(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114917884 A
(43)申请公布日 2022.08.19

(21)申请号 202210695588.1

(22)申请日 2015.02.18

(30)优先权数据
1450290-0 2014.03.14 SE

(62)分案原申请数据
201580013843.8 2015.02.18

(71)申请人 思拓凡生物工艺研发有限公司
地址 瑞典乌普萨拉

(72)发明人 J-L.马洛伊塞 K.布斯森 K.拉克 B.诺伦 H.斯科格拉

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 初明明

(51)Int.Cl.
B01J 20/26(2006.01)
B01J 20/28(2006.01)
B01J 20/30(2006.01)

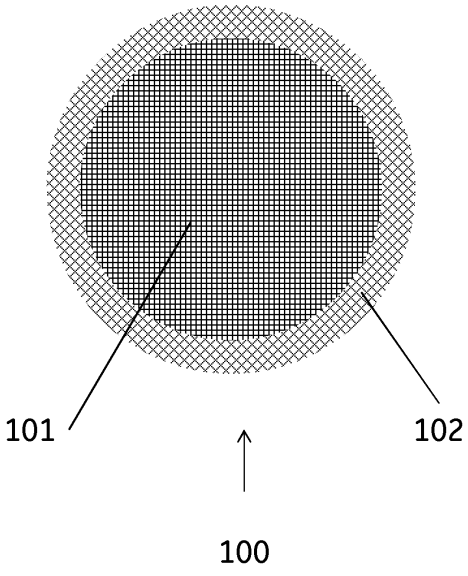
权利要求书2页 说明书12页 附图4页

(54)发明名称

用于生物颗粒纯化的分离基质

(57)摘要

本发明公开用于生物颗粒纯化的分离基质，该基质包含具有多孔核实体和覆盖核实体的多孔壳实体的多个颗粒，其中核实体包含存在于共价结合配体上的至少50μmol/ml伯胺，显示至少2个伯胺/配体，壳实体包含小于20μmol/ml伯胺。本发明还公开纯化生物颗粒的方法，和制备分离基质的方法。



CN 114917884 A

1.一种用于纯化生物颗粒的尺寸排阻色谱法分离基质,该基质包含具有多孔核实体(101)和覆盖所述核实体的多孔壳实体(102)的多个颗粒(100),其中

a)所述核实体包含存在于共价结合配体上的至少50μmol/ml伯胺,显示至少2个伯胺/配体,并且

b)所述壳实体包含小于20μmol/ml伯胺;

其中显示的伯胺与氮原子总量之比为至少0.5,例如至少0.7,或至少0.9;

其中所述基质能够在具有至少10mS/cm,例如至少20mS/cm的电导率的含水缓冲液中结合至少20mg卵白蛋白,例如,至少40mg卵白蛋白/ml基质。

2.权利要求1的分离基质,其中所述配体显示至少2个伯胺/配体,例如,至少3或至少4个伯胺/配体。

3.前述权利要求1-2中任一项的分离基质,其中所述配体通过仲或叔胺键连接到所述核实体。

4.前述权利要求1-2中任一项的分离基质,其中所述配体中氮和氧原子的含量为至少20%重量。

5.前述权利要求1-2中任一项的分离基质,其中伯胺氮的含量为至少18%重量。

6.前述权利要求1-2中任一项的分离基质,其中所述配体选自通过胺连接的三(2-氨基乙基)胺和聚烯丙胺。

7.前述权利要求1-2中任一项的分离基质,其中所述配体包括至少1kDa,例如,至少10kDa分子量的聚烯丙胺。

8.权利要求7的分离基质,其中所述聚烯丙胺不经交联。

9.前述权利要求1-2中任一项的分离基质,其中所述壳实体具有1至10微米的平均厚度。

10.前述权利要求1-2中任一项的分离基质,其中所述颗粒为基本球形。

11.前述权利要求1-2中任一项的分离基质,其中所述壳实体具有所述颗粒直径或等效球直径的0.5至6%的平均厚度。

12.前述权利要求1-2中任一项的分离基质,其中所述壳实体具有对于球状蛋白60至1000kDa,例如100-1000或400-800kDa的截断分子量。

13.一种纯化生物颗粒的方法,所述方法包括以下步骤:

a)提供权利要求1至12中任一项的分离基质;

b)使所述基质与包含生物颗粒和至少一种污染蛋白的液体接触,使得所述污染蛋白结合到所述基质;

c)从所述基质分离所述液体,并回收具有纯化生物颗粒的所述液体。

14.权利要求13的方法,其中所述液体具有至少10mS/cm的电导率。

15.权利要求13或14的方法,所述方法进一步包括以下步骤:

d)将基质与包含小于15%,例如小于5%的有机溶剂的再生溶液接触再生所述基质;并且

e)重复步骤a)-c)至少1次,例如,至少5次,至少10次,或至少50次。

16.权利要求15的方法,其中所述再生溶液包含碱。

17.权利要求15或16的方法,其中在步骤d)后基质中的残余蛋白含量小于100μg/ml。

18.权利要求13至17中任一项的方法,其中所述生物颗粒选自病毒、类病毒颗粒、细胞、

细胞器和质粒。

19.权利要求13至18中任一项的方法，其中至少40mg/ml，例如至少60mg/ml所述污染蛋白结合到基质。

20.权利要求13至19中任一项的方法，其中所述液体包含缓冲物质。

21.权利要求20的方法，其中所述缓冲物质包含缓冲阳离子和/或单价缓冲阴离子。

22.权利要求13至21中任一项的方法，其中所述液体的pH为6.0-8.5，例如6.5-8.5或6.5-8.0。

23.权利要求13至22中任一项的方法，其中所述污染蛋白为白蛋白，例如，卵白蛋白。

24.权利要求23的方法，其中所述生物颗粒包含流感病毒，并且所述液体包含从受精卵得到的尿囊液。

25.权利要求13至24中任一项的方法，所述方法进一步在步骤b)前包括步骤a')，通过交叉流过滤，例如超滤和/或微滤调节所述液体。

26.权利要求13至25中任一项的方法，所述方法进一步在步骤c)后包括步骤c')，离子交换色谱法，例如阴离子交换色谱法。

27.权利要求1至12中任一项的分离基质用于纯化生物颗粒的用途。

28.权利要求27的用途，其中所述生物颗粒选自病毒、类病毒颗粒、细胞、细胞器和质粒。

29.权利要求27或28的用途，用于权利要求13至26中任一项的方法。

30.一种制备权利要求1至12中任一项的分离基质的方法，所述方法包括以下步骤：

a)提供多个多孔多糖颗粒，例如，交联琼脂糖凝胶颗粒；

b)使所述颗粒与烯丙基化试剂反应，以得到至少50μmol/ml共价结合到颗粒的烯丙基；

c)使所述颗粒与卤素反应最多30分钟的时间，然后与碱性水溶液反应；

d)使包含多个伯胺的配体前体偶合到剩余烯丙基。

31.权利要求30的方法，其中所述颗粒为基本球形，且具有15-400微米，例如30-100微米体积平均直径。

32.权利要求30或31的方法，其中所述配体前体每分子具有至少3个伯胺，并且通过首先使烯丙基与卤素水溶液反应，然后在碱性条件与配体前体反应偶合到烯丙基。

33.权利要求30至32中任一项的方法，其中所述配体前体选自三(2-氨基乙基)胺和聚烯丙胺。

34.权利要求30至33中任一项的方法，其中所述烯丙基化试剂选自烯丙基卤化物和烯丙基缩水甘油醚。

用于生物颗粒纯化的分离基质

[0001] 发明技术领域

本发明涉及用于纯化生物颗粒的分离基质,更具体地讲,涉及用于纯化疫苗抗原(例如,病毒颗粒)的分离基质。本发明还涉及分离基质用于纯化生物颗粒的用途,纯化生物颗粒的方法,和制备分离基质的方法。

[0002] 发明背景

在很多疫苗中,抗原由具有显著大于蛋白分子大小的颗粒组成。这是对于例如病毒、类病毒颗粒、细菌和质粒抗原的情况。在这些抗原的产生过程中,它们与蛋白和显著小于抗原的其它污染物类一起产生。这些物类可以为例如卵-衍生抗原的卵蛋白和宿主细胞蛋白以及在细胞培养中产生的抗原的培养基组分。这些蛋白以高量存在,并且必须在抗原处理期间去除,因为它们可例如引起变态反应。

[0003] 尺寸排阻色谱法已传统用于基于尺寸分离抗原和污染蛋白,但对产量的增加需求和过程经济已促使寻找替代方法。最近,已可利用一类色谱介质,其中用具有正电荷和疏水部分二者的配体功能化色谱珠粒的内核,而外壳为惰性,并具有小于病毒抗原的孔径。污染蛋白可通过壳穿透进入核,在此,它们被配体强力结合,并且病毒颗粒在不结合下通过柱,并且可收集在流过物中。此类介质可以商品名Capto™ Core 700购自GE Healthcare Bio-Sciences AB。类似介质也描述于WO9839364、WO2009131526和US7208093,所述专利全文通过引用结合到本文中。

[0004] 大多数抗原在离子强度接近在生理条件下正常的条件下产生,即,约0.1-0.2mol/l,对应于约10-20mS/cm电导率。在这些条件下,存在产物的结合容量受到限制,特别是依赖电荷相互作用机制的那些产物,因此,为了避免进料施加到色谱介质前稀释或缓冲剂交换,期望提高高盐条件下的结合容量。

[0005] 另外,期望再用色谱介质进行许多分离循环。这需要在循环之间净化(也称为再生)介质,以去除吸附的蛋白。由于有疏水部分存在,这可能有挑战性,并且可能需要加入溶剂,例如醇,这在操作期间导致燃烧和爆炸风险。在增加配体的疏水性以提高在高离子强度的结合容量的情况下,这一问题变得更加严重。

[0006] 因此,需要新基质,该基质允许在高离子强度下纯化疫苗抗原和来自污染蛋白的其它生物颗粒,同时允许在再用前安全和方便地净化基质。

[0007] 发明概述

本发明的一个方面提供能够在高离子强度结合高量蛋白并允许在流通级分中回收生物颗粒的可再生分离基质。这用权利要求1限定的分离基质达到。

[0008] 一个优点是基质对于一般污染蛋白在100-200mM和更高离子强度仍具有高结合容量。其它优点是,基质不结合病毒颗粒或类病毒颗粒,且可容易通过施加无溶剂再生溶液去除宽范围的顽固吸附污染蛋白,从而允许方便地再用基质。

[0009] 本发明的第二个方面是提供用于分离生物颗粒的方法。这用权利要求限定的方法达到。这种方法的优点包括在高离子强度结合高量污染蛋白和容易再生基质的可能性。

[0010] 本发明的第三个方面是提供分离基质用于纯化生物颗粒的用途。这用权利要求限

定的方法达到。

[0011] 本发明的第四个方面是提供制备适用于纯化生物颗粒的分离基质的方法。这用权利要求限定的方法达到。

[0012] 本发明的其它适合实施方案如从属权利要求中所述。

[0013] 附图简述

图1显示本发明的基质的示意结构。

[0014] 图2显示配体的实例:a)三(2-氨基乙基)胺配体前体,b)三(2-氨基乙基)胺偶合配体,c)1,3-二氨基-2-丙醇配体前体,d)1,3-二氨基-2-丙醇偶合配体,e)聚烯丙胺配体前体,和f)聚烯丙胺偶合配体。

[0015] 图3显示本发明的合成路线的实例:a)烯丙基化,b)溴化,c)失活,和d)偶合。

[0016] 图4显示用不同再生溶液再生后大肠杆菌(*E.coli*)-污染Capto™ Core 700萃取物的芯片电泳数据。泳路:1 - Mw 标记;2 - 1M NaOH;3 - 2M NaOH;4 - 2M NaOH + 30% 2-丙醇;5 - 30% 2-丙醇;6 - 1M NaOH + 20% 1-丙醇;7 - 1M NaOH + 10% 1-丙醇;8 - 1M NaOH + 5% 1-丙醇;9 - 20% 1-丙醇;10 - 0.5M NaOH/10mM HCl/0.5M NaOH;11 - 1M NaOH/10mM HCl/1M NaOH;12 - 20%丙二醇;13 - 40%丙二醇;14 - 1M NaOH + 20%丙二醇;15 - 1M NaOH + 40%丙二醇;16 - 8M 脲/1MNaOH;17 - 1M脲/1M NaOH;18 - 8M 脲;19 - 8M 脲 + 0.1M柠檬酸;20 - 8M 脲 + 1M NaCl + 0.1M柠檬酸。

[0017] 图5显示用不同再生溶液再生后大肠杆菌-污染聚烯丙胺原型萃取物的芯片电泳数据。泳路:1 - 1M NaOH;2 - 2M NaOH;3 - 1M NaOH + 30% 2-丙醇;4 - 1M NaOH + 20% 1-丙醇;5 - 8M 脲;6 - 8M 脲 +0.1M柠檬酸;7 - 6M盐酸胍;8 - 0.5M NaOH + 1M NaCl;9 - 1M NaOH/10mM HCl/0.5M NaOH;10 - 1M脲/1M NaOH;11 - 未再生;12 - Mw标记。

[0018] 图6显示用不同再生溶液再生后大肠杆菌-污染三(2-氨基乙基)胺原型萃取物的芯片电泳数据。泳路:1 - 1M NaOH;2 - 2M NaOH;3 - 1M NaOH + 30% 2-丙醇;4 - 1M NaOH + 20% 1-丙醇;5 - 8M 脲;6 - 8M 脲 +0.1M柠檬酸;7 - 6M盐酸胍;8 - 0.5M NaOH + 1M NaCl;9 - 1M NaOH/10mM HCl/0.5M NaOH;10 - 1M脲/1M NaOH;11 - 未再生;12 - Mw标记。

[0019] 实施方案详述

在一个方面,如图1和2所示,本发明公开一种用于纯化生物颗粒的分离基质,该基质包含具有多孔核实体101和覆盖核实体的多孔壳实体102的多个颗粒100。多个内的各颗粒100可适合具有由多孔壳实体102覆盖的多孔核实体101。核实体包含存在于共价结合配体上的至少50μmol/ml伯胺,显示至少2个伯胺/配体,壳实体包含小于20μmol/ml伯胺,例如,小于10或小于1μmol/ml。术语显示指在配体处于结合态时,配体具有至少两个伯胺/配体。存在具有低于核实体的配体含量的壳实体可例如通过显微法检测。颗粒可与酸性荧光染料(例如,荧光素)或与对伯胺为反应性的荧光染料(例如,5-羧基荧光素琥珀酰亚氨基酯)接触,并且可在共焦显微镜下检测荧光的空间分布。或者,颗粒可经染色,包埋在树脂中,用切片机切片,并在常规显微镜下观察。利用两种方法,两个区域中的相对配体浓度可通过光密度法估计,绝对浓度通过乘以基质的总配体含量计算,例如,通过在本领域熟知的滴定法或分光方法测定。

[0020] 在某些实施方案中,基质能够在具有至少10mS/cm(例如,至少20mS/cm)电导率的

含水缓冲液中结合至少20mg卵白蛋白/ml基质，例如，至少30或至少40mg卵白蛋白。10mS/cm对应于约0.1M NaCl，20mS/cm对应于约 0.2M NaCl。由于大多数生理系统(例如，细胞培养、卵液、血浆、牛奶等)具有在这些范围内的电导率，因此，有利的是在这些条件下具有高蛋白结合容量，例如以卵白蛋白为例。基质也能够在甚至更高电导率(例如像20-30或30-40mS/cm)结合，这在例如液体为来自离子交换或HIC基质的洗出液时是受关注的。检验结合容量可适合在pH 7.5的Tris缓冲液中使用静态容量检验利用60min接触时间进行，如实施例中所述。

[0021] 在一些实施方案中，所述配体显示至少2个伯胺/配体，例如，至少3个或至少4个。似乎每配体的可利用伯胺数对在高离子强度的结合容量是有利的，应至少为2。如果伯胺以仅一个键到另一个碳结合到伯碳原子，例如，在氨基甲基-或氨基乙基(分别为H_2N-CH_2-和$H_2N-CH_2-CH_2-$)，则可更有利。与伯胺结合到仲或叔碳比较，这提供对蛋白较佳的可接近性。配体可具有不同分子量，可以为单体或聚合物，并且可形成较大结构的部分。

[0022] 在某些实施方案中，配体通过仲或叔胺键连接到核实体。胺键化学稳定，且容易通过配体前体上的胺和载体材料上的亲电基团(例如，环氧化物或卤代醇)之间的偶合得到。配体前体可适合为具有至少3个伯胺的物类，以便消耗1个伯胺产生连接，在偶合基质中显示至少2个其余伯胺/配体。

[0023] 在一些实施方案中，所述配体中氮和氧原子的组合含量为至少20%重量。结合配体中伯胺氮的含量可有利为至少18%重量。显示的伯胺与氮原子总量之比可以为至少0.5，例如至少0.7，或至少0.9。在这些比率下，配体亲水，即，它们不会不可逆地结合蛋白，且伯胺含量高得足以在高离子强度得到高结合。

[0024] 在某些实施方案中，配体选自三(2-氨基乙基)胺和聚烯丙胺。这些配体亲水，并显示多个伯胺，甚至在通过胺结合时。这些配体可例如包括至少1kDa分子量的聚烯丙胺，例如，至少5kDa或至少10kDa。聚烯丙胺可适合地不交联，以提供活动性和接近蛋白。结合可在单点，或者通过多点结合。单点结合可例如通过接枝聚合，或者通过聚烯丙胺上的反应性端基偶合实现。根据在本领域已知的方法，由聚烯丙胺通过胺偶合到核实体上的亲电基团或醛，可实现多点结合。

[0025] 在一些实施方案中，壳实体具有1至10微米平均厚度，例如1至6微米。最小壳厚度保证配体不可用于结合到分离基质颗粒外侧的生物颗粒，同时，为了使对核实体中蛋白的结合容量达到最大限度，壳厚度应适合地不太高。颗粒可为基本球形，例如，具有15-400微米体积加权平均直径，在此情况下，壳实体可具有颗粒体积加权平均直径0.5至6%的平均厚度。如果颗粒不是球形，壳实体可具有颗粒等效球直径的0.5至6%的平均厚度。颗粒的平均球度，定义为球(具有与指定颗粒相同的体积)的表面积与颗粒表面积之比，可以为至少0.9，例如，至少0.97。壳厚度可对经染色颗粒显微测定，如上讨论。分离基质颗粒可例如根据以下讨论方法制备，在此情况下，壳厚度可由部分失活方法控制。

[0026] 在某些实施方案中，壳实体具有对于球状蛋白60至1000kDa的截断分子量，例如100-1000或400-800kDa。这有利允许污染蛋白快速质量传递进入和退出颗粒，同时防止生物颗粒达到核实体。例如，通过在它们结合到配体的条件下比较不同分子量蛋白的结合容量，可检测截断。

[0027] 在第二个方面，本发明公开纯化生物颗粒的方法，所述方法包括以下步骤

a)提供根据以上公开的任何实施方案的分离基质；

b)使所述基质与包含生物颗粒和至少一种污染蛋白的液体接触，使得所述污染蛋白结合到所述基质；

c)从所述基质分离所述液体，并回收具有纯化生物颗粒的所述液体。

[0028] 液体可以为例如来自卵的尿囊液、细胞培养上清液、溶胞产物等，并且可例如具有至少10mS/cm或甚至至少15mS/cm的电导率，这意味液体不必大量稀释。除了污染蛋白外，其它污染物，例如DNA和/或内毒素，也可结合到基质，并因此去除。方法可以为其中基质填入柱的色谱法，也可以为间歇吸附法(例如，使用磁性基质)，或例如膨胀床吸附法(例如，使用包含高密度填料颗粒的基质颗粒)。在柱中用基质作为填充床时，床可具有1mm-1m高度，例如，1cm至30cm，或1cm至10cm。填充床可仅包含本发明的基质，但也可设想具有其它基质的混合床。

[0029] 在某些实施方案中，方法进一步包括以下步骤：

d)通过与再生溶液接触再生所述基质；并且

e)重复步骤a)-c)至少1次，例如，至少5次，至少10次，或至少50次。再生溶液可适合地不含有机溶剂，或包含小于15%重量易燃溶剂，例如小于5%重量，或小于1%重量，其有利之处在于，不必在过程中使用昂贵的防爆设备和现场。另外，它也提供更环境友好的过程。

[0030] 在一些实施方案中，再生溶液包含碱，例如0.1-2M浓度的NaOH，例如0.5-2M。碱，具体地讲，NaOH，是有用的净化剂，因为它使蛋白水解，并且在洗涤和中和后不留下任何潜在毒性残余物。

[0031] 在某些实施方案中，在步骤d)后基质中的残余蛋白含量小于100μg/ml基质。残余蛋白量，可由在0.5%SDS+28mM DTT萃取溶液中沸腾总萃取并由芯片电泳检测萃取蛋白测定，如实施例中所述。

[0032] 在一些实施方案中，生物颗粒选自病毒、类病毒颗粒、细胞、细胞器和质粒。

[0033] 在某些实施方案中，至少40mg/ml所述污染蛋白结合到基质，例如，至少60mg/ml。如果基质可载有大量液体，则是有利的，利用新基质这是可能的。熟知填充量应不超过基质的结合容量，因为这会导致穿透，并因此导致不良去除。

[0034] 在一些实施方案中，液体包含缓冲物质。例如，这种缓冲物质可包含缓冲阳离子，例如Tris、Bis-Tris、曲辛或哌嗪，和/或单价缓冲阴离子，例如乙酸根、乳酸根等。如果液体不含多价阴离子例如磷酸根，则可为有利的，因为它们可能在一些条件下与配体太强地相互作用。

[0035] 在某些实施方案中，液体的pH为6.0-8.5，例如6.5-8.5或6.5-8.0。在要纯化活的/存活的生物颗粒时，它们对pH高度敏感，在这些情况下限制可用范围。

[0036] 在一些实施方案中，污染蛋白为白蛋白，例如，卵白蛋白或血清白蛋白。白蛋白是在卵衍生进料和细胞培养二者中的普通污染蛋白。

[0037] 在某些实施方案中，生物颗粒包含流感病毒。液体可例如包括从受精卵得到的尿囊液，或者，可包括细胞培养上清液或溶胞产物。

[0038] 在一些实施方案中，方法可进一步在步骤b)前包括步骤a')，通过交叉流过滤调节所述液体，例如超滤和/或微滤。微滤，例如，在中空纤维中，可用于去除颗粒，不然可能堵塞色谱柱。如果需要，在液体施加到基质前，液体也可经过超滤，以提高生物颗粒的浓度。

[0039] 在某些实施方案中，方法可进一步在步骤c)后包括步骤c')，离子交换色谱法，例如阳离子交换色谱法。可用随后阳离子交换步骤去除任何剩余的带正电荷污染物。随后步骤也可进一步包括在具有功能核实体和惰性壳实体的基质上流通纯化。

[0040] 在第三个方面，本发明公开以上公开的分离基质用于纯化生物颗粒的用途。生物颗粒可例如选自病毒、类病毒颗粒、细胞、细胞器和质粒。用途可例如用于以上公开的方法中。

[0041] 在第四个方面，本发明公开制备以上公开分离基质的方法，所述方法包括以下步骤：

a)提供多个多孔多糖载体颗粒，例如，交联琼脂糖凝胶颗粒；

b)使所述颗粒与烯丙基化试剂反应，以得到至少50、至少100或至少200μmol/ml共价结合到颗粒的烯丙基。

[0042] c)使所述颗粒与卤素反应最多30分钟时间，然后与碱性水溶液反应；

d)使包含多个伯胺的配体前体偶合到剩余烯丙基。

[0043] 烯丙基化试剂可例如为烯丙基缩水甘油醚或烯丙基卤，例如烯丙基溴。卤素适合为溴，并且可施加到水溶液中。在步骤b)中，烯丙基遍布颗粒均匀引入，同时，在步骤b)中，与溴短接触时间只允许在各颗粒最外部分中的烯丙基和溴之间反应。与溴反应引起生成溴代醇，在碱的水溶液中转化成亲水非反应性二醇，因此导致生成惰性壳实体。如果碱的水溶液包含多元醇，多元醇可与溴代醇反应，并固定为亲水非反应性部分。也可用此类方法精细调节壳实体的孔结构。内部的烯丙基不反应，然后可用于偶合其中成为核实体的配体。壳实体的厚度可主要由与卤素的接触时间和步骤c)中所用卤素的量控制。

[0044] 在某些实施方案中，载体颗粒为基本球形，且具有15-400微米体积平均直径，例如30-100微米。载体颗粒可例如由葡聚糖、琼脂糖、琼脂、角叉菜胶、藻酸盐、纤维素、魔芋或其它适合多糖制成。琼脂糖、琼脂糖衍生物(例如，羟乙基琼脂糖)、琼脂和纤维素特别适合，因为它们可方便地以适合孔隙度和刚度制备。也可使载体颗粒交联，可通过交联剂直接交联，例如表氯醇或二环氧化物，或者通过二级交联，如美国专利6,602,990中所述。后面方法提供改善的刚度。

[0045] 在一些实施方案中，配体前体具有至少3个伯胺/分子，并且通过首先使烯丙基与卤素例如溴的水溶液反应，然后在碱性条件与配体前体反应偶合到烯丙基。

[0046] 在某些实施方案中，配体前体选自三(2-氨基乙基)胺和聚烯丙胺，例如Mw为至少5kDa的聚烯丙胺，例如，至少10kDa。

实施例

[0047] 实施例1. 原型合成

载体颗粒

所用载体颗粒为根据美国专利6,602,990所述方法制备的高度交联琼脂糖粒料，所述专利全文通过引用结合到本文中。粒料具有88微米体积加权平均直径(D50,v)，和使69%孔体积可用于Mw 110kDa葡聚糖分子的孔径分布。在根据"Handbook of Process Chromatography, A Guide to Optimization, Scale-Up and validation"(工艺色谱手册，优化、放大和验证指南) (1997) Academic Press, San Diego. Gail Sofer & Lars

Hagel eds.ISBN 0-12-654266-X, p. 368中所述的方法测定时，也可表达为使粒料上葡聚糖110kDa的Kd为0.69。

[0048] 烯丙基化

中间体5803

用6个凝胶体积蒸馏水洗涤400mL(g)载体颗粒，然后用3个凝胶体积以50%NaOH洗涤。然后将凝胶抽干，并转移到2L圆底烧瓶。加入775mL 50% NaOH，应用机械螺旋桨搅拌，并将烧瓶浸入50℃水浴。30分钟后，加入128mL烯丙基缩水甘油醚(AGE)。反应进行17h。用1个凝胶体积蒸馏水，用5个凝胶体积乙醇，然后用8个凝胶体积蒸馏水洗涤凝胶。

[0049] 中间体5840

用6个凝胶体积蒸馏水洗涤120mL(g)载体颗粒，通过真空干燥，并转移(90.7g)到250mL圆底烧瓶。加入149.3mL 50% NaOH(11.8M)，应用机械螺旋桨搅拌，并将烧瓶浸入50℃水浴。30分钟后，加入36mL AGE。反应进行17h。用1个凝胶体积蒸馏水，用3个凝胶体积乙醇，然后用8个凝胶体积蒸馏水洗涤凝胶。

[0050] 中间体6383

利用3个凝胶体积50%NaOH水溶液，在玻璃滤器上洗涤蒸馏水中的200mL(g)烯丙基化载体颗粒5803。然后将凝胶抽干，并转移到1L圆底烧瓶。加入388mL 50%NaOH水溶液，应用机械螺旋桨搅拌，并将烧瓶浸入50℃水浴。30分钟后，加入64mL烯丙基缩水甘油醚，并进行反应16h。用1个凝胶体积蒸馏水，用5个凝胶体积乙醇，然后用8个凝胶体积蒸馏水洗涤凝胶。

[0051] 中间体3266A

用蒸馏水和用50%NaOH水溶液在玻璃滤器上洗涤256mL(g)载体颗粒。然后将凝胶抽干，并转移到1L圆底烧瓶。加入200mL 50%NaOH水溶液，应用机械螺旋桨搅拌，并将烧瓶浸入50℃水浴。30分钟后，加入200mL AGE，并进行反应17h。用蒸馏水、乙醇和蒸馏水洗涤凝胶。

[0052] 部分溴化和壳失活

中间体6478

将192g(mL)烯丙基化载体颗粒6383与1728mL蒸馏水一起转移排入3L圆底烧瓶。应用机械搅拌。制备200mL水中1000μL溴的溶液。在约2分钟期间，在300rpm搅拌速度缓慢加入溴溶液(相当于88μm粒料的5μm壳中烯丙基的量)。20分钟后，用10个凝胶体积蒸馏水洗涤凝胶。

[0053] 将196g(mL)部分活化凝胶转移排入1L圆底烧瓶。加入175.3g蒸馏水和20.7mL 50% NaOH(1M)，并应用机械搅拌。将烧瓶浸入50℃水浴，反应进行18.5h。然后用10个凝胶体积蒸馏水洗涤凝胶。滴定2x1mL以测定剩余烯丙基含量。

[0054] 中间体5860

将115g(mL)烯丙基化载体颗粒5840与1035mL蒸馏水一起转移排入2L圆底烧瓶。应用机械搅拌。制备100mL水中408μL溴的溶液。在约2分钟期间，在250rpm搅拌速度缓慢加入溴溶液(相当于88μm粒料的5.5μm壳中的烯丙基)。在处理期间，在从锥形瓶(E-flask)倾倒时损失一些溴。随后，用塑料移液管加入。20分钟后，用10个凝胶体积蒸馏水洗涤凝胶。

[0055] 将116g(mL)部分活化凝胶转移排入500mL圆底烧瓶。加入104g蒸馏水和12.25mL

50% NaOH(1M)，并应用机械搅拌。将烧瓶浸入50℃水浴，反应进行16.5h。然后用10个凝胶体积蒸馏水洗涤凝胶。滴定2x1mL以测定剩余烯丙基含量。

[0056] 中间体3266B

将260g(mL)烯丙基化载体颗粒3266A与2300mL蒸馏水一起转移排入3L圆底烧瓶。应用机械搅拌。制备250mL水中3.55g溴的溶液。在搅拌期间缓慢加入溴溶液。5分钟后，用蒸馏水洗涤凝胶。

[0057] 将部分活化凝胶转移排入1L圆底烧瓶。加入250mL 2M NaOH水溶液，并应用机械搅拌。将烧瓶浸入50℃水浴，反应进行17h。然后用蒸馏水洗涤凝胶。滴定2x1mL以测定剩余烯丙基含量。

[0058] 核溴化

将80g(mL)核烯丙基化载体颗粒6478与80mL水和3.2g乙酸钠一起转移排入500mL锥形瓶。然后加入溴的水溶液，直至出现持续黄色。加入甲酸钠(~2g)，以猝灭过量溴。用10个凝胶体积蒸馏水洗涤凝胶。

[0059] 滴定烯丙基和剩余烯丙基(以测定失活壳厚度)

-用水洗涤凝胶。

[0060] -用立方体测量1.0mL凝胶，并转移到具有9mL蒸馏水的吸滤瓶。

[0061] -加入水中溴的饱和溶液，直至由于过量Br_2出现持续黄色。

[0062] -磁力搅拌样品5min。

[0063] -使样品处于真空(水抽)下，带有磁力搅拌，以去除过量溴。

[0064] -然后，通过用10mL蒸馏水清洗烧瓶将样品转移到滴定烧杯。

[0065] -加入2-3滴浓HNO3，并开始用0.1M AgNO3滴定间接测定烯丙基含量。

[0066] -结果作为μmol/mL凝胶给出。

[0067] -从模型计算理论壳厚度，其中假定部分溴化和失活后的残余烯丙基含量完全在由不具有烯丙基的壳包围的核中。利用88微米直径和x微米壳厚度的粒料，在溴化/失活之前和之后的烯丙基含量之比为$44^3/(44-x)^3$，由此可计算x。

[0068] 表1. 烯丙基化和溴化/失活中间体的烯丙基含量

原型	烯丙基含量μmol/mL	理论壳厚度μm
5840	210	n/a
部分溴化和失活后的5860	164	3.5
6383	336	n/a
部分溴化和失活后的6478	264	3.5
3266 A	255	n/a
部分溴化和失活后的3266 B	190	4.0

配体偶合

1,3-二氨基-2-丙醇偶合

将24.8g 1,3-二氨基-2-丙醇(270mmol, 34eq)转移到100mL圆底烧瓶。将烧瓶浸入60℃水浴，以融化配体75分钟。

[0069] 将30mL(g)核活化烯丙基化载体颗粒6478(7.92mmol烯丙基, 1eq)转移排入烧瓶，并应用机械螺旋桨搅拌(230rpm)。反应进行17h。在冷却烧瓶后，检测pH至~12。用12个凝胶

体积蒸馏水洗涤凝胶。

[0070] 三(2-氨基乙基)胺偶合

将40mL(g)核活化烯丙基化基质6478(10.56mmol烯丙基，1eq)转移排入250mL圆底烧瓶。加入39.6mL三(2-氨基乙基)胺(264.3mmol，25eq)，并应用机械螺旋桨搅拌(200rpm)。反应进行17h。检测pH至8.8。用10个凝胶体积蒸馏水洗涤凝胶。

[0071] 聚烯丙胺偶合

将37mL(g)核活化烯丙基化基质3266B转移排入250mL圆底烧瓶。使11.3g聚烯丙胺Mw 15kDa(Aldrich，283215)溶于20ml蒸馏水+2ml 50%NaOH水溶液，并加到烧瓶。应用机械螺旋桨搅拌(200rpm)，并使反应在50℃进行17h。首先用0.5M HCl，然后用1mM HCl，然后用10个凝胶体积蒸馏水洗涤凝胶。

[0072] 胺含量滴定

-用水洗涤凝胶。

[0073] -用3x0.5M HCl，然后用3x1mM HCl洗涤凝胶。

[0074] -用立方体测量1.0mL凝胶，并转移到具有19mL蒸馏水的滴定杯。

[0075] -加入2-3滴浓HNO_3，并开始用0.1M $AgNO_3$滴定间接测定胺含量。

[0076] -结果作为μmol/mL凝胶给出。

[0077] 表2．核-壳原型的胺含量

原型	胺含量μmol/mL	配体密度μmol/mL
1,3-二氨基-2-丙醇	168	84
三(2-氨基乙基)胺	221	55
聚烯丙胺Mw 15kDa	210	0.8

实施例2．蛋白在原型上的结合容量

以6μl凝胶/孔填充空的96孔滤板。在板试验期间使用表3中所述的方法。根据洗出任何未结合蛋白所需，培养后洗涤次数在2和3之间变动。

[0078] 表3．板试验方法

步骤	体积(μl)	缓冲剂	执行
平衡	3x200	缓冲剂	1min 摇动+真空
蛋白加入	100 + 100	蛋白溶液+缓冲剂	60min 摇动+离心
洗涤	Xx200	缓冲剂	1min 摇动+离心

分析

通过在280nm的吸光度和从校准曲线计算的浓度分析未结合蛋白。

[0079] 结合蛋白的量从所加蛋白和未结合蛋白量的差计算。.

从浓度计算各孔的容量。

[0080] 最大容量表示为g/L，这是基于关于各试验制备蛋白溶液计算的，不是通过在比色皿中UV检测。

[0081] 对各系列不加蛋白进行空白试验，以排除来自其它UV吸收材料的任何干扰。

[0082] PAA上BSA和卵白蛋白的结合容量结果

原型：聚烯丙胺

离子容量:210μmol/ml

蛋白1:BSA 2g/l, IP~4.7

蛋白1:卵白蛋白2g/l, IP~4.7

缓冲剂系统1:40mM Tris pH 7.2-8.2

缓冲剂系统2:20mM哌嗪pH 6

盐:NaCl

表4. 聚烯丙胺原型上BSA的结合容量(g/L)

NaCl (mM)	0	250	500	750	1000	1250
pH 7,2 40mM Tris	32	62	33	11	1	0
pH 7,7 40mM Tris	32	62	44		3	0
pH 8,2 40mM Tris	44	61	40	14	3	0

如表4中所示,聚烯丙胺原型具有在250mM NaCl对于BSA的最高结合容量。在1250mM NaCl,聚烯丙胺原型没有对于BSA的容量,这表明对于BSA盐洗脱良好的可能性。

[0083] 表5. 聚烯丙胺原型上的BSA和卵白蛋白的结合容量(g/L)

		BSA
A	pH6 20mM哌嗪	63
B	pH6 20mM哌嗪250mM NaCl	49
C	pH6 20mM哌嗪500mM NaCl	17
		卵白蛋白
E	pH6 20mM哌嗪	65
F	pH6 20mM哌嗪250mM NaCl	41
G	pH6 20mM哌嗪500mM NaCl	18

在用哌嗪作为缓冲剂系统时,聚烯丙胺具有在无盐时对于BSA和卵白蛋白二者最佳的结合容量,见表5中的行A和E。然而,在250mM NaCl,容量仍很好。

[0084] 原型:聚烯丙胺

离子容量:210μmol/ml

蛋白:卵白蛋白2g/l, IP~4.7

缓冲剂系统:20-40mM磷酸盐pH 7-7.5

盐:NaCl

表6. 聚烯丙胺原型上卵白蛋白的结合容量(g/L)

	卵白蛋白
20mM磷酸盐+0mM NaCl, pH 7.0	20
20mM磷酸盐+0mM NaCl, pH 7.5	21
20mM磷酸盐+150mM NaCl, pH 7.0	13
20mM磷酸盐+150mM NaCl, pH 7.5	15
40mM磷酸盐+300mM NaCl, pH 7.0	5
40mM磷酸盐+300mM NaCl, pH 7.5	8
40mM磷酸盐+500mM NaCl, pH 7.0	7
40mM 磷酸盐+500mM NaCl, pH 7.5	8

原型:聚烯丙胺

离子容量:210μmol/ml

蛋白1:卵白蛋白4g/l, IP~4.7

蛋白2:BSA 4g/L, IP~4.7

缓冲剂系统:40mM Tris pH7.2-8.2

盐:NaCl

表7. 聚烯丙胺原型上卵白蛋白和BSA的结合容量(g/L)

	卵白蛋白	BSA
40mM Tris pH 7.2 + 250 mM NaCl	73	73
40mM Tris pH 7.7 + 250 mM NaCl	65	70
40mM Tris pH 8.2 + 250 mM NaCl	52	63

在表6中,聚烯丙胺显示在不加盐时对卵白蛋白的最高结合容量,pH影响不能在磷酸盐系统中见到。

[0085] 比较表6与表7清楚地看到,比磷酸盐缓冲剂系统,聚烯丙胺利用Tris缓冲剂系统更有利于对卵白蛋白的容量。

[0086] 在表7的Tris系统中,在聚烯丙胺上的容量随降低pH而增加。对卵白蛋白的结合容量比BSA更受pH影响。

[0087] 原型:聚烯丙胺

离子容量:210μmol/ml

蛋白:卵白蛋白2g/l, IP~4.7

缓冲剂系统:40mM Tris pH7.2-7.5

盐:NaCl

表8. 聚烯丙胺原型上卵白蛋白的结合容量(g/L)

	pH	7.2	7.5
A	40mM Tris + 0mM NaCl	66	66
B	40mM Tris + 150mM NaCl	57	57
C	40mM Tris + 300mM NaCl	45	44

再次显示,聚烯丙胺和Tris得到对卵白蛋白的高结合容量,见表。即使容量随加盐降低,但仍然很高。

[0088] 聚烯丙胺原型和Capto Core 700上卵白蛋白的结合容量比较

原型:聚烯丙胺

离子容量:210μmol/ml

参比介质:Capto core 700

离子容量:40-85μmol/ml

蛋白:卵白蛋白3g/l, IP~4.7

缓冲剂系统:40mM Tris pH 7.2-7.5

盐:NaCl

表9. 聚烯丙胺原型和Capto Core 700上卵白蛋白的静态结合容量(g/L)

		聚烯丙胺			Capto™ Core 700		
	NaCl (mM)	0	150	250	0	150	250
A	40mM Tris pH 7.2	101	83	69	29	22	22
B	40mM Tris pH 7,5	101	82	70	27	23	22

Capto™ Core 700(Ge Healthcare Bio-Sciences AB)是一种市售产品,基于85-90微米体积加权平均直径,具有截断Mw 700 kDa的惰性壳和通过胺氮偶合的辛基胺配体得到的核的高交联琼脂糖粒料。壳结构很类似于目前制备的原型,且已知其与例如病毒颗粒发生实质上0相互作用。

[0089] 在Tris缓冲剂系统中,在聚烯丙胺上对卵白蛋白的结合容量显著较佳。

[0090] 聚烯丙胺概述

在运行聚烯丙胺时,适当考虑配体的等电点(IP),因此,缓冲剂的pH不接近配体的IP,使其不带电荷。聚烯丙胺的IP为~8.7。

[0091] 聚烯丙胺对卵白蛋白和BSA作用良好。已最多检验卵白蛋白,显然,与磷酸盐缓冲剂比较,Tris缓冲剂系统提高容量。BSA的结合容量在1.25mM NaCl为0,见表4,这表明可用盐洗脱。BSA和卵白蛋白的性质相似,因此,卵白蛋白也可用盐从聚烯丙胺洗脱。

[0092] 1,3-二氨基-2-丙醇和三(2-氨基乙基)胺原型的结果

原型:1,3-二氨基-2-丙醇

配体密度:84μmol/ml

原型:三(2-氨基乙基)胺

配体密度:55μmol/ml

蛋白溶液:卵白蛋白2g/L, IP ~4.7

缓冲剂系统1:50 mM Tris pH 7.4

缓冲剂系统2:50 mM磷酸盐pH 7.2

盐:NaCl

基质的量/孔:6μl

表10. 1,3-二氨基-2-丙醇和三(2-氨基乙基)胺原型上卵白蛋白的结合容量(g/L)

		1,3-二氨基-2-丙醇						三(2-氨基乙基)胺					
	NaCl (mM)	0	150	300	500	1000	1500	0	150	300	500	1000	1500
A	50mM Tris pH 7.4	23	12	7	4	2		32	20	12	6	2	1
B	50mM 磷酸盐 pH 7.2	1	1	1				4	2				

1,3-二氨基-2-丙醇和三(2-氨基乙基)胺原型在高盐浓度结合,这可在行A中见到。三(2-氨基乙基)胺具有对于卵白蛋白的较高结合容量,两种原型均有利于Tris结合卵白蛋白。

[0093] 实施例3. 污染原型的净化

利用800微升孔大小,在96孔滤板中进行此项研究。板孔用20微升基质填充,并用大肠杆菌均浆污染。用不同再生液体进行净化,并通过与24mM二硫苏糖醇(DTT)和0.5%十二

烷基硫酸钠(SDS)沸腾迫使仍留在粒料中的污染物进入溶液,然后用芯片电泳在Caliper HT Protein LabChip系统中分析。

[0094] 大肠杆菌溶胞产物

用大肠杆菌均浆污染介质。使冷冻大肠杆菌均浆解冻,并通过玻璃纤维滤器,随后通过0.45μm膜滤器澄清。

[0095] 板试验

以20μl凝胶/孔填充空滤板。在板试验期间使用表中所述的方法。用每种溶液一式三份进行一个板。对CIP的培养时间为15分钟。

[0096] 表11. 板试验方法

步骤	体积(μl)	缓冲剂	执行
平衡	3x200	PBS	快速摇动+真空
污染	300	大肠杆菌	30min 摇动+真空
洗涤	3x200	PBS	快速摇动+真空
CIP	300	见附录 1	15min 摇动+真空
洗涤	3x200	PBS	快速摇动+真空
离心	-	-	5 min - 972xg ，以去除所有液体

在粒料结束离心后,通过连接滤板顶上的收集板,并用橡胶带使它们一起固定,使介质塞转移到收集板。转动板塔,以使滤板处于顶上,并离心5min(972xg)。然后向收集板中的所有孔加入200μl Caliper样品缓冲剂。孔用微箔密封覆盖,并放在微量板摇动器上2分钟。将板放在热室(104℃)中5分钟。在加热后另外摇动样品2分钟,并离心2分钟(500xg),以使凝胶颗粒沉降。将40μl上清液小心转移到PCR板(锥底)。在凝胶塞从滤板转移到收集板期间,颠倒样品次序,在此,通过在行H至行A中吸移样品,如此类推,将顺序改回。使PCR板离心1分钟(500xg),以旋沉可能已转移的胶凝颗粒。然后,板准备放在Caliper芯片电泳设备(Caliper Life Sciences Inc., USA)中。

[0097] Caliper LabChip电泳

根据HT Protein LabChip™ Kit试剂盒用户指南(Caliper Life Sciences Inc., 2010年11月)制备芯片、缓冲条和分子量梯。运行HT Protein Express 200 High Sensitivity高灵敏程序。

[0098] 结果显示于图4-6中。在Capto Core 700上,只有包含异丙醇的溶液实际有效去除所有污染物。相比之下,在聚烯丙胺原型上,除8M脲以外的所有溶液显示有效杂质去除。二氨基丙醇和三氨基乙基胺原型也可有效用除8M脲和8M脲+柠檬酸以外的所有溶液去除。

[0099] 本书面说明用实施例公开本发明,包括最佳方式,也用实施例使本领域的技术人员能够实施本发明,包括制造和使用任何装置或系统并施行任何结合方法。本发明的可专利范围由权利要求限定,并且可包括本领域的技术人员想到的其它实例。这些其它实例旨在属于权利要求的范围内,如果它们具有与权利要求字面语言无差异的结构要素,或者如果它们包括与权利要求字面语言无实质差异的等效结构要素。

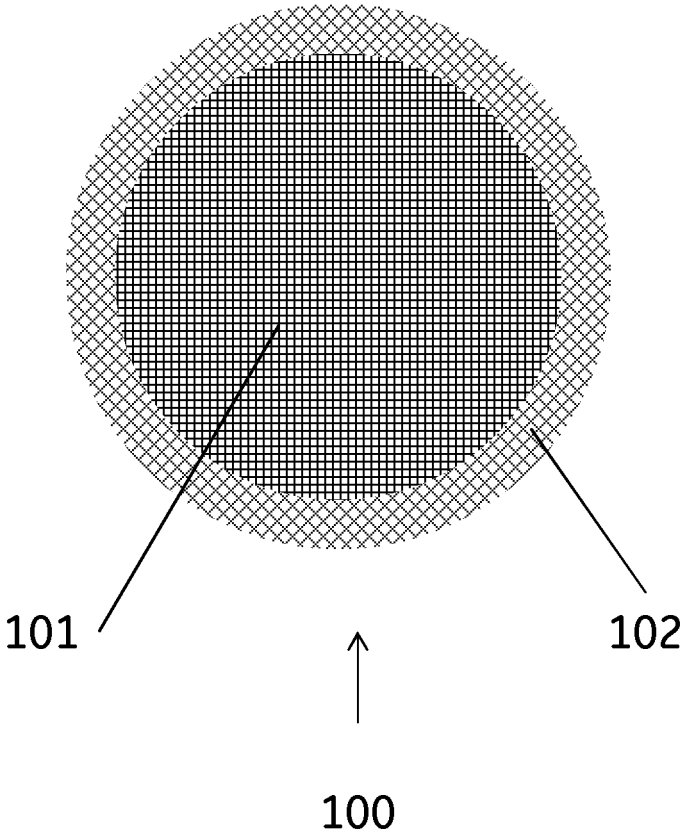


图 1

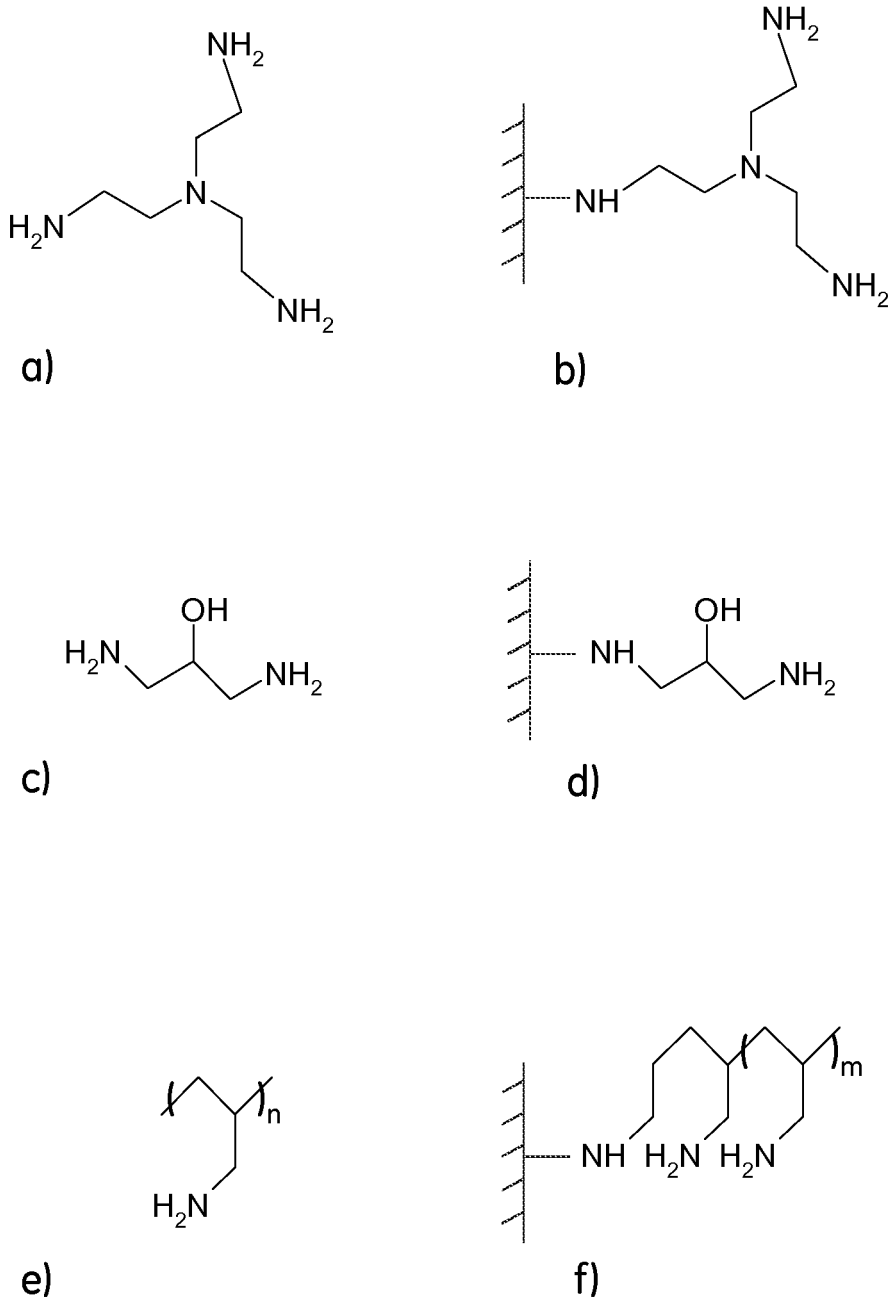

NH2
N
H2N
NH2
a)
NH2
N
NH
NH2
b)
OH
H2N
NH2
c)
OH
NH
NH2
d)
n
H2N
e)
m
NH
H2N
H2N
f)

图 2

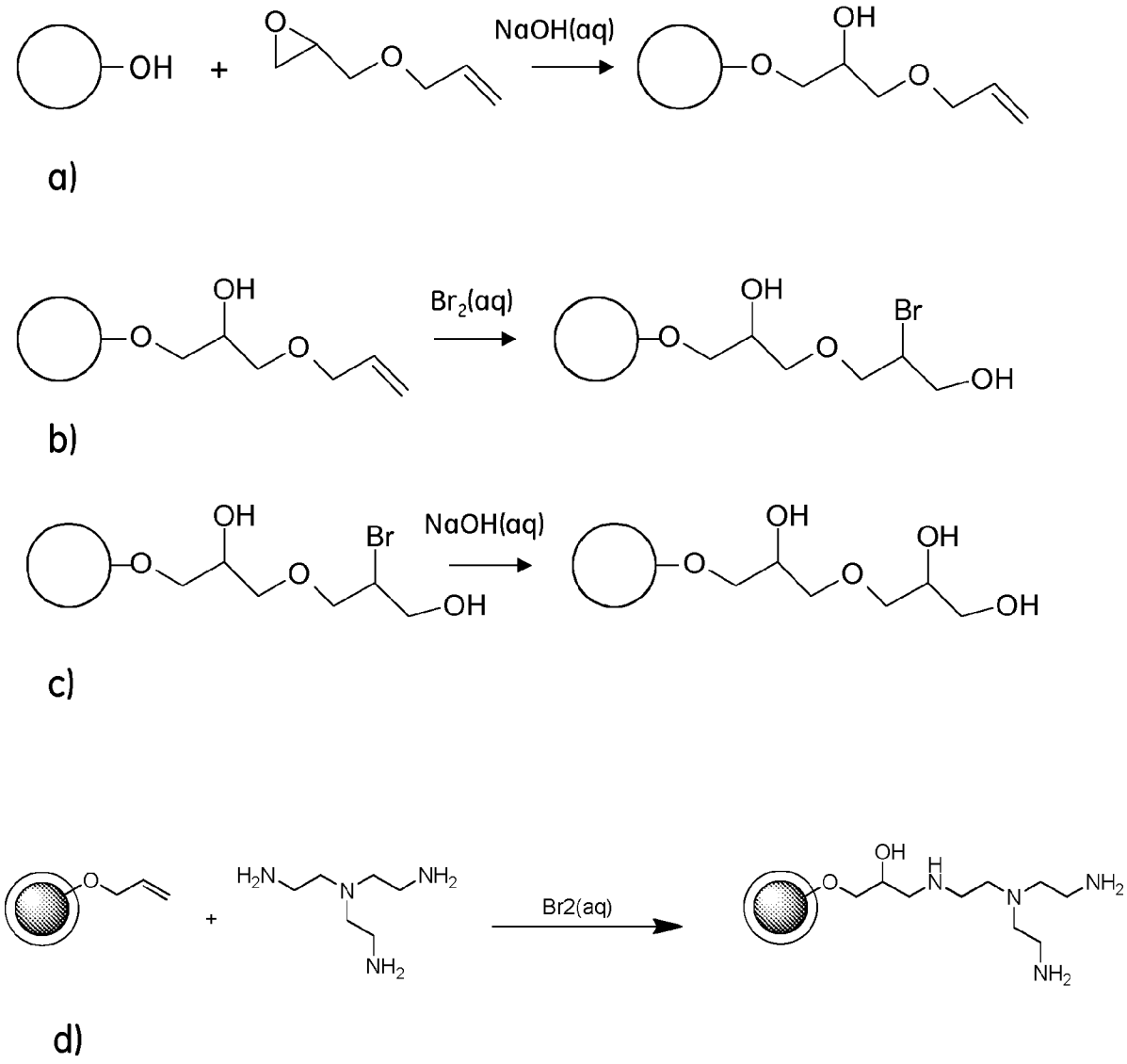

OH
+
NaOH(aq)
a)
Br_2(aq)
Br
b)
c)
H_2N
NH_2
Br2(aq)
d)

图 3

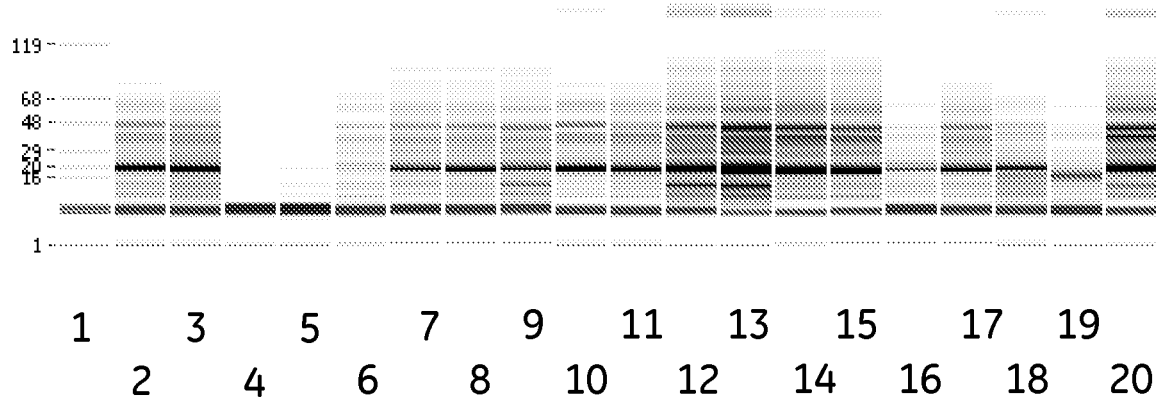

119
68
48
29
20
16
1
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20

图 4

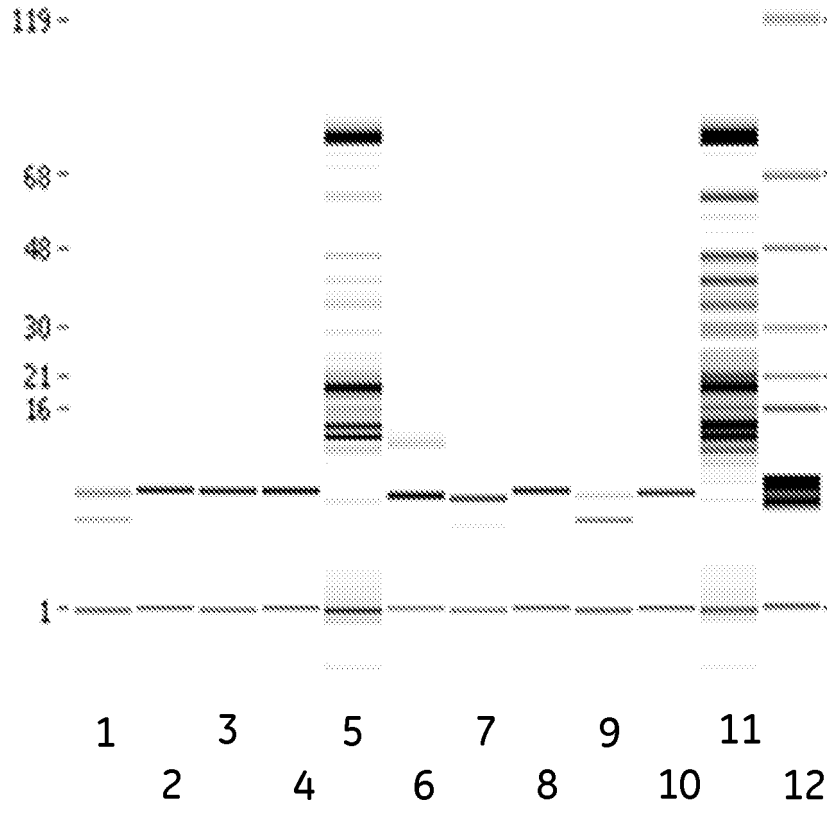

119
68
48
30
21
16
1
1 3 5 7 9 11
2 4 6 8 10 12

图 5

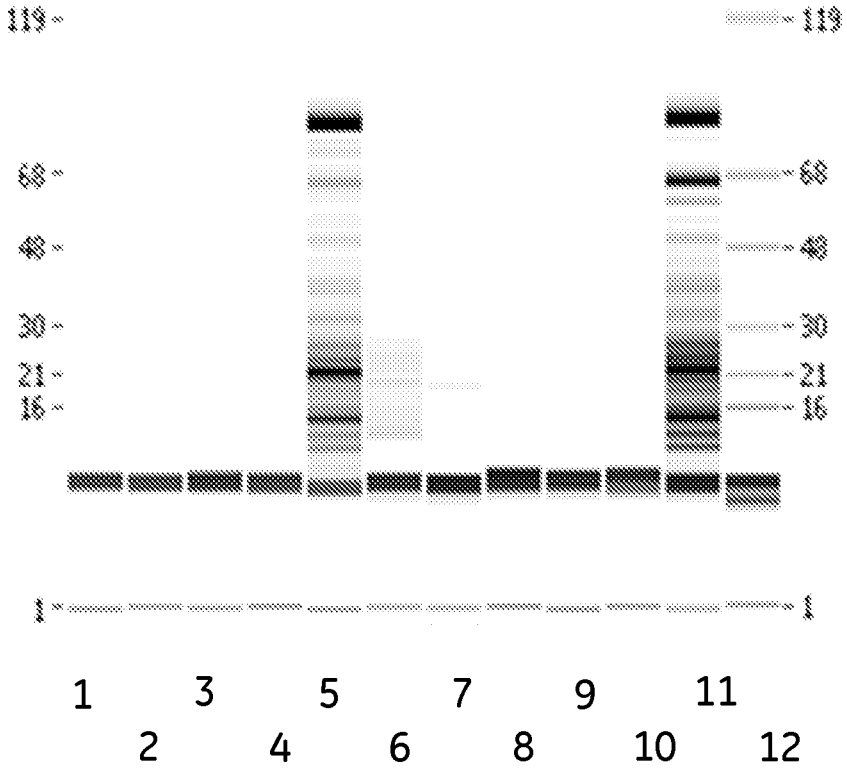

119
68
48
30
21
16
1
1 3 5 7 9 11
2 4 6 8 10 12

图 6