



(12) 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 88107266.4

[51] Int.Cl⁴
C07K 3/22

(43) 公开日 1989年5月3日

[22] 申请日 88.10.21

[30] 优先权

[32] 87.10.23 [33] US [31] 111,886

[71] 申请人 先灵公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 戴维·纳维

唐聚泰

[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 姜建成 林玉贞

B01D 15/04

说明书页数: 11 附图页数:

[54] 发明名称 蛋白质纯化方法

[57] 摘要

公开了一项纯化含有密切相关杂质的粗蛋白的离子交换层析技术,还测定了所需蛋白与杂质的等电点。

也公开了利用阳离子交换树脂将该技术用于GM-CSF 纯化的方法。

<20>

权 利 要 求 书

1. 一种将粗蛋白分离成较纯的蛋白组份及杂蛋白组份的方法，其特征为在纯蛋白与杂蛋白带相反电荷的pH下，使粗蛋白与离子交换树脂接触，使所述组份之一选择性地结合到离子交换树脂上。

2. 上述权利要求1的方法，其特征为离子交换树脂为强离子交换树脂。

3. 上述权利要求1或2的方法，其特征为较纯的蛋白组份结合到离子交换树脂上。

4. 上述权利要求1-3中任何一项方法，其特征为结合在离子交换树脂上的组份随后被洗脱。

5. 上述权利要求1-4中任何一项的方法，其特征在于将粗蛋白的pH调到待分离组份等电点的范围内，以放大组份间净电荷的差别。

6. 上述权利要求1-5中任何一项的方法，其特征为通过计算机模拟或利用等电聚焦电泳来测定蛋白组份的等电点。

7. 上述权利要求1-6中任何一项的方法，进一步的特征在于通过以下手段来测定组份间放大的净电荷差别：

A. 测定纯蛋白及杂质的等电点，及

B. 选择一等电点范围之内的pH，使得纯蛋白及杂质所带电荷相反，并存在一放大的组份间净电荷差别。

8. 上述权利要求1-7中任何一项的方法，其进一步的特征在于纯化蛋白为rDNA蛋白。

9. 上述权利要求 1 - 8 中任何一项的方法，其进一步的特征在于较纯的蛋白组份包括粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、白细胞干扰素、淋巴母细胞类干扰素、生长激素、超氧化物歧化酶、促红细胞生长素、抗凝血酶 III、催乳激素、纤维蛋白溶酶原，促乳素、脲激酶及维生素 B₁₂-结合蛋白。

10. 上述权利要求 1 - 9 中任何一项的方法，其进一步特征在于纯蛋白为 GM-CSF。

11. 上述权利要求 1 - 10 中任何一项的方法，其进一步特征在于在阴离子交换柱上结合高等电点杂质，并在凝胶过滤柱上除去高分子量和低分子量杂质。

12. 通过上述权利要求 1 - 11 中任何一项的方法制备的纯化蛋白。

13. 通过上述权利要求 1 - 12 中任何一项的方法制备的纯化 GM-CSF。

蛋白质纯化方法

离子交换层析是一种常规的层析技术，该技术性质温和，成本低，容量大，且易于测量。然而，迄今尚没有一种技术可用于从蛋白质尤其是 rDNA 蛋白质中分离去除密切相关的杂质。

人重组 GM-CSF 就是这样一种 rDNA 蛋白质的例子。GM-CSF 是一些支持血液中的粒细胞和巨噬细胞生长发育的因子，最近有几个实验室已克隆了 GM-CSF 的互补 DNA (cDNA) 并进行了顺序测定。此外，已从 M₀ 细胞系的培养上清液中纯化出了非重组 GM-CSF (见美国专利 4,438,032)，并测定了 N 末端头 16 个氨基酸的顺序 (Gasson et al., Science, 226: 1339-1342, 1984)。在人的各种 GM-CSF 中，观察到了核苷酸顺序和氨基酸顺序的不均一性。例如，在氨基酸水平上，在距 N 末端丙氨酸 100 位处，既观察到了苏氨酸，也观察到了异亮氨酸，说明在人群中，GM-CSF 可以有几种等位形式或多种类型。

目前有许多从头制备和克隆 cDNA (如 GM-CSF 的 cDNA) 及构建 cDNA 文库的方法。举例来说，可从产生具有所需活性的多肽的细胞 (如未转化的人 T 细胞) 中提取总 mRNA。可以利用引物启动的反转录由该总 mRNA 构建双链 cDNA，首先合成每个 mRNA 顺序的互补链，然后再利用引物合成第二条链。随后，可对 cDNA 进行克隆即，通过互补均聚物尾巴或由含适当限制位点的连接子片段产生的粘

性末端，将 cDNA 连入合适的质粒或噬菌体载体中，然后转化合适的宿主。可用范围广泛的表达系统（即宿主-表达载体的结合体）来产生利用本发明方法纯化的蛋白质。可能的宿主细胞类型包括细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞等，但不限于此。

已公开了从宿主细胞中提取 GM-CSF 并随之将其纯化的各种方法，但 GM-CSF 并不总是以良好产率并同时保留生物活性而被充分纯化的。

本发明的目的是将一粗蛋白分离成较纯的蛋白组份和杂质蛋白组份的方法，其特征为在使纯化蛋白和杂质带相反电荷的 pH 下，使粗蛋白与离子交换树脂接触，其中一个组份选择性地结合到离子交换树脂上。离子交换树脂最好是强离子交换树脂，而且最好是纯化蛋白组份结合在离子交换树脂上。结合在离子交换树脂上的组份最好以洗脱方式进行收集。

粗蛋白的 pH 最好调到待分离组份的等电点范围，以便放大组份间净电荷的差别。

本发明的另一目的是测定可将粗蛋白分离成较纯蛋白组份和杂蛋白组份的 pH 的方法，其特征为测定待回收纯蛋白和待除去杂蛋白的等电点，以及在等电点范围内测定纯化蛋白和杂质带相反电荷的 pH，在该 pH 下并且存在有所述电荷之间的放大的差别。蛋白组份的等电点最好由计算机模拟测定，或利用等电聚焦电泳测定。

上述方法可用于纯化 rDNA 蛋白，具体说是粒细胞和巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)，更具体说是通过使之与 $\Delta 4$ GM-CSF 分离而纯化 GM-CSF。

在一个具体的优选方案中，蛋白质的纯化通过使蛋白质依次接触

下述物质进行：

A. 阴离子交换树脂如四级胺树脂，它最好与交联葡聚糖、纤维素、琼脂糖或丙烯支持物连接；

B. 阳离子交换树脂，最好具有与交联葡聚糖、纤维素、琼脂糖或丙烯支持物连接的磺酸官能团；

C. 凝胶过滤装置，最好能够分离约5,000到100,000道尔顿的蛋白。

本发明涉及用以纯化粗蛋白的高分辨率离子交换层析分离技术，特别是粗 rDNA 蛋白。在该项技术中，层析在待回收的纯蛋白及待除去杂质的等电点附近进行，最好是在可放大纯化蛋白和杂质间电荷差别（如最大值）及使分子带相反电荷（极性化）的 pH 下进行。此放大的净电荷差别仅在等电点附近发生，它可用来选择合适的离子交换层析条件，使得在几乎不带电荷时也能发生与离子交换树脂的选择性结合。为方便起见，该技术此后称为得尔它等电点（DIP）层析。

通过下列技术将与所需 rDNA 蛋白紧密相关的 rDNA 杂质从粗蛋白中除去是很困难的，这些技术包括凝胶过滤层析、离子交换层析，疏水作用层析、反相高效液相层析、金属螯合亲和层析及其它常规类型的层析。这些与所需蛋白紧密相关的杂质，通常是与所需蛋白的分子量和电荷分布非常接近的蛋白质，它们通常缺少一个（或多个）带电荷的氨基酸。这些杂质的例子有由切下一个易被水解并易受层析相互作用的肽末端而形成的蛋白降解产物。这种杂质通过常规的离子交换层析是很难分离的。

DIP 层析技术在许多方面不同于常规的离子交换层析。DIP

在待分离蛋白只具有很少净电荷的 pH 下进行。即在这样的 pH 下将样品输入离子交换树脂，该 pH 仅距离所需蛋白及其密切相关杂质的等电点 (pI) 不到一个单位。这与常规的离子交换层析显著不同，后者在所需蛋白带有强电荷的 pH 下进行，其中上样在离等电点 1 - 2 个 pH 单位下进行，其数量级大于 DIP 层析的数量级。

进行 DIP 的 pH 通过计算机模拟所需蛋白及相关杂质的电荷密度与 pH 的关系来预测，或通过分析技术如等电聚焦电泳来预测。在常规的离子交换层析中，上柱 pH 是通过所需蛋白总的净电荷确定的，上柱条件则凭经验选择（如果有所选择的话）。确定洗脱条件则需要进行繁冗的试验及误差修正。

在常规离子交换层析中，没有企图使杂质相对于所需蛋白带有极性，而在 DIP 层析中，所选择的上样 pH 介于密切相关杂质的 pI 与所需蛋白的 pI 之间，因此，所需蛋白带有与极性杂质相反的电荷。

在 DIP 层析中，施加高离子强度环境以减少上样期间蛋白与蛋白的相互作用，并选用强离子交换剂。在常规的离子交换技术中，为了得到最大的分辨率，最好采用弱离子交换树脂及低离子强度的上样条件。在 DIP 层析中，上样期间蛋白与蛋白间较低的相互作用，导致上样阶段的高度选择性结合及非常好的分辨率，并在正常的梯度洗脱期间得到进一步的分离。在常规的离子交换层析中，上样期间只发生非选择性结合，因此上样期间只能获得成组的分离；在由结合在固体基质上的局部高密度蛋白引起的强烈的蛋白-蛋白相互作用下，大部分分离作用在洗脱阶段获得。

可利用商业上提供的软件及适当的计算机（如主机、微机或私人

电脑) 来实施电荷密度与 pH 关系的计算机模拟。例如, 可利用 VAX 计算机 (Digital 公司) 及成套软件如“多肽分析系统” (Intelligentics, Inc., Copyright 1981, 1982, 1983, 1984, 1985 及 1986)。利用该软件, 将一级氨基酸顺序输入, 便可得到不同 pH 下电荷密度的分布。另外, 根据本领域技术人员熟知的方法, 可利用等电聚焦 (IEF) 凝胶电泳来测定 pI。

DIP 层析法可用于蛋白质分离, 特别是其等电点在不使蛋白变性的 pH 范围内的重组蛋白的分离。许多蛋白的等电点是已知的。例如, 见 Righetti, et. al. 的长篇综述文章 (“Isoelectric Points and Molecular Weights of Proteins- A New Table”, J. Chrom 220: 115-194, 1981)。具有治疗意义和不同等电点因此适于 DIP 层析的蛋白质例子有 GM-CSF、白细胞和淋巴母细胞类干扰素、生长激素、超氧化物歧化酶及促红细胞生成素。其它蛋白质包括抗凝血酶 III、催乳激素、纤维蛋白溶酶原、促乳素、尿激酶和维生素 B₁₂-结合蛋白。

采用 DIP 层析的一个例子是下列纯化人重组 GM-CSF 的方法。纯化人重组 GM-CSF 的一个特别困难的方面是除去缺失 4 个 N-末端的氨基酸、称之为 $\Delta 4$ 的 GM-CSF 降解产物。GM-CSF 的纯化通常通过四级氨乙基柱的阴离子交换、凝胶过滤及反相层析的结合而进行, 该方法不能除去 $\Delta 4$ 杂质。

但是, DIP 层析法却能成功地除去 $\Delta 4$ 杂质。首先, 将完整 GM-CSF 蛋白质与 $\Delta 4$ 杂质的计算机模拟进行比较, 测出 GM-CSF 的 pI 为 5.24, $\Delta 4$ 的 pI 为 4.98。下一步则是确定

该范围内的工作 pH, 该 pH 必须 (a) 使 GM-CSF 与 $\Delta 4$ 所带电荷相反及 (b) 能使电荷间差别充分放大以便能够进行分离。在完整的 GM-CSF 与 $\Delta 4$ 杂质之间, 在很宽的 pH 范围内存在 1 个电荷/分子 (1 ch/mol) 的微小电荷差别即在 pH 0.5 时, 电荷分别为 +1.6 和 +1.5, 在 pH 11.5 时, 电荷为 -1.1 和 -1.2)。但是, 正如计算机模型所预测, 在接近 pH 5 处, 完整 GM-CSF 与 $\Delta 4$ 杂质间的电荷差别被放大 (即相对电荷差别增加), 并且分子被极性化: pH 5 时, GM-CSF 为 +0.9 ch/mol, 而 $\Delta 4$ 杂质仅为 -0.1 ch/mol。因此, 满足了 DIP 的两个必要条件: 电荷的极性及放大。

为了进一步增加完整 GM-CSF 与大肠杆菌宿主细胞的低 pI 杂质及蛋白水解不稳定因子的分离, 在上样期间采用高离子强度。这减少了分子间的静电相互作用。因此, 在这种高离子强度的条件下, 最好采用在 pH 5 之下的强阳离子交换剂。例如与交联葡聚糖、纤维素、琼脂糖或丙烯支持物 (如 S-Sepharose, Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ 制造) 连接的磺酸官能团。

发现利用这种阳离子交换树脂柱, 可一步除去以前用其他方法不能除去的不必要的 $\Delta 4$ 杂质, 各种低 pI 杂质、20 K 大肠杆菌杂质, 以及蛋白水解因子, 因而稳定最终产物。阳离子交换层析可将 GM-CSF 的纯度从约 50% 提高到约 90%, 产率为 70-80%。如果接着进行凝胶过滤, GM-CSF 的纯度可提高到约 99%。

以下是分离和纯化 GM-CSF 方法的一般性描述。最好是在四级氨乙基柱上进行的阴离子交换层析, 是纯化 GM-CSF 的常规步骤, 用于在杀死宿主细胞后从上清液中除去高 pI 杂质。凝胶过滤也

是常规步骤，用于除去高分子量及低分子量的杂质。而在下述方法中，纯化蛋白组份与强离子交换树脂结合，也有这样的可能，即在本发明的某个实施方案中，杂蛋白组份与强离子交换树脂结合。同样，虽然在说明书和实例中是使粗蛋白连续通过离子交换树脂柱，也可以采用其他的接触方法，例如批量接触法。

总的评价：除非特别说明，操作一般在 $2 - 15^{\circ}\text{C}$ 下进行。由考马斯亮兰结合法测定每一步骤的蛋白浓度。在任一层析柱中如果未取得所期望的纯度，则使洗脱组份在同样的柱上再层析，或再重复前一步骤或前几个步骤。这个后处理过程可对一批或几批洗脱的边缘组份进行。所有步骤的浓度可由硫酸铵沉淀，等电聚焦沉淀和/或超过滤控制。缓冲液用去离子水(DI)、反渗透水(RO)或注射用水(WFI)配制。

第 I 步：在四级胺柱上层析

用缓冲液如 1M Bis-tris (二〔2-羟乙基〕亚氨基-tris-〔羟甲基〕甲烷) 和/或 4N HCl 将 GM-CSF 粗提液 pH 调至 5 - 7.5。然后由离心和/或过滤使溶液澄清。通过用水稀释或加入盐溶液(如 4N NaCl) 将导电率调到低于 10 毫西门子/毫米(mS/cm)。以每升凝胶不超过 50 克蛋白的上样量将样品加到四级胺柱上(即连到交联葡聚糖、纤维素、琼脂糖或丙烯支持物上的四级胺官能团，如 Pharmacia 公司出品的 Q-Sepharose)。用缓冲液(如 20 mM Bis-tris) 配制的 0 - 0.4M 范围的 NaCl 或其它适当的盐溶液进行梯度洗脱。合并适当的组份，以待进一步处理。

第 II 步：在磺酸柱上层析

用酸如 1 M 乙酸或 4 N 盐酸或碱如 6 N NaOH 将合并组份的 pH 调到 5，D I P 层析测定表明该 pH 在蛋白组份的等电点范围内。用缓冲液如 0.01 M 乙酸将导电率调到 1.3 mS / cm，再用 NaOH 将 pH 调到 5。将溶液通过 0.2 微米的过滤器过滤，然后以每升柱物质不超过 20 克蛋白的上样量上到磺酸柱中（即连到交联葡聚糖、纤维素、琼脂糖或丙烯支持物上的磺酸官能团，如 S-Sepharose）。用缓冲液（如 20 mM 乙酸、0.13 M NaCl、pH 5）配制浓度梯度至 0.5 M 的盐溶液（如 NaCl），用其进行梯度洗脱。合并适当的组份，以待进一步处理。该层析步骤一般需要重复。

第 III 步：硫酸铵沉淀

向合并的 S-Sepharose 组份中加入硫酸铵到最终浓度为 50% - 60% 饱和度。离心收集沉淀。沉淀可在冷冻条件下贮存。

第 IV 步：凝胶过滤层析

将硫酸铵沉淀溶于缓冲液如 10 mM 硫酸铵、50 mM 柠檬酸、含有高达 0.35 M 的盐（如 NaCl）的 pH 为 6 的缓冲液中。将溶液离心，并在上样前通过 0.2 微米过滤器过滤，然后上到分离约 5,000 至约 100,000 道尔顿蛋白的凝胶过滤柱上，如 Sephacryl S-200 HR（Pharmacia 公司制造），该柱预先用同样的缓冲液平衡。每升凝胶的上柱量不大于 3.5 克蛋白质。用同样的缓冲液洗脱凝胶过滤柱，合并适当的组份。组份对一缓冲液（如 10 mM 磷酸盐、2 mM 柠檬酸盐、pH 为 7.2）透析。另外，整个步骤 IV 可在后一缓冲液中进行。

第 V 步：纯化大批 GM-CSF

将合并的组份通过 0.2 微米或孔径更小的过滤器过滤，然后在

- 20 °C或更低的温度下贮存。

在下列参考文献中公开了一般的 IEF 凝胶电泳方法：

1. ELECTROPHORETIC TECHNIQUES, Academic Press, (1983)
Ed: G.F. Simpson & M. Whittaker
"Recent Developments in Isoelectric-focusing"
J.S. Fawcett, p. 57
2. ISOELECTRIC-FOCUSING: Theory, Methodology and
Application P.G. Righetti, Elsevier Biomedical Press,
(1983) p. 148
3. APPLICATION OF SEPARATOR ISOELECTRIC-FOCUSING WITHIN
pH RANGE 4-6, P. Gill, Electrophoresis 6:282 (1985)
4. RAPID STAINING OF PROTEINS IN ULTRA THIN ISOELECTRIC
FOCUSING IN POLYACRYLAMIDE GEL,
M.D. Frey, Electrophoresis 3:27-32 (1982)
5. ULTRA THIN LAYER ISOELECTRIC-FOCUSING OF ENZYMES IN
LIVER SAMPLES OF WAGTAILS,
M. Germeiner, Electrophoresis 3:146 (1982)

以下是一实施例，说明采用 D I P 技术纯化 GM - C S F 的方法。

实施例 1

GM - C S F 的纯化

第一步：四级胺柱层析

用 3.6 升 1 M Bis-tris 缓冲液 (pH 6.0) 及 2.0 升
4 N HCl 将 180 升 GM - C S F 粗提液的 pH 调至 6.0。用
Sharples 离心机以 0.75 升/分钟的进料速率离心使溶液净化。

上清液用预冷的去离子水稀释约1.55倍，以达到最终电导率为5.5 mS/cm。用10倍柱体积的20 mM Bis-tris缓冲液(pH 6.0)平衡12升的Q-Sepharose柱，然后以每毫升树脂20 mg蛋白的上样量将43.6升提取液上柱。用120升平衡缓冲液以250 ml/min的流速洗涤Q-Sepharose柱(直径25 cm)。在78升含有0.03 M NaCl的20 mM Bis-tris缓冲液(pH 6.0)与78升含有0.32 M NaCl的20 mM Bis-tris(pH 6.0)之间建立线性梯度。基于凝胶电泳(SDS-PAGE)的结果合并组份(每组份1.2升)，合并的蛋白(4.9 L)用于第二步层析。

第二步：磺胺柱层析

用49 ml 1 M乙酸(pH 5.0)将第一步合并组份(4.9 L)的pH调到5，用2升0.01 M乙酸将电导率调到15 mS/cm再用NaOH将pH调到5。将溶液通过0.2微米的过滤器过滤，然后以4.7 mg蛋白/ml柱物质的上样比率上到0.8 L S-Sepharose柱中，该柱预先用含有0.13 M NaCl pH为5的20 mM乙酸溶液平衡。用2.4 L平衡缓冲液洗涤S-Sepharose柱，然后用建立在5.6 L含0.13 M NaCl pH为5的20 mM乙酸及5.6升含0.5 M NaCl pH为5的20 mM乙酸间的线性梯度洗脱。根据凝胶电泳的结果合并组份。重复该层析步骤。

第三步：硫酸铵沉淀

向第二步的合并组份(240 L)加入硫酸铵，使其浓度达到351 g/L(55%饱和度)。溶液在4℃下不搅动放置2小时，

然后在4℃下以4·500 rpm离心30 min, 得到沉淀。

第四步: 凝胶过滤层析

将硫酸铵沉淀溶于36 ml 18 mM磷酸钠、2 mM乙酸、pH 7·2的缓冲液中。溶液在4·500 rpm下离心30分钟, 上清液通过0·2微米过滤器过滤。滤液以0·2 mg/ml胶的上样比例上到1·8 L预先用pH为7·2的柠檬酸盐缓冲液平衡的Sephacryl S-200 HR柱中。用1·9升同样的pH7·2的缓冲液洗脱。基于蛋白测定结果合并组份。

第五步: 过滤

由第四步得到的合并组份通过0·2微米的过滤器过滤, 然后在-20℃下贮存。