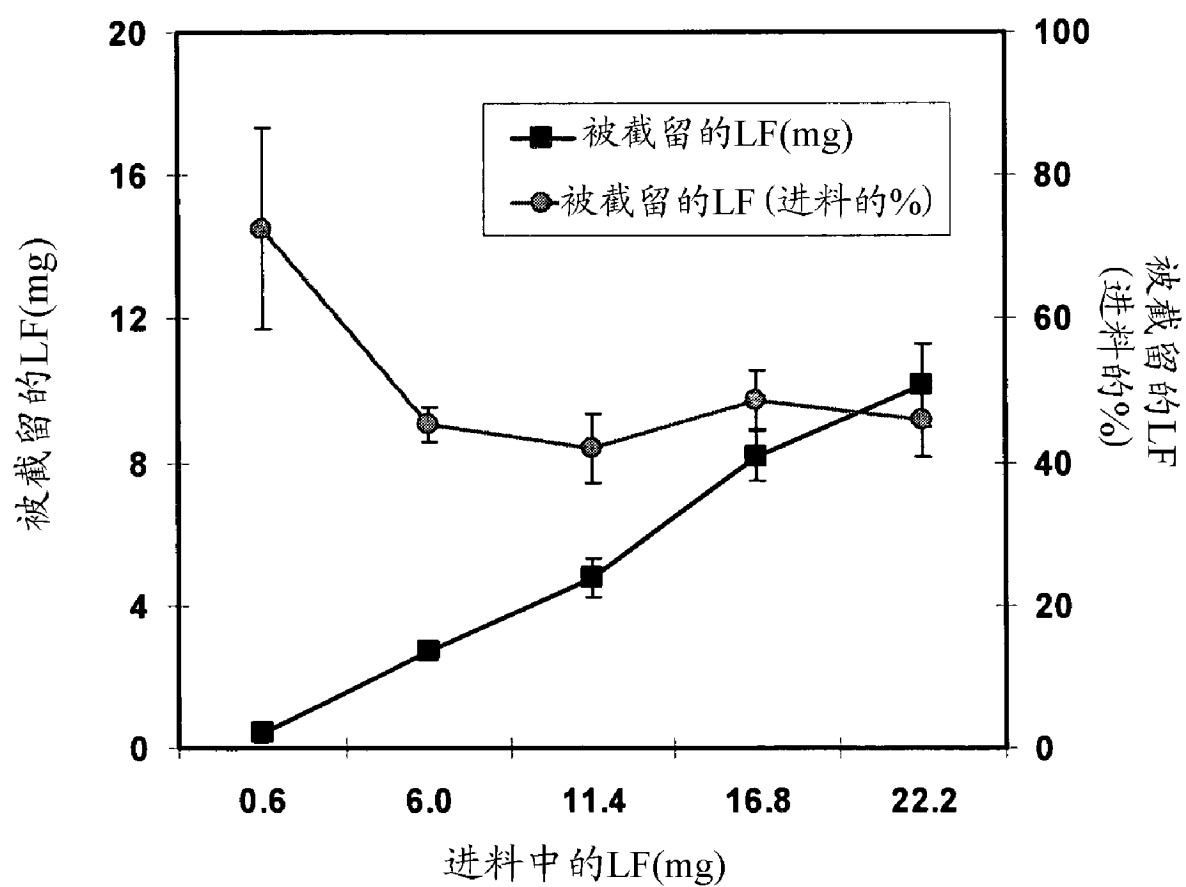


图 18