

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480038282.9

[51] Int. Cl.

C07K 16/06 (2006.01)
B01J 20/281 (2006.01)
B01J 20/286 (2006.01)
B01D 15/00 (2006.01)
B01D 15/10 (2006.01)
B01D 15/14 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 7 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 100516086C

[22] 申请日 2004.12.21

[21] 申请号 200480038282.9

[30] 优先权

[32] 2003.12.23 [33] SE [31] 0303532-6

[86] 国际申请 PCT/SE2004/002007 2004.12.21

[87] 国际公布 WO2005/061543 英 2005.7.7

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.21

[73] 专利权人 通用电气健康护理生物科学股份公司
地址 瑞典乌普萨拉

[72] 发明人 G·格拉德 B·-L·约翰松
J·-L·马卢瓦塞尔 N·诺尔曼

[56] 参考文献

US4725355A 1988.2.16

EP0197521A2 1986.10.15

novel sulfamethazine ligand used for one - step
purification of immunoglobulin G from human plas-
ma. LIU, Yang et al. Journal of Chromatography
B, Vol. 792 No. 2. 2003

审查员 于 群

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 梁 谋

权利要求书 2 页 说明书 23 页 附图 1 页

[54] 发明名称

免疫球蛋白的纯化方法

[57] 摘要

本发明涉及一种分离基质, 该分离基质包含固定有配体的多孔载体, 其中所述配体包含至少一种脂族磺酰胺。磺酰胺的氮可以是仲胺或叔胺。本发明也涉及装有所述分离基质的层析柱, 以及通过将免疫球蛋白样化合物吸附到包含了脂族磺酰胺配体的分离基质上进行分离的方法。

1. 一种分离基质，其包含固定有配体的多孔载体，所述配体任选通过间隔臂固定，其中所述配体包含一个或多个磺酰胺，其中磺酰基的 R 基团是脂族化合物。

2. 权利要求 1 的基质，其中磺酰胺是通过其氮偶合到多孔载体上的。

3. 权利要求 1 的基质，其中磺酰胺是通过其硫偶合到多孔载体上的。

4. 前述权利要求中任一项的基质，其中 R 基团是甲基。

5. 权利要求 1-3 中任一项的基质，其中磺酰胺的氮是伯胺或仲胺。

6. 权利要求 1-3 中任一项的基质，其中所述配体是单胺。

7. 权利要求 1-3 中任一项的基质，其中所述配体是多胺。

8. 权利要求 7 的基质，其中每个多胺都包含 2-6 个胺。

9. 权利要求 1-3 中任一项的基质，其中所述配体以固定到载体上的聚合物的重复单元存在。

10. 权利要求 9 的基质，其中所述聚合物是聚乙烯亚胺。

11. 权利要求 9 的基质，其中所述聚合物有两种或多种不同的配体基团。

12. 权利要求 9 的基质，其中所述配体是脂族化合物。

13. 权利要求 9 的基质，其中所述载体是交联多糖。

14. 填充权利要求 1-13 中任一项所定义的分离合质的层析柱。

15. 权利要求 14 的层析柱，该层析柱是无菌的。

16. 权利要求 14 或 15 的层析柱，该层析柱是一次性使用的。

17. 一种制备用于抗体分离的基质的方法，该方法包括：第一步，将胺和/或多胺固定到多孔载体上；第二步，使所述胺磺酰化，以提供脂族磺酰胺配体。

18. 一种制备用于抗体分离的基质的方法, 该方法包括: 第一步, 活化多孔载体; 第二步, 把磺酰胺通过其硫结合到活化位点上, 以提供脂族磺酰胺配体。

19. 从液体中分离出抗体的方法, 所述方法包括下述步骤:

- (a) 提供包含至少一种抗体的液体;
- (b) 使所述液体与分离基质接触以将一种或多种抗体吸附到所述基质上, 其中所述分离基质如权利要求 1-13 中任一项所定义; 任选地,
- (c) 让洗脱液通过所述基质以释放出一种或多种抗体; 和
- (d) 从洗脱液的流分中回收至少一种抗体。

20. 权利要求 19 的方法, 其中步骤(a)中提供的液体也包含一种或多种其它蛋白质。

21. 权利要求 19 或 20 的方法, 其中步骤(b)的分离基质在层析柱中提供。

22. 权利要求 21 的方法, 其中步骤(b)在接近中性 pH 时实施。

23. 权利要求 21 的方法, 其中步骤(b)在 pH 7.2-7.6 下实施。

24. 权利要求 21 的方法, 其中步骤(b)在约 pH 7.4 下实施。

25. 权利要求 19 的方法, 其中步骤(c)是梯度洗脱, 通过向分离基质中加入递减盐浓度的洗脱液实施。

26. 权利要求 19 的方法, 其中步骤(b)在中性 pH 或高于中性 pH 时实施, 步骤(c)是梯度洗脱, 通过加入递减 pH 的洗脱液实施。

27. 权利要求 19 的方法, 其中步骤(d)中回收的抗体是人抗体或人源化抗体。

28. 权利要求 19 的方法, 其中步骤(d)中回收的抗体是免疫球蛋白 G。

29. 一种测定抗体数量的方法, 该方法包括如权利要求 19-28 中任一项所定义的方法, 另外还有步骤(e), 即用分光光度法测定抗体量。

免疫球蛋白的纯化方法

技术领域

本发明涉及抗体制备的领域，更具体地说，涉及用于分离抗体的分离基质。本发明也包括装有新基质的层析柱和分离抗体的方法。

发明背景

免疫系统由许多相互依赖的细胞类型构成，它们共同保护身体免于细菌、寄生虫、真菌、病毒的感染，并防止肿瘤细胞生长。免疫系统的哨兵是巨噬细胞，这些巨噬细胞在它们的宿主血流中不断地漫游。在受到感染或免疫接种攻击时，巨噬细胞做出的反应是吞噬侵入物，该侵入物被识别为外源分子，称作抗原。这个由辅助 T 细胞介导的过程，显示了复杂的反应链，导致刺激 β -细胞。这些 β -细胞进而产生出与外源侵入物结合的蛋白质，称作抗体。这种抗体和抗原之间的结合过程标志着外源侵入物经过补体系统的吞噬或激活而被解体。有五种不同类别的抗体即免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。这些抗体不仅在它们的生理作用方面有所不同，而且在结构上也有所不同。从结构上说，IgG 抗体是一类特殊的免疫球蛋白，也许因为它们成熟免疫应答中起着主要作用，因此对其进行了广泛深入的研究。

免疫球蛋白所具有的生物活性如今已被应用于各种不同的应用领域，例如人或兽医的诊断、保健和治疗领域。事实上，在最近几年中，单克隆抗体和重组抗体构建体已经成为目前在临床试验中研究的最大类的蛋白质，并被 FDA 批准为治疗和诊断用药物。为了补充表达系统和生产策略，纯化流程被设计成用简单、经济实惠的方式来获得非常纯的抗体。

免疫球蛋白的传统分离方法是基于选择性可逆沉淀包含免疫球蛋白的蛋白质级分，而把其它类的蛋白质留在溶液中。典型的沉淀剂是乙醇、聚乙二醇、感胶离子盐即抗离液盐(如硫酸铵和磷酸钾)以及辛酸。通常，用这些沉淀方法所得到的产物非常不纯而且费时、费力。此外，向原料中加入沉淀剂不利于使用上清液作其它用途而且引起了清除问题，特别是在大量纯化免疫球蛋白时。

离子交换层析是另一种众所周知的蛋白质分级分离方法，常常用于分离免疫球蛋白。然而，由于荷电离子交换配体会与所有带相反电荷的化合物起反应，因此离子交换层析的选择性会比其它层析分离的选择性稍低一些。

A 蛋白和 G 蛋白亲和层析是受欢迎的和广泛使用的免疫球蛋白分离纯化方法，尤其是用于分离单克隆抗体，主要是由于易于使用而且可获得高纯度。惯常配合采用离子交换、疏水作用、羟基磷灰石(hydroxyapatite)和/或凝胶过滤步骤，特别是以 A 蛋白为基础的一些方法，已经成为许多生物制药公司选择的抗体纯化方法。然而，尽管这些方法可以共用，但仍然存在着对于有效替代方法不断增长的需要和要求，这些方法针对有关以 A 蛋白为基础的培养基的常见问题，如成本、当 pH 值增加时的渗漏和不稳定性。

疏水作用层析(HIC)也是一种被全面描述的用于分离免疫球蛋白的方法。然而，疏水基质需要向原材料中加入感胶离子盐以使免疫球蛋白有效地结合。通过连续梯度或分级梯度降低感胶离子盐的浓度，将已结合的抗体从基质中释放出来。如果想要获得高纯度的产物，建议将疏水层析和进一步的步骤配合使用。因此，这种方法的缺点是需要向原材料中加入感胶离子盐，这就产生了新问题，并因此增加了大批量用户的成本。对于除了细胞培养物上清以外的其它原材料，例如乳清、血浆和卵黄，在大量应用中，在很多情况下是禁止向原材料中加入感胶离子盐的，因为盐会妨碍耗去原材料的免疫球蛋白的任何经济可行的使用。另一个在大量应用中的问题就是

几千公升废物的清除。

亲硫吸附层析作为一种新的分离免疫球蛋白的层析吸附原理，由 J. Porath 于 1985 年提出(J. Porath 等; FEBS Letters, 第 185 卷, 第 306 页, 1985)。在这篇论文中, 描述了如何将二乙烯基砒活化琼脂糖与各种包含游离巯基的配体偶合, 显示免疫球蛋白在 0.5M 硫酸钾即感胶离子盐存在下发生特异结合。人们假设砒基(来自乙烯砒间隔基)和配体中所得的硫醚是一种结构需要, 以获得所描述的抗体结合的特异性和能力。然而接下来还介绍了, 如果配体还包含芳基, 那么硫醚可能会被氮或氧所置换(K.L. Knudsen 等, Analytical Biochemistry, 第 201 卷, 第 170 页, 1992)。尽管所描述的用于亲硫层析的基质通常有良好的性能, 但它们也有较大的缺点, 就是需要向原材料中加入感胶离子盐以确保免疫球蛋白的有效结合, 基于上述已讨论过的原因, 这是一个难题。

已经公开了与环氧活化琼脂糖偶合的其它亲硫配体(J. Porath 等, Makromol. Chem., Makromol. Symp., 第 17 卷, 第 359 页, 1998; A. Schwarz 等, Journal of Chromatography B, 第 664 卷, 第 83-88 页, 1995), 例如 2-巯基吡啶、2-巯基嘧啶和 2-巯基噻唑啉。然而, 在没有添加感胶离子盐的情况下, 所有这些亲和基质的亲和常数仍然不足以确保抗体的有效结合。

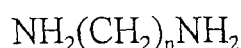
US 6,498,236 (Upfront Chromatography)涉及免疫球蛋白的分离。所公开的方法包括下述步骤: 使包含带负电荷洗涤剂并含有免疫球蛋白的溶液与固相基质接触, 从而使至少部分免疫球蛋白可以与固相基质结合; 使固相基质与洗脱液接触, 以从固相基质中释放出免疫球蛋白。含免疫球蛋白溶液的特征还在于其 pH 范围为 2.0-10.0, 总的含盐量相当于最大为 2.0 时的离子强度, 感胶离子盐的浓度最大为 0.4M。相信存在于溶液中的洗涤剂可以阻遏其它生物分子与基质的粘合, 例如硫酸辛酯、溴酚蓝、辛烷磺酸酯、月桂基肌氨酸钠和己烷磺酸酯。固相基质用式 M-SP1-L 定义, 其中 M 是指基质骨架,

SP1 是指包含单或二环芳族部分或者是杂芳族部分的配体。

Liu 等(Yang Liu, Rui Zhao, Dihua Shangguan, Hongwu Zhang, Guoquan Liu: Novel sulfmethazine ligand used for one-step purification of immunoglobulin G from human plasma, Journal of Chromatography B, 792 (2003) 177-185)研究了 sulfmethazin (SMZ)与人 IgG 的亲和力。因此,公开了包含磺酰基的配体,其中 R 基团是杂环。根据这篇文章,将 SMZ 固定在单分散性、无孔的、交联聚(缩水甘油基甲基丙烯酸酯)珠子上。然后在高效亲和层析法中使用这些珠子以从人血浆中分离出 IgG。在 pH 5.5 时达到最大吸附。这些珠子显示了与其它蛋白质最小的非特异相互作用。因此,配体能够吸附抗体,而它们与其它蛋白质的相互作用又恰好足以在所用的吸附缓冲液中提供阻滞作用。然而,众所周知,酯化合物如甲基丙烯酸酯随着 pH 值增高易于被水解。因此,与 A 蛋白和 G 蛋白基质类似,其中所公开的分离基质预期在通常的现场清洁(cip)工序中是不稳定的。

US 4,725,355 涉及包含载体和吸附剂的体液纯化培养基,该培养基包括至少一种磺胺类药物,用于吸附和除去体液中的致病物质。所述磺胺类药物是化疗药,更具体地说是特征为芳族 R 基团的磺酰胺。通过体液进口和出口之间的容器的体液流路可以提供培养基。

EP 0 197 521 涉及免疫球蛋白吸附剂和吸附装置。更具体地说,公开了用于免疫球蛋白的吸附剂,这种吸附剂包括含羟基的不溶于水的载体,载体上带有双胺化合物。双胺化合物由以下通式表示:



其中 n 为 3-9 的整数。所述化合物通过硅烷偶联剂或其衍生物连接,而杂环化合物通过双官能试剂连接到双胺上。因此 R 基团是芳族结构。

然而,仍然需要纯化抗体或抗体构建体的替代方法,这些方法能够满足纯度、安全性、功效和经济可行的要求。

发明简述

因此,本发明的一方面是 pH 值约为中性时能够在低离子强度吸附抗体的分离基质。这可以通过权利要求 1 中所限定的分离基质实现。

本发明的另一方面是能够高度选择性地吸附抗体的分离基质。

本发明的具体方面是能吸附抗体而其它蛋白质不需要任何必需相互作用就可以通过的分离基质。

本发明的再一方面 is 制备用于分离抗体的基质的方法,这包括能够通过亲硫键、疏水键和/或氢键相互作用吸附抗体的官能团,这种方法易于改变配体结构。这可以通过将胺和/或多胺固定到多孔载体以及随后将所述固定化胺磺酰化的步骤得以实现。

本发明的又一方面是通过把液体中的抗体吸附到分离基质上来分离抗体的方法,这种方法不要求添加任何洗涤剂就可以达到吸附。

根据下文的发明详述,本发明的其它方面和优势将会变得显而易见。

附图简述

图 1 显示一些选择的与载体有潜在结合点的磺酰化胺的实例。

定义

本文所用的术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文可互换使用。

术语“配体”在本文中意指能够和靶化合物相互作用的分子或化合物如抗体。

术语“间隔臂”在本文中意指把配体与分离基质的载体隔开的元素。

“伯胺”定义为分子式 RNH_2 , 其中 R 是指有机基。

“仲胺”定义为分子式 R_2NH , 其中 R 是指有机基。

术语“磺酰胺”使用的是它的普通含义，即对于任何化合物来说，磺酰胺都是包含磺酸的一个或多个酰胺。

磺酰基定义为分子式-S(=O)₂R，其中R是指有机基。

术语“洗脱液”在本文中使用的的是它的普通含义，即可从分离基质中释放出一种或多种化合物的适当 pH 和/或离子强度的缓冲液。

发明详述

第一方面，本发明涉及一种分离基质，其包含固定有配体的多孔载体，所述配体任选通过间隔臂固定，其中所述配体包含一个或多个磺酰胺，其中磺酰基的至少一个 R 基团是脂族化合物。

在一个实施方案中，磺酰胺通过其氮与多孔载体偶合。在另一个实施方案中，磺酰胺通过其硫与多孔载体偶合。然而，本发明也包括分离基质，该分离基质包含以不同方向偶合的磺酰胺，即作为酰胺-偶合和砜-偶合的磺酰胺混合物的配体。

在一个实施方案中，所述配体包含至少一个伯胺或仲胺。

分离基质可以用于分离(例如纯化或分析)抗体和其它表现出等同结合性质的化合物，例如包含免疫球蛋白部分或抗体片段的融合蛋白。本发明的发明人已经表明，用包含一个或多个磺酰胺的分离基质，就能够高容量、极佳选择性地纯化抗体。与上述 US6,498,236 不同，它利用芳族部分或杂芳族部分作为抗体纯化的离子交换配体，本发明不需要向液体中添加洗涤剂就可以达到纯化，所述液体在用无荷电配体接触基质之前就包含有抗体。

众所周知，磺酰胺含有胺，其中所述胺的至少一个 R 基团是磺酰基。在本发明基质的一个实施方案中，磺酰基的 R 基团是脂族无环基或脂族环基，例如 1-4、例如 1-2 个碳原子和/或杂原子的直链，其中的一个或多个氢被杂原子取代。在一个实施方案中，磺酰基的脂族 R 基团是甲基。在另一个实施方案中，磺酰基的脂族 R 基团是乙基。

在一个替代的实施方案中，磺酰基的 R 基团是取代或未取代的芳族基，例如单芳族基或多芳族基。在又一个实施方案中，磺酰基的 R 基团不仅包含脂族基而且包含芳族基。

在本发明分离基质的一个实施方案中，配体是磺酰化单胺，例如半胱胺或氨。在一个替代的实施方案中，配体是磺酰化多胺，例如三亚乙基四胺(triethylentetraamine)。这种磺酰化多胺可以包含任何合适数量的胺，例如 2-10 个。在说明性的实施方案中，每个多胺都包含 2-6 个胺。

在本发明分离基质的一个具体实施方案中，配体是作为固定到载体上的聚合物的重复单元出现的。所述聚合物可以是任何合适的多胺，例如聚亚烷基亚胺。在一个实施方案中，聚合物是聚乙烯胺。本领域技术人员将会认识到，这种聚合物的胺含量可以不同，例如包含任何所需次序的伯胺和/或仲胺。因此，在一个实施方案中，所述聚合物显示有两个或多个不同的配位基。按照本领域的标准方法，所述聚合物易于由合适的单体产生。将多胺偶合到载体的方法为本领域技术人员通晓且易于实施，例如通过原位聚合或接枝聚合物，参见例如 PCT/SE02/02159 (Ihre 等)。这个实施方案的优点在于能够得到最佳性能的分选基质，例如通过改变聚合物长度、支链等等。

在一个实施方案中，配体是无环化合物。

本发明分离基质的多孔载体可以是任何合适的材料。在一个实施方案中，载体由交联碳水化合物材料构成，例如琼脂糖、琼脂、纤维素、葡聚糖、壳聚糖、魔芋(konjac)、角叉菜聚糖、吉兰糖(gellan)、藻酸盐等等。所述载体可以按照标准方法制备，例如反悬浮凝胶作用(S Hjertén: Biochim Biophys Acta 79(2), 393-398 (1964))。或者，载体是商售产品，例如琼脂糖凝胶™ FF (Sephacrose™ FF) (Amersham Biosciences AB, Uppsala, 瑞典)。因此，在本发明基质的一个实施方案中，载体是交联多糖。在具体的实施方案中，所述多糖是琼脂糖。通常将这种碳水化合物材料在其配体上固定化之前烯丙基化。简单

地说，可以按照标准方法，用烯丙基缩水甘油醚、烯丙基溴或任何其它合适的活化剂进行烯丙基化。

在一个替代的实施方案中，本发明分离基质的多孔载体由交联合成聚合物构成，例如苯乙烯或苯乙烯衍生物、二乙烯基苯、丙烯酰胺、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、乙烯基酯、乙烯基酰胺等等。按照标准方法，容易制备出这些聚合物的载体，参见例如 "Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization" (R Arshady: *Chimica e L'Industria* 70(9), 70-75 (1988))。或者，SourceTM (Amersham Biosciences AB, Uppsala, 瑞典)等商售产品可以按照本发明进行表面改性。然而，在这个实施方案中，优选将载体的表面改性以增加其亲水性，通常是将大部分暴露残基双键转化成羟基。

本发明任何合适形式的分离基质如层析基质，可以是如大体球形粒子或整块的；滤片或膜；芯片、表面、毛细管等等。因此，本发明也包括填充上述基质的层析柱。在一个有利的实施方案中，所述柱是由普通材料做成，例如生物相容性塑料如聚丙烯，或者是玻璃。柱的大小可适于试验室纯化抗体，也可适于大量纯化抗体。在一个具体的实施方案中，本发明的柱带有 luer 接头、连接管和圆顶形螺帽。因此，本发明也包括试剂盒，该试剂盒包括填充上述分离基质的层析柱；至少一种缓冲液；使用说明书，用于说明在分离区室中纯化抗体的步骤。在一个具体的实施方案中，本发明的试剂盒也包括 luer 接头、连接管和圆顶形螺帽。

第二方面，本发明涉及一种用于分离抗体的基质的制备方法，该方法包括：第一步，将胺和/或多胺固定到多孔载体上；第二步，使所述胺磺酰化。多孔载体可以如上所述，任何标准固定化方法都可以使用，参见例如 *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Hermanson 等, Greg T. Hermanson, A. Krishna Mallia 和 Paul K. Smith, Academic Press, INC, 1992。然而，本领域技术人员将会认识到，一些分离基质同样可以通过将磺酰胺直接固定到载体上进行制备，这

取决于配体的性质。

第三方面，本发明涉及从液体中分离抗体的方法，该方法包括下述步骤：

- (a) 提供包含至少一种抗体的液体；
- (b) 使所述液体与包含至少一个或多个磺酰胺基团的分离基质接触，由此一种或多种抗体就吸附到所述基质上了；任选地，
- (c) 让洗脱液通过所述基质以释放出一种或多种抗体；
- (d) 从洗脱液的流分中回收至少一种抗体。

在本文中，应该理解，术语“抗体”也包括抗体片段和任何包含抗体或抗体片段的融合蛋白。因此，本发明方法可用于分离任何免疫球蛋白样分子，这些分子有抗体的结合特性。包含抗体的液体例如可以是来源于产生抗体的细胞培养物或发酵肉汤的液体，希望从中纯化出一种或多种所需要的抗体。或者，液体可以是血液或血浆，希望从中除去一种或多种抗体以获得纯的液体。因此，在本发明方法的一个实施方案中，步骤(a)所提供的液体也包含一种或多种不是抗体的其它蛋白质。正如在下面的实验部分所表明的，通常，本发明方法能够以相对低的离子强度选择性吸附抗体。意想不到的是，本发明的发明人发现了使用有一个或多个磺酰胺基团的多孔分离基质能够只吸附抗体，而不吸附除抗体以外的其它蛋白质。因此，本发明方法提供高产量的纯的抗体制剂。用常规试验，本领域技术人员就能够容易地选择用于每种磺酰胺配体结构的最佳条件，这将在以下实验部分进行讨论。例如，本领域众所周知，可以通过改变凝胶的性质将分离基质的性能最佳化；在这种情况下，可改变磺酰胺的 R 基团或取代度，即载体上的配体密度。也可将用于每种配体的吸附缓冲液中的盐浓度最佳化。因此，在本发明的一个实施方案中，步骤(b)吸附的盐浓度约为 0.25M Na_2SO_4 。在一个具体的实施方案中，配体包含单胺，在盐浓度高于约 0.5M Na_2SO_4 时实施步骤(b)。

本发明方法可以使用任何合适形式的分离基质如层析基质，可

以是例如大体球形粒子或整块的；滤片或膜；芯片等等。因此，在一个有利的实施方案中，步骤(b)的分离基质在层析柱中。

步骤(b)的分离基质的载体和配体可以是上述中的任何一种。

如上所述，本发明已经意想不到地发现，使用本发明的新型分离基质，能够在中性 pH 时高选择性地吸附抗体。因此，在一个实施方案中，在 pH 6.5-8.3，例如 7.2-7.6，如约 7.4 时实施步骤(b)。

通过标准洗脱，例如通过使用递减离子强度的洗脱液，可容易地释放出吸附到柱子上的抗体。因此，在一个实施方案中，步骤(c)是梯度洗脱，通过向分离基质中加入递减盐浓度的洗脱液进行，优选使所述洗脱液通过基质。所述梯度可以是任何形状的梯度，例如线性梯度或阶式梯度。其它的洗脱方案同样有用，例如在洗脱液中添加竞争性结合剂，向洗脱液中添加会置换基质上已吸附的抗体的化合物如乙醇、盐等等，或者改变温度等等。

或者，通过调节 pH 如降低或增加 pH 来实施步骤(c)的洗脱。如上所述，pH 调节也可以与盐梯度结合起来。在一个具体的实施方案中，步骤(b)在高于中性的 pH 时实施，而步骤(c)是通过加入递减 pH 的洗脱液实施梯度洗脱。

本发明方法可用来回收任一种单克隆抗体或多克隆抗体，例如来源于哺乳动物宿主如小鼠、啮齿动物、灵长类动物和人的抗体，或者来源于培养细胞如杂交瘤的抗体。在一个实施方案中，从步骤(d)中回收的抗体是人抗体或人源化抗体。抗体可以是任一类别的抗体，也就是说，选自 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。在一个具体的实施方案中，从步骤(d)中回收的抗体是免疫球蛋白 G (IgG)。本发明也包括任一上述抗体的片段和包含这些抗体的融合蛋白的纯化。

本发明方法可以定量吸附抗体。因此，在一个实施方案中，本发明方法除了包括如上定义的方法外，还包括步骤(e)即用分光光度法测定抗体数量。上述方法和有用的设备是本领域技术人员众所周知的。这种方法在分析步骤中同样有用。

最后, 本发明也涉及一种分离基质, 其包含固定有配体的多孔载体, 所述配体任选通过间隔臂固定, 其中所述配体包含一个或多个乙酰胺基团。这样的乙酰胺基团例如可以是三亚乙基四胺。有关磺酰胺基质的载体上文已有描述。本领域技术人员用标准方法, 例如上文已提到的一些方法, 就可以容易地将乙酰胺基团固定到多孔载体上。本发明的这一方面也包括液相层析法, 该方法使用的是包含乙酰胺配体的分离基质。这种方法可用于分离生物分子, 例如蛋白质、病毒、核酸如 DNA 或 RNA、质粒等等。本领域技术人员可容易地对用于吸附和洗脱的适当条件作出选择。

附图详述

图 1 显示一些选择的与载体有潜在结合位点的磺酰化胺的实例。更具体地说, 图 1 从左到右显示半胱胺; 氨(上一行); 二亚乙基三胺; 和三亚乙基四胺(下一行)。

实施例部分

本实施例仅用于说明本发明, 不得解释为对本发明范围的限制, 本发明范围由所附权利要求限定。下文或本说明书其它部分所给出的所有参考文献均通过引用结合到本文中。

实施例 1: 磺酰胺分离基质的制备

下面所提供的是有关本发明分离基质的制备, 其中磺酰基的 R 基团是脂族基。

概要:

基质的容积是指沉降床容积。

基质的重量(克)是指吸水干重。当然这些基质仍然是水溶性溶剂化材料。

由于使用磁力搅拌棒会直接损坏珠子, 因此对于大规模反应搅

拌,是指上挂式电动搅拌器。在封闭的小瓶中进行小规模反应(凝胶最多 20ml 或 20g),则搅拌是指使用摇床。

使用常规方法分析官能团并测定烯丙基化、环氧化的程度,或者珠子上的离子交换基团的取代度。这些方法最后通过附加凝胶的元素分析,特别是对硫原子的元素分析进行补充。

下面举例说明本发明分离基质的一种制备方法,由交联琼脂糖凝胶(琼脂糖凝胶(Sephacrose)TM 6 FF, Amersham Biosciences, Uppsala, 瑞典)开始。对于每一步骤都有具体的实施例进行说明。

A. 基质上引入烯丙基

如下所述,用烯丙基缩水甘油醚活化琼脂糖凝胶(Sephacrose)TM:将 100g 琼脂糖凝胶 6 FF 的水分吸干成 78g,与 0.4g NaBH₄、11g Na₂SO₄ 和 60ml 50% NaOH 水溶液混合。将所得混合物于 50℃ 搅拌 1 小时。加入 80ml 烯丙基缩水甘油醚后,将悬浮液于 50℃ 再剧烈搅拌 20 小时。过滤混合物后,凝胶依次用 500ml 蒸馏水、500ml 乙醇、200ml 蒸馏水、200ml 0.2M 乙酸和 500ml 蒸馏水洗涤。滴定分析得出取代度为 0.4mmol 烯丙基/ml 凝胶。

B. 基质上引入胺基

除了半胱胺的固定化是在特殊的自由基加成条件下进行外,基质上直接通过胺基的氮原子引入胺基。在一个典型的方法中,通过在碱性条件下溴化烯丙基和亲核取代优先实现偶合到基质上。

半胱胺琼脂糖凝胶TM (Amersham Biosciences, Uppsala, 瑞典)

10g 烯丙基活化凝胶(0.4mmol 烯丙基/ml 排水凝胶)用二噁烷洗涤,转移到装有 12ml 二噁烷中含半胱胺-HCl (1g)的溶液的反应容器中。将反应温度加热到 70℃ 并加入 AIBN (0.9g)。于 70℃ 搅拌下,反应 17 小时。过滤反应混合物后,凝胶依次用 3x 10ml 二噁烷、3x 10ml 乙醇、3x 10ml 蒸馏水、3x 10ml 0.5M HCl 水溶液和 3x 10ml 蒸馏水

洗涤。得到半胱胺琼脂糖凝胶™，取代度为 0.34mmol 胺/ml 凝胶。

通过溴化作用活化烯丙基琼脂糖凝胶™

将溴加入到 100ml 烯丙基活化琼脂糖凝胶™ 6 FF (0.4mmol 烯丙基/ml 排水凝胶)、4g AcONa 和 100ml 蒸馏水的搅拌悬浮液中，直至获得持久性黄色溶液。然后加入甲酸钠直至悬浮液完全脱色。过滤反应混合物，凝胶用 500ml 蒸馏水洗涤。然后将活化的凝胶直接转移到反应容器中，再与合适的配体进一步反应。

二亚乙基三胺琼脂糖凝胶™

将 10g 溴活化的凝胶(0.4mmol 烯丙基/ml 排水凝胶)转移到装有二亚乙基三胺溶液(12.5ml)的反应瓶中。于 50℃搅拌下，反应 17 小时，过滤反应混合物后，凝胶依次用 3x 10ml 蒸馏水、3x 10ml 0.5M HCl 水溶液和 3x 10ml 蒸馏水洗涤。得到二亚乙基三胺琼脂糖凝胶™，取代度为 0.56mmol 胺/ml 凝胶。

三亚乙基四胺琼脂糖凝胶™

将 10g 溴活化的凝胶(0.4mmol 烯丙基/ml 排水凝胶)转移到装有三亚乙基四胺溶液(12.5ml)的反应瓶中。于 50℃搅拌下，反应 17 小时。过滤反应混合物后，凝胶依次用 3x 10ml 蒸馏水、3x 10ml 0.5M HCl 水溶液和 3x 10ml 蒸馏水洗涤。得到三亚乙基四胺琼脂糖凝胶™，取代度为 0.62mmol 胺/ml 凝胶。

五亚乙基六胺琼脂糖凝胶™

将 10g 溴活化的凝胶(0.4mmol 烯丙基/ml 排水凝胶)转移到装有五亚乙基六胺溶液(12.5ml)的反应瓶中。于 50℃搅拌下，反应 17 小时。过滤反应混合物后，凝胶依次用 3x 10ml 蒸馏水、3x 10ml 0.5M HCl 水溶液和 3x 10ml 蒸馏水洗涤。得到五亚乙基六胺琼脂糖凝胶™，取代度为 0.61mmol 胺/ml 凝胶。

聚乙烯亚胺琼脂糖凝胶™

将 10g 溴活化的凝胶(0.4mmol 烯丙基/ml 排水凝胶)转移到装有 12.5ml 聚乙烯亚胺溶液(50%水溶液)的反应瓶中。于 50℃搅拌下,反应 17 小时。过滤反应混合物后,凝胶依次用 3x 10ml 蒸馏水、3x 10ml 0.5M HCl 水溶液和 3x 10ml 蒸馏水洗涤。得到聚乙烯亚胺琼脂糖凝胶™,取代度为 0.45mmol 胺/ml 凝胶。

氨琼脂糖凝胶™

1) 将 10g 溴活化的凝胶(0.32mmol 烯丙基/ml 排水凝胶)转移到装有叠氮化钠(1g)的水(3ml)溶液的反应瓶中,通过加入 50% NaOH 水溶液,调节 pH 为 12。于 50℃搅拌下,反应 17 小时。过滤反应混合物后,凝胶依次用 3x 20ml 蒸馏水和 3x 10ml DMF 洗涤。将排水凝胶在 DTE (1.5g)和 DBU (1.2ml)的 DMF (7.5ml)溶液中在室温下搅拌 18 小时进行进一步还原。过滤反应混合物后,凝胶依次用 3x 10ml DMF、3x 10ml 乙醇和 3x 10ml 蒸馏水洗涤。得到胺琼脂糖凝胶™,取代度为 0.21mmol 胺基/ml 凝胶。

2) 将 10g 溴活化的凝胶(0.4mmol 烯丙基/ml 排水凝胶)转移到装有叠氮化钠(1g)的水(3ml)溶液的反应瓶中,通过加入 50% NaOH 水溶液,调节 pH 为 12。于 50℃搅拌下,反应 17 小时。过滤反应混合物后,凝胶依次用 3x20ml 蒸馏水和 3x 10ml DMF 洗涤。将排水凝胶在 DTE (1.5g)和 DBU (1.2ml)的 DMF (7.5ml)溶液中在室温下搅拌 18 小时进行进一步还原。过滤反应混合物后,凝胶依次用 3x 10ml DMF、3x 10ml 乙醇和 3x 10ml 蒸馏水洗涤。得到胺琼脂糖凝胶™,取代度为 0.26mmol 胺基/ml 凝胶。

C. 用磺酰氯衍生化

通用方法

5g 胺偶合凝胶用 3x 10ml 乙醇洗涤,再用 3x 10ml DCM (二氯甲

烷)洗涤。将凝胶转移到小瓶中,再加入 DCM (2ml)和 3.3 当量的 DIPEA,将所得混合物搅拌 5 分钟。逐滴加入溶解于 DCM (3ml)的 3 当量的甲磺酰氯后,将反应混合物于室温搅拌 18 小时。过滤反应混合物后,凝胶依次用 3x 10ml DCM、3x 10ml 乙醇、3x 10ml 蒸馏水、3x 10ml 0.5M HCl 和 3x 10ml 蒸馏水洗涤。

实施例 2: IgG 的选择性吸附

为了测试本发明新的非芳族磺酰胺配体是否选择性地吸附人免疫球蛋白(IgG),在不同条件下对 IgG 和三种不同的模型蛋白的吸附性进行测试。这种测试方法的原理是,将蛋白质(15 μ l)注射到 HR5/5 柱(含有固定在 Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences, Uppsala, 瑞典)上的磺酰胺配体)中,该柱用缓冲液 A (含有盐和缓冲液组分)平衡。将 15ml 缓冲液 A 泵过柱子,然后应用从缓冲液 A 至缓冲液 B (缓冲液 B 含有缓冲液组分但没有盐)的 5ml 线性梯度(参见以下 UNICORN™方法)。然后监测 280nm、254nm 和 215nm 处的层析图。

为了评价从柱中吸附的样品量和洗脱的样品量,将加到柱子中的相同数量的样品直接注射到监测器内,对反应进行积分。

实验

使用六种组合的吸附缓冲液(缓冲液 A#)和解吸缓冲液(缓冲液 B#):

1. 缓冲液 A1: 20mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.4) + 0.50M Na₂SO₄
缓冲液 B1: 20mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)
2. 缓冲液 A2: 20mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.4) + 0.25M Na₂SO₄
缓冲液 B1: 20mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)
3. 缓冲液 A3: 20mM 乙酸盐缓冲液(pH 4.0) + 0.50M Na₂SO₄
缓冲液 B2: 20mM 乙酸盐缓冲液(pH 4.0)
4. 缓冲液 A4: 20mM 乙酸盐缓冲液(pH 4.0) + 0.25M Na₂SO₄

- 缓冲液 B2: 20mM 乙酸盐缓冲液(pH 4.0)
5. 缓冲液 A2: 20mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.4) + 0.25M Na₂SO₄
- 缓冲液 B3: 100mM 乙酸盐缓冲液(pH 4.0)
6. 缓冲液 A5: 20mM 甘氨酸缓冲液(pH 10.0) + 0.50M Na₂SO₄
- 缓冲液 B4: 20mM 甘氨酸缓冲液

样品

所使用的样品是牛血清白蛋白(BSA)、核糖核酸酶 A (RIB A)、运铁蛋白(TRANSF)和人免疫球蛋白(IgG, Gammanorm)。将各蛋白质溶解于缓冲液 A 中, 浓度为 15mg/ml, 每次只向柱中注入一种蛋白质。

仪器

装置

液相层析法

(LC)系统: ÄKTA™ Explorer (Amersham Biosciences, Uppsala, 瑞典) 10 XT 或相当的装置。

软件: UNICORN™

注射量: Superloop™ 15µl

柱: HR 5/5

仪器参数

流速: 0.5 ml/min

检测器池: 10 mm

波长: 280 nm、254 nm 和 215 nm

UNICORN™ 方法

主要方法:

0.00 基准 CV, 1.00{ml}, 任何

0.00 柱位置 位置 1 旁通
 0.00 自动调零 UV
 0.00 波长 280 {nm} 254 {nm} 215 {nm}
 1.00 波长 280 {nm} 254 {nm} 215 {nm}
 1.10 注射(1)#VIAL, 10#INJVOL1
 {μl}, No, NoAir
 1.10 自动调零 UV
 4.00 柱位置(位置 2)KOLONN
 5.00 注射(1)#VIAL2, 10#INJVOL2
 {μl}, No, NoAir
 20.00 梯度 100 {%B}, 2.00 {基准}
 25.00 梯度 100 {%B}, 0.00 {基准}
 25.10 梯度 0 {%B}, 1 {基准}
 29.00 梯度 0 {%B}, 0 {基准}
 34.00 梯度 0 {%B}, 0 {基准}
 34.10 结束方法

结果与讨论

1(a) 磺酰胺配体：pH 7.4 时吸附和解吸条件

为了确证非芳族磺酰胺配体是否选择性地吸附免疫球蛋白，将人 IgG 上样到 1ml 填充本发明新基质的柱(HR 5/5)中。此外，也上样了牛血清白蛋白(BSA)、核糖核酸酶 A (RIB A)和运铁蛋白(TRANSF)等蛋白质。将五种不同 pH 和不同盐(Na_2SO_4)含量的不同缓冲液用作吸附缓冲液。表 1 和表 2 中，列出了得自 pH 7.4 (缓冲液 A1 和 A2)的结果。如下表 1 所示，在将 0.25M Na_2SO_4 加入到流动相时，BSA、RIB A 和 TRANSF 没有被吸附到所研究的配体上。然而，IgG 已定量地被吸附到基于多胺的四个配体中的三个配体上，并且所上样 IgG 的 90%已被吸附到了第四个配体上，即基于三亚乙基四胺的配体上。

此外, 仅有一种氨(单胺), 即基于半胱胺的配体吸附 IgG。

表 1

用 20mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.4) + 0.25M Na₂SO₄ (缓冲液 A2)作为吸附缓冲液, 牛血清白蛋白(BSA)、核糖核酸酶 A (RIB A)、运铁蛋白 (TRANSF)或人免疫球蛋白(IgG)在不同磺酰胺配体上的吸附量。

磺酰胺配体 ^a	相对吸附量(%) ^b			
	BSA	RIB A	TRANSF	IgG
半胱胺	0	0	0	50
三亚乙基四胺	0	0	0	90
二亚乙基三胺	0	0	0	100
五亚乙基六胺	0	0	0	100
聚乙烯亚胺	0	0	0	100
氨 1	0	0	0	0
氨 2	0	0	0	0

^a配体已通过和 CH₃SO₂Cl 的反应转化成磺酰胺(参见磺酰胺介质的制备部分)。

^b相对吸附量: ((吸附量/上样量) × 100)。吸附量的计算根据: (上样量-用吸附缓冲液洗脱的量)。

如下表 2 所示, 如果使用较高离子强度的流动相(缓冲液 A1; 0.50M 的 Na₂SO₄), 那么运铁蛋白就会被部分地吸附到一些配体上(表 2), 而 IgG 被吸附到所有的配体上。最有选择性的配体是基于二亚乙基三胺、聚乙烯亚胺和氨 1 的磺酰胺配体(表 2), 因为 BSA、RIB A 和 TRANSF 没有被吸附到这些配体上。

表 2

用 20mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.4) + 0.50M Na₂SO₄ (缓冲液 A1)作为吸附缓冲液, 牛血清白蛋白(BSA)、核糖核酸酶 A (RIB A)、运铁蛋白 (TRANSF)或人免疫球蛋白(IgG)在不同磺酰胺配体上的吸附量。

磺酰胺配体 ^a	相对吸附量(%) ^b			
	BSA	RIB A	TRANSF	IgG
半胱胺	10	5	5	95
三亚乙基四胺	0	0	0	95
二亚乙基三胺	0	0	0	100
五亚乙基六胺	0	0	10	100
聚乙烯亚胺	0	0	0	100
氨 1	0	0	0	100
氨 2	0	0	0	60

^a配体已通过和 CH₃SO₂Cl 的反应转化成磺酰胺(参见磺酰胺介质的制备部分)。

^b相对吸附量: ((吸附量/上样量) x 100)。吸附量的计算根据: (上样量-用吸附缓冲液洗脱的量)。

上述结果表明, 根据 pH 7.4 吸附缓冲液的离子强度, 不同磺酰胺配体对于 IgG 吸附都是最适合的。

理想的免疫球蛋白的吸附剂不仅必须具有显著的选择性, 而且要能够进行有效洗脱。可以用 20mM 磷酸盐(pH 7.4), 不加盐, 将大部分吸附到的 IgG 解吸。如果用缓冲液 A1 作为流动相吸附 IgG, 那么使用解吸缓冲液 B1 就可以回收 70-100%吸附到的 IgG。然而, 当使用缓冲液 A2 吸附时, IgG 很难洗脱, 但通过使用缓冲液 B3 (100mM 乙酸盐缓冲液, pH 4.0)就能容易地被解吸。

1(b): 磺酰胺配体: pH 4.0 时吸附和解吸条件

如下表 3 和表 4 所示, 在酸性条件下吸附 IgG 显然不如在 pH 7.4

时那样有选择性。通过使用加入了 0.25M Na_2SO_4 的 20mM 乙酸盐缓冲液(pH 4.0) (缓冲液 A4)作为吸附缓冲液, 基于半胱胺、三亚乙基四胺和二亚乙基三胺的配体分别吸附 IgG 上样量的 40%、40%和 60% (表 3)。在相同条件下, 核糖核酸酶 A 和运铁蛋白没有被吸附。然而, 上样的牛血清白蛋白的 90%、10%和 100%分别被吸附到基于半胱胺、三亚乙基四胺和二亚乙基三胺的配体上。

表 3

用 20mM 乙酸盐缓冲液(pH 4.0) + 0.25M Na_2SO_4 (缓冲液 A4)作为吸附缓冲液, 牛血清白蛋白(BSA)、核糖核酸酶 A (RIB A)、运铁蛋白 (TRANSF)或人免疫球蛋白(IgG)在不同磺酰胺配体上的吸附量。

磺酰胺配体 ^a	相对吸附量(%) ^b			
	BSA	RIB A	TRANSF	IgG
半胱胺	90	0	0	30
三亚乙基四胺	10	0	0	30
二亚乙基三胺	100	0	0	60
五亚乙基六胺	0	0	0	10
聚乙烯亚胺	0	0	0	0
氨 1	20	0	0	0
氨 2	na	na	na	0

^a 配体已通过和 $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ 的反应转化成磺酰胺(参见磺酰胺介质的制备部分)。

^b 相对吸附量: ((吸附量/上样量) × 100)。吸附量的计算根据: (上样量-用吸附缓冲液洗脱的量)

na: 未分析。

上述结果表明, 基于三亚乙基四胺的配体对于 IgG 是最有选择性的被测配体。样品 IgG 含有不同免疫球蛋白的亚类(59%的 IgG1、36%的 IgG2、4.9%的 IgG3 和 0.5%的 IgG4)。如果吸附缓冲液的盐含

量增加,那么由于吸附其它蛋白质而使对 IgG 的选择性降低。表 4 显示了将缓冲液 A3 (20mM 乙酸盐缓冲液(pH 4.0) + 0.50M Na₂SO₄)用作吸附缓冲液的结果。很显然,核糖核酸酶 A 和运铁蛋白都被吸附到一些配体上。此外,与使用缓冲液 A4 的情况比较,使用缓冲液 A3 时,牛血清白蛋白被高水平吸附(表 3 和表 4)。当使用缓冲液 A3 时,最有选择性的配体似乎是基于五亚乙基六胺的配体,因为仅有 BSA、RIB 和 TRANSF 上样量的 10%、20%和 10%被分别吸附。这可以与 50%上样量被吸附的 IgG 进行比较(表 4)。

表 4

用 20mM 乙酸盐缓冲液(pH 4.0) + 0.5M Na₂SO₄ (缓冲液 A3)作为吸附缓冲液,牛血清白蛋白(BSA)、核糖核酸酶 A (RIB A)、运铁蛋白 (TRANSF)或人免疫球蛋白(IgG)在不同磺酰胺配体上的吸附量。

磺酰胺配体 ^a	相对吸附量(%) ^b			
	BSA	RIB A	TRANSF	IgG
半胱胺	100	80	70	100
三亚乙基四胺	50	80	45	70
二亚乙基三胺	100	100	0	100
五亚乙基六胺	10	20	10	50
聚乙烯亚胺	0	40	0	10
氨 1	100	30	0	100
氨 2	10	40	0	20

^a配体已通过和 CH₃SO₂Cl 的反应转化成磺酰胺(参见磺酰胺介质的制备部分)。

^b 相对吸附量: ((吸附量/上样量) x 100)。吸附量的计算根据: (上样量-用吸附缓冲液洗脱的量)。

用缓冲液 B2 (20mM 乙酸盐缓冲液, pH 4.0), 就能容易地完成所有吸附样品的定量解吸。

1(c): 磺酰胺配体: pH 10.0 时吸附和解吸条件

已经进行了几个 pH 10.0 的实验, 根据表 5, 可以看到, 通过使用吸附缓冲液 A5 (20mM 甘氨酸缓冲液(pH 10.0) + 0.5M Na₂SO₄), IgG 被定量吸附到基于半胱胺和三亚乙基四胺的配体上。然而, 用解吸缓冲液 B4 (20mM 甘氨酸缓冲液)只能洗脱出 IgG 吸附量的 10%。为了得到 IgG 的定量解吸, 就要将 pH 改为酸性条件, 例如通过使用解吸缓冲液 B3 (100mM 乙酸盐缓冲液, pH 4.0)。

表 5

用 20mM 乙酸缓冲液(pH 4.0) + 0.50M Na₂SO₄ (缓冲液 A3)、20mM 磷酸缓冲液(pH 7.4) + 0.50M Na₂SO₄ (缓冲液 A1)或 20mM 甘氨酸缓冲液(pH 10.0) + 0.50M Na₂SO₄ (缓冲液 A5)作为吸附缓冲液, 人免疫球蛋白(IgG)在两个不同的磺酰胺配体上的吸附量。

磺酰胺配体 ^a	IgG 的相对吸附量(%) ^b		
	pH 4.0	pH 7.4	pH 10.0
半胱胺	100	95	100
三亚乙基四胺	70	95	100

^a配体已通过和 CH₃SO₂Cl 的反应转化成磺酰胺(参见磺酰胺介质的制备部分)。

^b相对吸附量: ((吸附量/上样量) × 100)。吸附量的计算根据: (上样量-用吸附缓冲液洗脱的量)。

实施例 3: CH₃SO₂Cl 和 CH₃COCl 修饰的胺配体间的比较

(甲磺酰胺和乙酰胺配体)

为了证实本发明的磺酰胺结构和抗体的相互作用比乙酰胺配体的更强, 因此制备基于两种胺配体三亚乙基四胺和半胱胺的每一类型的两种配体(按照上述实验部分的实施例 2)。在下表 6 中, 显示四种不同缓冲液系统(缓冲液 B1-3 和 B5)的 IgG 吸附结果。表 6 清楚地

显示出,与乙酰胺配体比较,本发明的磺酰胺结构可以在所有试验条件下更有效地吸附 IgG。在使用缓冲液 A1 和 A5 作为吸附缓冲液时,基于半胱胺的乙酰胺配体是唯一能够吸附 IgG (上样量的 50%)的配体。然而,当 20mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中的盐浓度从 0.5M Na_2SO_4 降低到 0.25M Na_2SO_4 时,这种配体就不能吸附 IgG 了。两种甲磺酰胺配体在所有试验条件都可以吸附 IgG。这些结果清楚地表明,本发明的甲磺酰胺配体是比乙酰胺配体更好的 IgG 吸附剂。

表 6

使用四种不同吸附缓冲液时,人免疫球蛋白(IgG)在磺酰胺配体和乙酰胺配体上的吸附量。

配体	IgG 的相对吸附量(%)			
	缓冲液 A1 ^a	缓冲液 A2 ^b	缓冲液 A3 ^c	缓冲液 A5 ^d
三亚乙基四胺的甲磺酰胺衍生物 ^e	95	90	100	100
半胱胺的甲磺酰胺衍生物 ^e	95	50	70	100
三亚乙基四胺的乙酰胺衍生物 ^f	0	0	0	0
半胱胺的乙酰胺衍生物 ^f	50	0	0	50

^a缓冲液 A1: 20mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.4) + 0.50M Na_2SO_4

^b缓冲液 A2: 20mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.4) + 0.25M Na_2SO_4

^c缓冲液 A3: 20mM 乙酸盐缓冲液(pH 4.0) + 0.50M Na_2SO_4

^d缓冲液 A5: 20mM 甘氨酸缓冲液(pH 10.0) + 0.50M Na_2SO_4

^e配体已通过和 $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ 的反应转化成磺酰胺(参见磺酰胺介质的制备部分)

^f配体已通过和 CH_3COCl 的反应转化成酰胺(参见制备部分)。

图 1

